



MOLEKULAR GENETIKA

Alimxodjaeva P.R. | Turchibaeva N.M.
Abduvaliev A.A. | Bohoev Q.



Toshkent – 2021

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI

OLIY VA O'RTA MAXSUS TA'LIM VAZIRLIGI

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI SOG'LIQNI SAQLASH VAZIRLIGI

TIBBIY TA'LIMNI RIVOJLANTIRISH MARKAZI

TOSHKENT TIBBIYOT AKADEMIYASI

**Alimxodjaeva P.R., Tuychibaeva N.M.,
Abduvaliev A.A., Boboev Q.T**

MOLEKULAR GENETIKA

Darslik O'zbekiston Respublikasi Oliy va o'rta maxsus ta'lim vazirligi hamda O'zbekiston Respublikasi Sog'liqni saqlash vazirligi tomonidan tasdiqlangan oliy tibbiyot o'quv yurtlari tibbiy - biologik ta'lim yo'nalishi bo'yicha "Molekulyar genetika" dasturi asosida tayyorlangan

Alimxodjaeva P.R., Tuychibaeva N.M., Abduvaliev A.A., Boboev Q.T. // « MOLEKULYAR GENETIKA »: Darslik / OOO «TIBBIYOT NASHRIYOTI MATBAA UYI», Toshkent -2021y.- 316 b.

Tuzuvchilar:

- Alimxodjaeva P.R.** – TMA professori, biologiya fanlari doktori
Tuychibaeva N.M. – TMA dostenti, tibbiyot fanlari nomzodi
Abduvaliev A.A. – TMA dostenti, biologiya fanlari nomzodi
Boboev Q.T. – Gematologiya va qon quyish ilmiy tekshirish instituti k.i.x., tibbiyot fanlari doktori

Taqrizchilar:

- Karimov X.Y.** – GITva QQ instituti "Molekulyar tibbiyot va hujayra texnologiyalari bo'limi boshlig'i, t.f.d.
Xolikov P.X. – TTA professori, biologiya fanlari doktori
Gildieva M.S. – Onkologiya ilmiy Markazi k.i.x., biologiya fanlari doktori

«Molekulyar genetika» darsligi: O'zbekiston Respublikasi Oliy va o'rta maxsus ta'lim vazirligi hamda O'zbekiston Respublikasi Sog'liqni saqlash vazirligi tomonidan tasdiqlangan oliy tibbiyot o'quv yurtlari tibbiy - biologik ta'lim yo'nalishi bo'yicha "Molekulyar genetika" dasturi asosida tayyorlangan

Darslikdagi barcha o'quv material 12 boblarga bo'lingan bo'lib, har birida nazariy savollar va mustaqil yechish uchun masalalar keltirilgan.

Molekulyar genetika fani barcha organizmlar, shuningdek odam genomi, genlar o'zaro ta'siri va genlar ekspressiyasini o'rganadi, ya'ni barcha tibbiyot sohasidagi shifokorlar fanning asosiy bilimlariga ega bo'lishi zarur.

O'quv qo'llanma TTA MUX muxokama qilingan va tavsiya etilgan
20.09.2019 Bayonnoma № 1

O'quv qo'llanma TTA Ilmiy kengashida muxokama qilingan va tavsiya etilgan 30.10.2019 noyabr 2014 yil Bayonnoma № 4

TTA ilmiy qotibi

Ismailova G. A.

© Alimxodjaeva P.R., Tuychibaeva N.M., Abduvaliev A.A., Boboev Q.T

© OOO«TIBBIYOT NASHRIYOTI MATBAA UYI». 2021

MUNDARIJA

MUQADDIMA	7
I BOB. KLASSIK GENETIKA DAVRI	9
1.1. Irsiyat qonuniyatlarining kashf qilinishi. G. Mendelning faoliyati.....	10
1.2. T. Morgan. Irsiyatning xromosoma nazariyasining mohiyati.....	14
2-BOB. GEN NAZARIYASI	18
2.1. Molekulyar genetika asoslari, gen haqidagi asosiy tushunchalar	18
2.2. Pog'onali allelomorfizm. Soxta-allelizm	21
2.3. Gen xususiyatlari	25
2.4 Prokariotik genomning tuzilishi.....	27
2.5. O'lchovlar, halqasimon xromosoma, episomalar.....	29
2.6. Genetik va fizik xaritalar, ularning muvofiqligi, tuzilish usullari.....	38
3-BOB. EUKARIOTIK GENOMNING TUZILISHI	41
3.1 Umumiy xususiyatlari. Prokariotik genomdan farqlab turuvchi o'ziga xosliklari	41
3.2. Genom o'lchovlari va C kattaligi paradoksi. Xudbin DNK gipotezasi.	49
3.3. Gomopolimer va oddiy takrorlanadigan ketma-ketliklar. Minisatellitli DNK. Bernardi izoxorasi.	52
4-BOB. EUKARIOTIK GENLARNING MURAKKAB TUZILISHI.	55
4.1. Umumiy tavsif. Uziq-uziq tuzilish - ekzon va intron.	55
4.2. Genlarning uziq-uziq tuzilishini aniqlash va o'rganish usullari: elektron mikroskop (D-ilmoqlar, R-ilmoqlar), restriksion tahlil.	58
5-BOB. GEN TUZILISHINI O'RGANISH	60

5.1. Prokariotlarda genlarni operonlardan tashkil etilish, printsipli.....	60
5.2. Genlarning kimyoviy sintezi.....	64
5.3. Molekulyar genetikaning zamonaviy usullari.....	65
5.4. Molekulyar klonlash uchun vektorlar.....	68
5.5. Achitqilar sun'iy xromosomalari (YAC).....	74
5.6. Restriksion xaritalarni tuzish.....	77
5.7. Sauzern blotting tahlili.....	79
5.8. Nozern blotting tahlili.....	82
5.9. Polimeraza zanjirli reaksiyasi.....	82
5.10. Nukleotidlarning ketma-ketligini aniqlash (sikvenslash).	84
5.11. Drosofiladagi transformatsiya.....	86
6-BOB. MUTAGENEZ, DNK REPARATSIYASI, KROSSINGOVER VA JINSIY KONVERSIYANING MOLEKULAR MEXANIZMLARI	90
6.1. Genetik kodning buzilishi bilan bog'liq mutatsiyalar.....	90
6.2. Trinukleotidning ekspansiyasi (kengayishi) sababli mutatsiyalarning takrorlanishi.....	95
6.3. Teskari va supressor mutatsiyalar.....	97
6.4. Saytga xos mutagenez.....	102
6.5. DNK reparatsiyasi mexanizmlari.....	103
6.6. Postreplikativ yoki rekombinatsiya, ta'mirlash (PRR).....	109
6.7. Krossingoverning molekulyar asoslari.....	110
6.8. Gen konversiyasi.....	118
7 BOB. GENOM XROMOSOMALARINING TUZILISHI.....	121
7.1. Virus, prokariot va eukariot hujayralari organoidlarining xromosomalari.....	121
7.2. Yuksak eukariotlarning mitotik xromosomalari.....	130
7.3. Ko'p rangli fluorestsent gibrizatsiya in situ.....	135

7.4. Geteroxromatin va xromosomalarning qayta qurilishlari.	144
7.5. V-xromosomalar yoki qo'shimcha xromosomalar.....	172
8 BOB. XROMOSOMALARNING TUZILISHI VA TURLARI....	175
8.1. Genom tizimida genning joylashgan joyini o'zgartirishi tufayli faolligini o'zgarishi.....	175
8.2 Geteroxromatinizatsiyaning mexanizmlari.	183
8.3. DNKning xromosomalarda joylashishi	188
8.4. Xromosomalarning xromomer tuzilishi	198
8.5. "Lampa cho'tkasi" tipidagi xromosomalar.	201
8.6. Politen xromosomalar.....	204
9 BOB. JINS ANIQLANISHINING GENETIK ASOSLARI.....	209
9.1. Ginandromorf, interseks, germafroditlar va boshqa jinsiy og'ishlar (patologiyalar).	211
9.2. Jins aniqlashining balans nazariyasi.	212
9.3. Drozofilada jinsning aniqlanishida genlar faoliyati.	213
9.4. Sut emizuvchilarda jinsning aniqlanishi.....	217
9.5. Sutmizuvchilarning genlar dozasini kompensatsiyasi.	222
BOB 10. ONKOGENETIKANING ASOSLARI	227
10.1. Hujayralarning transformasiyasi va o'smaning hosil bo'lish jarayoni.....	227
10.2. O'smalarning hosil bo'lish sabablari.	230
10.3. Onkogenlar.	232
10.4. Antionkogenlar, yoki o'smalarning supressor genlari.	236
10.5. Metastazlarning kuzatilishini genetik nazorati.	243
10.6. O'smani shakllanishining ko'p bosqichliligi (o'smaning progressiyasi).....	243
11 BOB. GENETIK MUHANDISLIKNIING ASOSLARI.....	245
11.1. Genetik muhandislikning fermentlari.	245
11.2. Teskari transkriptaza.....	249

11.3 Ligazalar.....	251
11.4. Polinukleotidkinazalar.....	252
11.5. Rekombinant DNK konstruksiyasining hosil qilinishi.	258
11.6. Yangi genning hujayraga kiritilishi.....	261
11.7. Sut emizuvchi hayvonlarning hujayralariga genlarning kiritilishi.....	272
11.8. Genoterapiya.....	276
BOB 12. MOLEKULAR GENETIKADA QO'LLANADIGAN LABORATOR TEKSHIRISH USULLARI.....	287
12.1. Sitogenetik tekshiruvlar.....	287
12.2. Molekulyar-sitogenetik usul. (Fluoresént gibrizásiya in situ-FISH).....	289
12.3. Molekulyar genetik tadqiqotlar.....	291
12.3.1. Genom DNKni periferik qon limfositlaridan ajratib olish.....	291
12.3.2. Polimeraza zanjirli reaksiyasini o'tkazish (PZR).....	292
12.3.4. Sikvens tahlilini o'tkazish.....	298
12.4. Inson DNKsining sud-biologik ekspertizasi.....	299
GLOSSARIY.....	304
ADABIYOTLAR.....	314

MUQADDIMA

Genetika – bu tirik mavjudotlarning asosiy xususiyatlarini - irsiyat va o'zgaruvchanlikni o'rganadigan fan. Hozirgi vaqtda organizmlarning irsiyati va o'zgaruvchanligi fiziologik genetika, atrof-muhit genetikasi, evolyutsion genetika, populyatsion genetika, molekulyar genetika va boshqa fanlar tomonidan o'rganilmoqda. Genetika muhandisligi sohasida sezilarli yutuqlarga erishildi, jumladan hujayralarning irsiy apparatini qayta qurish, genetik "ximeralar" hosil qilish va ushbu genomi modifikatsiya qilingan organizmlarni bir qator amaliy muammolarni, shu jumladan tibbiyot sohasidagi muammolarni hal qilishda foydalanishga imkon beradi. Buning isboti sifatida ko'pgina qandli diabetga chalingan bemorlarning hayoti bevosita bog'liq bo'lgan DNK-rekombinantli inson insulinini eslash kifoya.

Shu bilan birga, turli patologiyalarning rivojlanishiga olib kelishi mumkin bo'lgan organizmlarning ontogenetik rivojlanishi jarayonida irsiy ma'lumotlarni ketma-ket amalga oshirilishi muammolari hal qilinmay qolyapti. Irsiy apparat faoliyatini tartibga solish va ushbu jarayonni boshqarish sohasidagi tadqiqotlar juda qiziqarli va istiqbollidir. "Sifatsiz" yoki o'zgargan genlarni almashtirish orqali gen kasalliklarini davolash imkoniyati masalalari o'z yechimini kutmoqda.

Genetika qonunlaridan foydalanish ota-onalarning genotip ma'lumotlariga asoslanib bolalarning genotiplarini aniqlash, shuningdek bolaning genetikasiga bog'liq belgilari bilan tug'ilishi ehtimolini taxmin qilish imkonini beradi. Shu sababli, genetik shifokor vaziyatli irsiy masalalarni hal qilish ko'nikmalariga ega bo'lishi lozim, bu ayniqsa irsiy tomondan og'irlashgan oila a'zolarining genetik konstitutsiyasini aniqlashda, kasal bola tug'ilishining prognozi yoki ba'zi kasalliklarga irsiy moyilligi borligi haqida maslahat berish zarur bo'lganida, ba'zi hollarda esa ayrim sud-tibbiy ekspertiza masalalarini hal qilishda juda muhimdir.

Tavsiya etiladigan darslik: "Molekulyar genetika asoslari" TMA Tibbiy-biologiya fakulteti talabalari uchun 2019-yilda O'zbekiston

Respublikasi Oliy va o'rta maxsus ta'lim vazirligi tomonidan tasdiqlangan o'quv rejasi va amaldagi ta'lim standartiga muvofiq tayyorlangan.

Ushbu darslikda belgilar nasllanishining barcha asosiy qonuniyatlari, shu jumladan genotipdagi genlarning o'zaro ta'siri, shuningdek allelli va noallel genlarning o'zaro ta'siri natijasida fenotipik, yani tashqi belgilarning o'zgarishlari ko'rib chiqiladi. Darslikda irsiyatning molekulyar asoslari va irsiy ma'lumotni amalga oshirish jarayonlarining batafsil bayoni berilgan. Molekulyar genetikaning ayrim muammolariga bag'ishlangan boblarda tashxis qo'yish uchun muhim bo'lgan ma'lum bir masalalarni ko'rib chiqish uchun misollar keltirilgan.

Barcha o'quv materiallari 12 bobga bo'lingan, ularning har birida asosiy nazariy nizomlar bayon qilingan, savollar va mustaqil yechim uchun topshiriqlar taklif qilingan. Savollarga javob berish, muammoni mustaqil hal qilish molekulyar genetika kursining har bir bo'limning nazariy matnini sinchkovlik bilan va izchil o'rganish va tahlil qilishni talab qiladi, bilimlarni umumlashtirish va mustahkamlash ularni yangi vaziyatlarda qo'llash imkonini beradi.

Darslikning har bir bobining oxirida ayrim genetik atamalar lug'ati mavjud, bu atamalarning ta'rifi berilgan, shuningdek nafaqat ushbu darslikda ko'rib chiqiladigan, eng ko'p tarqalgan va ishlatiladigan genetik tushunchalar, balki bir qator qo'shimcha atamalar va tushunchalarning ma'nosi ham ochib berilgan.

Qo'llanmaning paragraflaridagi matnni sinchkovlik bilan o'rganish, vazifalarni bajarish va genetik masalalarni yechish, laboratoriya ishlarini bajarish irsiyat va o'zgaruvchanlik qonuniyatlarini, inson genetikasida qo'llaniladigan molekulyar tadqiqotlar usullarini, ontogenez, mikroevolyutsiya va tibbiyotning bir qator masalalarini hal qilishda genetik tadqiqotning ahamiyatini tushunishga imkon beradi.

Darslikni yozishda mualliflar boshqa mamlakatlar universitetlarida qabul qilingan molekulyar genetika o'quv dasturining asosiy qoidalari va talablariga amal qilishgan, shuningdek umumiy va tibbiy genetika fanlarini o'qitishda ko'p yillik shaxsiy tajribalariga tayanishgan. Mualliflar ularning birgalikdagi faoliyati nafaqat molekulyar genetika asoslarini o'rganishni boshlovchilar uchun, balki ushbu sohada ma'lum tajribaga ega bo'lganlar uchun ham foydali bo'ladi deb umid qilishadi.

I BOB. KLASSIK GENETIKA DAVRI

Irsiyat qonuniyatlarining kashf etilishi. G. Mendelning faoliyati. Dominantlik va resessivlik. Belgilarning ajralishi. Genlar - irsiyatning tashuvchisi. Xromosomada genlarning joylashishi. T. Morgan. Genlarni chiziq bo'yicha ketma-ket joylashish printsipti. Irsiyat xromosoma nazariyasining asosiy qoidalari. Genotip va fenotip.

Dastlab genetika fan sifatida amaliy ehtiyojlar bilan bog'liq holda rivojlangan. Masalan, uy hayvonlarini va madaniy ekinlarni o'stirishda gibridlash (yani chatishtirish) va seleksiya (yani tanlab olish) kabi genetikaning asosiy usullari uzoq vaqtdan beri qo'llanilib kelingan. Azaldan chatishtirish natijasida hosil bo'lgan gibridlarni boshlang'ich shakllar bilan taqqoslab, amaliyotchilar naslanishning ba'zi qonuniyatlarini payqashgan.

Genetika fanining rivojlanish tarixini 3 davrga bo'lish mumkin:

1. Klassik genetika davri. Genetika organizm darajasida rivojlangan (1900-1930). Bu davrda gen nazariyasi, xromosoma irsiyat nazariyasi yaratildi, genlar, fenotip va genotipning o'zaro ta'siri to'g'risidagi ta'limot ishlab chiqildi.

2. Neoklassitsizm davri. Genetika hujayra darajasida rivojlandi (1930-1953). Ushbu davrda genlar va xromosomalardagi o'zgarishlarni sun'iy ravishda hosil qilish imkoniyati (eksperimental mutagenез) mavjudligi aniqlandi; gen murakkab tizim bo'lib, ko'plab qismlardan iboratligi aniqlandi; populyatsion genetika va evolyutsion genetika tamoyillari asoslandi, biokimyoviy genetika yaratildi va DNK molekulari genetik axborot tashuvchisi ekanligi isbotlandi.

3. Sintetik genetika davrida genetika molekulyar darajada rivojlanadi. Bu davr 1955 yilda boshlanib, hozirgi kungacha davom etyapdi. Bu davrda DNK tuzilishi aniqlandi va uning genetik ahamiyati ko'rsatildi; odamlarda xromosomalarning aniq soni topildi; yangi fan yo'nalishi - klinik sitogenetika paydo bo'ldi; gen va mutatsiyalar nazariyasi yanada rivojlantirildi; biokimyoviy, evolyutsion,

immunologik, onkologik va molekulyar genetika, ekogenetika va farmakogenetika sohasida ko'pgina yangi kashfiyotlar qilindi; rekombinant DNK texnologiyasi (genetik muhandislik) yaratildi. Genetik tadqiqotning markaziy obyekti sifatida odamning biologik xususiyatlari chuqur o'rganila boshlandi (antropogenetika). Tibbiy genetika rivojlandi.

Insonda genetik tadqiqot o'tkazish o'ta murakkabdir. Bu, birinchi navbatda, undagi genetik ma'lumotning o'ziga xos tashkil etilishini va ko'plab belgilar ekspressiyasi, yani tashqi namoyon bo'lishining murakkab tabiati bilan bog'liq. Bundan tashqari, odamda taxminan o'ziga 3,3 milliard nukleotid juftligini sig'diradigan 35 mingga yaqin genlardan iborat juda katta genom mavjud. Insonning har bir hujayrasida DNK umumiy uzunligi ikki metrga teng. Hozirgi vaqtda 25 mingga yaqin genlar aniqlangan va ularning taxminan yarmining ma'lum bir xromosomadagi joylashishi aniqlangan.

1.1. Irsiyat qonuniyatlarining kashf qilinishi.

G. Mendelning faoliyati.

Ekspirimental genetika asoschisi - chex tadqiqotchisi Gregor Mendel, u 1865 yilda Brno shahrida (Chexiya) tabiatshunoslar jamiyatining yig'ilishida jinsiy ko'payish davrida belgilar va xususiyatlarni bir necha avlodlarda nasllanishining asosiy qonuniyatlari haqida ma'lumot berdi. 1866-yilda Ushbu tadqiqotlar "O'simliklar gibridlarida eksperimentlar" ilmiy maqolasida chop etildi, unda Mendel o'ziga xos belgilar va xususiyatlarning shakllanishini belgilovchi irsiy omillar (keyinchalik gen deb ataladi) ota-onalarning jinsiy hujayralari (gametalari) orqali bolalarga o'tishi haqidagi qonuniyatni tariflab berdi.

Olim asosan no'xatda tajribalar o'tkazgan. U no'xat va ba'zi boshqa o'simliklarda ayrim belgilar ota-onadan mustaqil ravishda nasllanishini, irsiy xususiyatlarning nasllanishida ota va ona organizmlari bir xil ahamiyatga ega ekanligini ko'rsatdi. Biroq, Mendelning ishi zamondoshlarining e'tiborini jalb qila olmadi va deyarli unutildi.

Faqat 1900-yilda bir vaqtning o'zida uchta tadqiqotchi G. deFriz (Gollandiya), K. Korrens (Germaniya), E. Chermak (Avstriya) bir-biridan

mustaqil ravishda va mutlaqo boshqa obyektlarda irsiyatning hususiyatlarini qayta ko'rib chiqib, ular kashf qilgan hodisa va qonuniyatlarni 35 yil avval Mendel allaqachon ixtiro qilib bo'lganiga ishonch hosil qildilar. Shunday qilib, 1900-yilni genetika faniga asos solingan yil deb hisoblashimiz mumkin.

Mendelning muvaffaqiyati irsiy xususiyatlarning individual juftlarini genetik tahlil qilish usulining kashf qilinishi bilan bog'liq. Buning yordamida Mendel asosan quyidagi hodisalarni kashf etish orqali genetikaning ilmiy asoslarini yaratdi:

1) har bir nasllanuvchi belgi alohida irsiy omil (zamin) bilan belgilanadi, zamonaviy nuqtai nazardan, bu irsiy omillar genlarga mos keladi. Bitta gen bitta belgi yoki boshqacha qilib aytganda "bitta gen bitta ferment" dir.

2) irsiy omillar (genlar) bir qator avlodlarda o'zgarmay saqlanib qoladi, ya'ni genlar nisbatan doimiydir.

3) O'z irsiy belgilarining avlodlariga berilishida ikkala jins vakillari ham teng darajada ishtirok etadilar.

4) erkak va ayol urug' hujayralarida, nasldan naslga o'tadigan zaminlar (genlar) soni somatik hujayralarga nisbatan ikki baravar kam, bu qoida meyoza mavjudligini irsiy bashorat qilgan.

5) irsiy zaminlar juftlangan, biri onadan, boshqasi otadan o'tadi. Ulardan biri dominant bo'lishi mumkin, ikkinchisi retsessiv. Ushbu nizom allelizm qoidasi kashf qilinishiga olib keldi, unga ko'ra gen kamida ikkita allel bilan ifodalanadi.

Mendelning irsiyat va nasllanish qonunlari genetikaning fan sifatida asosiy mohiyatini tashkil qiladi.

Birinchidan, yuqorida aytib o'tilgan qonuniyatlarni tushunish uchun zarur bo'lgan ba'zi tushunchalar va qabul qilingan atamalarni kiritamiz.

Monoduragay chatishtirish - bu faqat bir juft alternativ (yani bir-birini istisno qiladigan) belgilar bo'yicha farq qiluvchi organizmlarni chatishtirishdir. Bunday belgilarga no'xatdagi urug'ning sariq va yashil rangi, drozofila pashshasidagi normal va rudimentar qanotlari, odamlarda besh barmoqli va olti barmoqli oyoq-qo'llar misol bo'lishi mumkin. Alternativ belgilar - bu bir xil genning modifikatsiyasi bo'lgan bir juft allel genlarning ifodalanishidir. Allel genlar gomologik xromosomalarning bir xil joyida joylashgan.

Gomozigotli ota-onalarni chatishtirganda duragaylarning birinchi avlodida paydo bo'ladigan belgilar dominant (ustun) va genlar esa mos ravishda dominant deb ataladi. Gibridlarning birinchi avlodida namoyon bo'lmaydigan belgilar alternativ dominant genning ta'sirida bostiriladi, ular retsessiv deb nomlangan.

Allel genlari bir xil fenotipik ifodaga ega bo'lgan organizmga gomozigot deyiladi va uning genlarini shartli ravishda **AA** (dominant genlar) yoki **aa** (retsessiv genlar) deb belgilashadi; agar genotipdagi allel genlar turli xil fenotipik ifodalarga ega bo'lsa, bunday organizmni geterozigot deb hisoblashadi – **Aa** (dominant va retsessiv gen).

Organizmdagi barcha genlarining yig'indisi **genotip**, organizmning barcha tashqi xususiyatlarining yig'indisi esa **fenotip** deb ataladi. **Fenotip** – bu genotipning atrof-muhit omillari ta'siri ostida shakllangan tashqi ko'rinishidir.

Mendelning birinchi qonuni - birinchi avlod duragaylarining bir xilligi qonunidir: bir, ikki yoki bir necha juft alternativ belgilar bilan ajralib turadigan sof (gomozigotli) organizmlarni chatishtirganda birinchi avlodning barcha duragaylari genotipda ham, fenotipda ham bir xildir. Keyingi avlodlarda boshqa alternativ xususiyatga ega o'simliklar paydo bo'ladi va har qanday gen juftligida retsessiv xususiyatga ega bo'lgan organizmlar avloddagi barcha organizmlarning aniq choragini tashkil qiladi.

Ikkinchi qonun - bu belgilarning bo'linish qonuni: gomozigot ota-onalarni monoduragay chatishtirish natijasida olingan birinchi avlod duragaylarini bir –biri bilan chatishtirganda, ikkinchi avlodda fenotip bo'yicha 3: 1 (3 ta dominant belgili va 1 ta retsessiv belgili) va genotip bo'yicha 1: 2: 1 (1 **AA** - dominant gomozigot, 2 **Aa** - geterozigot va 1 **aa** - retsessiv gomozigot organizmlar) musbat yuzaga keladi.

Tajribada olingan natijalarni tushuntirish uchun Mendel gametalarning sofliги gipotezasini taklif qildi, bugungi kunda bu gipoteza qonun mavqeini oldi, chunki meyoj jarayonida xromosomadagi o'zgarishlarining o'ziga xos xususiyatlari ma'lum.

Gametalarning sofliги qonuni shuni anglatadiki, zigota va somatik hujayralarda har bir juft gendan ikkita allel mavjud bo'lib, ulardan biri onadan, ikkinchisi otadan o'tadi. Agar allel genlar boshqacha bo'lsa, unda zigota gibrid (duragay) bo'ladi. Jinsiy

hujayralar - gametalar esa hech qachon gibrid bo'lmaydi, ularda har doim ma'lum bir allel juftlikdan faqat bitta gen bo'ladi.

Mendel tomonidan asos solingan "Gametaning sofligi qonuni" nafaqat vaqt o'tishi bilan o'z ahamiyatini yo'qotmadi, balki genetikaning eng muhim qonunlaridan biriga aylandi. U evolyutsion ta'limotni tasdiqlanishi va yanada rivojlantirishiga katta ta'sir ko'rsatdi. Qonunning muhim xulosasi - bu ota-onalarning xususiyatlari avlodda birlashmaydi, qo'shilmaydi va bo'linmaydi, pasayishga moyil bo'lmaydi, lekin turli avlodlar o'rtasida taqsimlanib o'zgarishsiz qoladi.

Mendelning xizmatlari shundan iboratki, olim nasllanish qonuniyatlarni ochish uchun avval ota-onalarni faqat bitta belgi, keyin ikkita, so'ngra uchta va hokazo belgisi bilan farq qilgan holda chatishtirgan, ya'ni asta-sekin vazifani murakkablashtirib borgan, bu esa mono, di- va poliduragay chatishtirishlarda belgilar nasllanish qonuniyatlarini aniqlashga imkon berdi.

Bundan tashqari, Mendel chatishtirish uchun faqat gomozigot organizmlarni oldi, ya'ni o'z-o'zini changlatishda bunday belgilar bo'linmagan. Shuningdek, olim alternativ, yani bir-birini istisno qilgan, qarama-qarshi belgilarni kuzatgan. Masalan, bitta o'simlikning gullari binafsha, ikkinchisi oq, biri baland, ikkinchisi past va boshqalar.

Toza nasllarni (ya'ni gomozigotli organizmlar) olish uchun, belgilar bo'linmasligi maqsadida Mendel 7 yil davomida sariq no'xatni o'z-o'zi bilan changlatgan, y'ni barcha avlodlar faqat sariq bo'lmaguncha. Shunday qilib, chatishtirilgan organizmlar gomozigot edi. O'zaro alternativ yoki bir-birini istisno qilgan belgilar bilan farq qiluvchi ikkita organizmning chatishtirilishiga **gibridizatsiya** deyiladi. Turli irsiy xususiyatlarga ega bo'lgan ikki organism chatishidan kelib chiqqan nasllar esa **gibrid** deb ataladi.

Organizmlar bir qator xilma-xil belgilar bilan ajralib turadi, bu belgilarning barchasi birgalikda namoyon bo'ladi va yagona fenotipni hosil qiladi. Mendelning birinchi va ikkinchi qonunlariga asoslanib, bir juft belgilar nasllanishini ko'z atash oson. Bir nechta belgilarni nasllanish jarayoni esa qanday sodir bo'ladi?

Bir-biridan ikki yoki undan ortiq juft alternativ belgilar bilan ajralib turadigan organizmlarning chatishtirilishiga **di-** yoki **poliduragay** deyiladi.

Ikki juft alternativ belgilar bilan ajralib turadigan no'xotning gomozigot shakllarini chatishtirganda, birinchi avlodda fenotip bo'yicha bir xil organizmlar paydo bo'lishiga olib keladi, yani birinchi avlod duragaylarida tahlil qilingan belgilar juftlarining sonidan qat'i nazar dominantlik qonuni ishlaydi. Gibridlarning ikkinchi avlodida yangi belgilar birikmalariga ega bo'lgan organizmlar paydo bo'ladi, ulardagi belgilar bo'linishini miqdoriy tahlil qilish shuni ko'rsatadiki, har bir belgi juftligi uchun bo'linish $3:1$ (3 dominant belgili va 1 retsessiv belgili organism) ni tashkil qiladi va umumiy holatda $(3:1)^n$ formulaga to'g'ri keladi, bu yerda n - tahlil qilingan belgilar soni.

Mendelning uchinchi qonuni – belgilarning mustaqil nasllanish qonunidir, di- va poliduragay chatishtirishda, belgilar bir-biridan mustaqil ravishda nasllanadi, har bir juft allellar uchun fenotipik bo'linish $3:1$ (3 dominant belgili va 1 retsessiv belgili organism) ni tashkil qiladi. Umuman olganda, poliduragaylar uchun fenotipik bo'linish $(3:1)^n$ formulasi yordamida hisoblanadi, genotip bo'yicha esa - $(1:2:1)^n$ – yani 1 **AA**-dominant gomozigot, 2 **Aa**-dominant geterozigot va 1 **aa**-retsessiv gomozigot organizmlar.

1.2. T. Morgan. Irsiyatning xromosoma nazariyasining mohiyati.

Gregor Mendelning mustaqil nasllanish qonuni faqat organizmning turli xil belgilarini aniqlaydigan genlar turli xil xromosomalarda joylashgan taqdiridagina o'rinli va shunday shartlardagina bajariladi. Mendelning o'zi faqat yettita juft belgilar nasllanishini ko'zatish imkoniyatiga ega edi, bu belgilar uchun uning mustaqil nasllanish qonuni amalga oshar edi. Bugungi kunda bu bizni ajablantirmaydi, chunki no'xat kariotipida 14 ta xromosoma, yani 7 gomologik juft borligi aniqlangan.

Barcha organizmlar kariotipida anchagina cheklangan miqdordagi xromosomalar bor, shu bilan birga bir xil turdagi organizmlar bir-biridan juda ko'p belgilar bo'yicha farq qiladi. Hoynahoy, xromosomalarda bir vaqtning o'zida ko'plab belgilar haqida ma'lumot bo'ladi. Agar genlar bir xil xromosomada joylashgan bo'lsa, biz ularning mustaqil nasllanishiga ishonishga haqli emasmiz. Nima uchun? Eslatib o'tamiz, irsiy ma'lumotni saqlovchi DNK

molekulasi juda katta va, ehtimol, turli xil belgilar va xususiyatlarni aniqlaydigan ko'plab genlarni o'z ichiga oladi. Urug hujayralarining yetilish davrida, meyozi jarayonida, xromosomalar ajralmas struktura sifatida harakat qiladi va alohida qismlarga bo'linmasdan gametalarga o'tadi, demak bitta xromosomada joylashgan genlar bir-biri bilan birga, yani birikkan holda, nasllanishi kerak.

Birikkan nasllanish qonunlari birinchi marotaba Tomas Morgan tomonidan drosophila pashshasida o'tkazilgan tajribalarda o'rganilgan. Tadqiqotlardan olingan ma'lumotlarning tahlili asosida T. Morgan irsiyatning xromosoma nazariyasini quyidagicha shakllantirgan:

1) genlar xromosomalarda chiziq bo'yicha ketma-ket joylashadi va bir-birini yopib qo'ymaydi;

2) bitta xromosoma genlari birikish guruhini tashkil qiladi va birga nasllanadi;

3) birikish guruhlari soni xromosomalarning gaploid to'plami soniga teng;

4) birikish qonuni krossingover bilan buziladi, bu holda yangi, rekombinatsiyalangan birikish guruhlari shakllanishi mumkin;

5) krossingover jarayoni ehtimoli genlar orasidagi masofaga mutanosib va morganidlarda ifodalanadi.

Masofa 1 morganidga teng bo'lsa, krossingover jarayonida yangi birikish guruhlari hosil bo'lish ehtimoli 1%ni tashkil qiladi.

Drosofiladagi birikkan belgilarni nasllanishini misolini ko'rib chiqamiz.

Kulrang (B) oddiy qanotli (V) va qora (b) embrion qanotli (v) pashshalar chatishtirilganida, birinchi avlodagi barcha gibridd organizmlar kulrang tanaga va normal qanotlarga ega (Bb / Vv).

Gibridd erkak (Bb / Vv) qora tanali va embrion qanotli (bb / vv) bo'lgan urg'ochi bilan chatishtirilganda, avlodlarida ota-ona shakllariga o'xshash ikkita fenotipli organizmlar bir-biriga teng miqdorda paydo bo'ladi.

Bunday bo'linishni G.Mendelning mustaqil nasllanish qonuni bilan izohlab bo'lmaydi. Chatishtirish natijalari shuni ko'rsatadiki, tahlil qilingan belgilarning rivojlanishi turli xil genlar tomonidan boshqariladi va bu belgilarning birikib nasllanishi ularning bitta xromosomada joylashishi bilan izohlanadi.

Gibrid urg'ochilar va embrional qanotli qora erkak chatishtirilganida, naslda mustaqil nasllanishga o'xshagan holda to'rt xil fenotipik guruhning vakillari paydo bo'ladi, ammo yuzaga kelgan fenotiplarning miqdoriy nisbati mustaqil nasllanishga nisbatan bir oz farq qiladi. Bu nasllangan belgilar qisman birikkanligini ko'rsatadi va birikishning buzilishini krossingover hodisasi orqali tushuntirilishi mumkin.

Avlodda belgilar nisbati o'zgargan organizmlar soni (krossoverlar) 17% ni tashkil qiladi. Demak, gametlarning shakllanish jarayonida ularning 17%da krossingover sodir bo'lib o'tgan (krossover gametlari). Meva pashshalarining boshqa genlar kombinatsiyalari krossingover turli xil miqdorda uchrashi bilan farq qiladi. Doimiy sharoitlarda (harorat, urg'ochi pashsaning yoshi va boshqalar) bitta xromosomaning har bir gen jufti uchun krossover jarayonida rekombinatsiyalar soni doimiy bo'lib qoladi.

Genlarning birikish kuchi xromosomadagi ularning orasidagi masofaga teskari proportsionaldir. Genlar orasidagi krossover jarayonining doimiyliги xromosomalarning genetik xaritalarini tuzishda qollaniladi, unda genlarning tartibi va bir-biriga nisbatan joylashishi ko'rsatiladi. Krossingover foizi 0.1dan boshlanib ellikkacha yetishi mumkin. 50 morganiid yoki undan ortiq masofada, belgilar bir xil xromosoma bo'yicha joylashishiga qaramay, mustaqil ravishda nasllanadi.

Shunday qilib, ko'rib chiqilayotgan belgilarning genlari bir xil xromosomada joylashgan bo'lsa, ushbu belgilar birgalikda, birikish guruhini hosil qilib nasllanadi. Birikkan nasllanish Tomas Morgan tomonidan aniqlangan qonunlarga bo'ysunadi.

1-misol. Odamlarda rezus-faktor geni va qizil qon tanachalari shaklini aniqlaydigan gen bir lokusda joylashgan va birikish guruhini hosil qiladi, ularning orasidagi masofa 3 morganiidga teng (K. Shtern, 1965). Rezus-musbatligi va elliptotsitoz (qizil qon tanachalarinig shakli buzilishi) dominant autosomal genlar tomonidan aniqlanadi.

Er-xotinlardan biri ikkala belgi bo'yicha geterozigotdir. Shu bilan birga, unga onasidan musbat rezus faktori va otasidan elliptotsitoz nasllanib o'tgan. Uning turmush o'rtog'ining rezus faktori salbiy va normal qizil qon tanachalariga ega. Ushbu oilada qanday genotipli bolalar tug'ilishi mumkinligini va ular fenotiplarining foizini aniqlaymiz.

Masala shartiga ko'ra, ota-onalardan biri ikkala dominant xususiyatga ega va ular turli ota-onalardan nasllanib olgan, ya'ni Rh va E dominant allellari bir xil xromosomada joylashgan emas: Rezus-musbatligini aniqlaydigan Rh geni qizil qon tanachalarining normal shaklini aniqlaydigan r geni bilan birikkan, elliptotsitoz E geni esa rh (rezus manfiy) geni bilan birikkan, shunda:

onaning gametlari: **Rh e** (48,5%); **rh E** (48,5%), shuningdek krossoverlar:

Rh E (1,5%) va **rh e** (1,5%), krossover gametlarining umumiy soni 3% ni tashkil qiladi; otada barcha gametlar bir xil: **rh e**. Bunday holda, bolalarda quyidagi fenotiplar bo'lishi mumkin.

- 1) normal qizil qon tanachalari bilan Rezus-musbat -48,5%
- 2) Rezus - manfiy, elliptotsitoz bilan -48,5%
- 3) Rezus - musbat, elliptotsitoz bilan -1,5%
- 4) Rezus - manfiy, normal qizil qon tanachalari bilan - 1,5%

Vazifa murakkablashtirilishi mumkin, buning uchun ko'p sonli birikkan belgilar nasllanishini ko'rib chiqish lozim.

Nazorat uchun savollar:

1. Irsiyat qonunlari.
2. Belgilarni nasllanish qonuniyatlari. G. Mendelning faoliyati.
3. Dominant va retsessiv belgilar haqida tushuncha.
4. Genlar - irsiyat tashuvchisi. Xromosomalarda genlarning joylashishi.
5. T.Morganning genlar chiziq bo'yicha ketma-ket joylashishi haqidagi nazariyasi.
6. Irsiyatning xromosoma nazariyasining asosiy qoidalari.
7. Genotip va fenotip tushunchasi.
8. Gomo- va geterozigotli organizmlar.

2-BOB. GEN NAZARIYASI

Ko'rib chiqiladigan savollar: Molekulyar genetika zaminlari. Pog'onali (qadam-baqadam) allelomorfizm. Sohta-allelizm. Bakteriofag genining tuzilishi. Gen nazariyasining asosiy tushunchalari. Prokariotik genomning tuzilishi, uning o'lchovlari, xalqali xromosoma, episomlar, F-faktor. Genetik va fizik xaritalar, ularning bir-biriga mosligi, tuzilish usullari.

2.1. Molekulyar genetika asoslari, gen haqidagi asosiy tushunchalar

Genetik tadqiqotning klassik usullari orqali irsiyatning asosiy qonuniyatlari aniqlandi: bir genning o'zini ko'paytirish qobiliyati, uning nisbiy doimiyligi, allellik holati, genotip tizimida ham, fenotip tizimida ham rekombinatsiya va diskret xolatta faoliyat ko'rsatish qobiliyati. Jinsiy hujayralarida diskret irsiy omillarning mavjudligi haqidagi gipoteza 1865-yilda G. Mendel tomonidan e'lon qilingan. 1909-yilda Yoxansen bu omillarni genlar deb atagan.

Irsiyatning asoslarini tahlil qilishda quyidagi kashfiyotlar tufayli muvaffaqiyatga erishildi:

1. Xromosomalarning kimyoviy asosini nuklein kislotalar tashkil qiladi: DNK, RNK, oqsillar.

2. DNK va RNK tuzilishi xromosoma reduplikatsiyasini va irsiy ma'lumotlarning kodlanishini ta'minlaydi.

3. Bitta gen bitta ferment (oqsil) ning tuzilishini nazorat qiladi, bu o'ziga xos belgi sifatida namoyon bo'ladi.

Ushbu boshlang'ich kashfiyotlar irsiyatning asoslarini o'rganishning yangi bosqichi - molekulyar va biokimyoviy darajada tadqiqot o'tkazish uchun to'rtki bo'lib xizmat qildi. Aynan shu usullar yordamida irsiyatning asosi bo'lgan genning murakkab tuzilishi tahlil qilindi.

1.2. Gen muammosi molekulyar genetikaning markaziy muammosidir. Bu T. Morganning "Gen nazariyasi" (1926) asaridan kelib chiqadi, unda gen quyidagilarning ajralmas birligi sifatida taqdim etilgan: mutatsiyaning (gen butunlay o'zgaradi), rekombinatsiyaning (krossingover gen ichida sodir bo'ladi) va funksiyaning (bitta genning barcha mutatsiyalari bitta funksiyaning o'zgarishiga olib keladi).

O'shandan beri gen haqidagi tushunchalar tubdan o'zgardi. Gen nazariyasining rivojlanishida 1950-yillarning oxiridagi S. Benzerning ishi muhim bosqich edi. Benzer shuni ta'kidladiki, gen - bu nukleotidlar ketma-ketligi, u rekombinatsiya va mutatsiyaning qismlarga bo'linmaydigan birligi emas. Bakteriyalar va faglardagi genetik tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, ularning avlodlari sonining ko'pligi sababli, ozgina miqdorda ($\approx 0.0001\%$) gen ichida rekombinatsiya borligini payqash imkonini berdi, bu esa genlarning qismlardan iboratligini tasdiqladi.

S. Benzer rekombinatsiya birligini *rekon* va mutatsion birligini *muton* deb atadi. Keyinchalik, muton va rekon bir juft nukleotidlarga mos kelishi ko'rsatilgan. S. Benzer *sistron* deb atagan genetik funksiyaning birligi gen tushunchasiga mos keladi, shuning uchun bu atama deyarli qo'llanilmay qo'ydi (ba'zan Sistron atamasi genetikada gen tushunchasining sinonimi sifatida ular funksional ma'nosini ta'kidlamoqchi bo'lganlarida ishlatiladi). S. Benzerning: "Genlar - bu irsiyat atomlari", - degan so'zlari hamon juda mashxurdir.

Zamonaviy gen nazariyasi J. Vatson tomonidan "genning molekulyar biologiyasi" deb nomlangan yangi yo'nalishga muvofiq shakllandi (1978). Genning murakkab tuzilishini o'rganish viruslar, bakteriyalar, zamburug'lar, yuqori eukaryotlarda olib borildi. Ushbu tadqiqotlar nimani ko'rsatdi?

Klassik genetikaning "bitta gen - bitta protein" degan asosiy printsipli jiddiy ravishda qayta ko'rib chiqildi. Soddashtirilgan shaklda gen deb bitta polipeptid zanjirini kodlaydigan, boshlang'ich va to'xtash signallari o'rtasida joylashgan nukleotidning ketma-ketligi tushunilar edi. Keyinchalik, turli xil RNKlarni kodlovchi genlar aniqlandi, va ta'rifga ko'proq aniqlik kiritish zaruriyati tug'ildi. Ammo yangi kashfiyotlar yangi qiyinchiliklarni keltirib chiqardi. Molekulyar genetik qancha rivojlangan bo'lsa, «gen» tushunchasiga aniq ta'rif berish shunchalik qiyin bo'ldi.

Viruslar genlarni o'rganilishi kutilmagan natija berdi. 1977-yilda F. Senjer ϕ X174 bakteriofagida umumiy nukleotidli hududlari mavjud bo'lgan "bir-birini yopib qo'yadigan" genlarni kashf etdi. Bakteriofag ϕ X174 bitta xalqali DNK shaklida bo'ladi va E. coli (ichak tayoqchasi) hujayralarini yuqtiradi. So'ngra, boshqa organizmlarning, shu jumladan odamlarning genomlarida "bir-birini yopib qo'yadigan" genlar aniqlandi. Ba'zida hatto bitta genning ichida mutlaqo boshqa, kichikroq - «gendagi gen» mavjud bo'lgan variantlar ham uchraydi.

Shuni ta'kidlash lozimki, "bir-birini yopib qo'yuvchi" genlarda har bir nukleotid bitta kodonga tegishli, ya'ni bir xil nukleotidlar ketma-ketligidan turli xil o'qilish maydonchalari mavjud. Shunday qilib, ϕ X174 fagida shunday DNK molekulasi qismi borki, u bir vaqtning o'zida uchta genning tarkibiga kiradi. Ammo bu genlarga mos keladigan nukleotidlarning ketma-ketliklari har biri o'ziga xos doirada o'qiladi. Shuning uchun, genlar kodni "yopib qo'yishi" haqida gapirish noto'g'ri.

Agar viruslar genetik materiallarning bunday tashkil etilishi ularning genomlarining kichik ma'lumot imkoniyatlaridan tejamkor foydalanishga imkon bersa, eukaryotlarning ulkan genomlaridagi "bir-birini yopib qo'yish" ning ma'nosi to'liq tushunilmaydi. Ehtimol, bu rol ikki deyarli komplementar (bir-birini to'ldiruvchi) RNK hosil bo'lishi gen faoliyatini tartibga solish bilan bog'liqdir. Bunday RNK molekulalari ikki zanjirli (DNK KABI) tuzilmalarni yaratib, translyatsiya jarayonini to'xtatib qo'yishga qodir. Bunday "joyni tejashning" o'ziga xos salbiy ta'siri mavjud, chunki bitta mutatsiya bir vaqtning o'zida ikki yoki undan ortiq genni "ishdan chiqarishi" mumkin.

1977 yilda bo'lajak Nobel mukofoti sovrindorlari R. Roberts va F. Sharp tomonidan namoyish etilgan, ko'pchilik eukariotik organizmlar genlarining "mozaikasimon" tuzilishi shov-shuvli kashfiyot bo'ldi. Gen tuzilishida ekzonlar - polipeptidning tuzilishini kodlovchi genning qismlari va intronlar - polipeptidning tuzilishini kodlamaydigan gen qismlari ajratila boshlandi. Ekzon va intron atamalarini W. Gilbert (1981) taklif qilgan. Genlar ichidagi intron-ekzon o'tishlarining soni juda katta farq qilishi mumkin.

Odam genomida ba'zi genlarda 3-10 shunday o'tishlar mavjud, boshqalarida esa yuzdan ortiq. Masalan, kollagen genida 118 ekson mavjud. O'lchovining o'zgaruvchanligi ko'proq intronlarga xosdir (masalan, odam genomi intronlarida - 14 dan 150 000 nukleotidlar

juftligigacha). Ba'zi bir eukariotik genlar uchun ekzonlar ular uzunligining ozgina qismini tashkil qiladi. Odamda faqatgina yakka genlar, shu jumladan barcha giston va mitoxondrial DNK genlarida, intronlar bo'lmaydi. Intronlarning roli to'liq tushunilmagan. Ehtimol ular genetik rekombinatsiya jarayonlarida, shuningdek genlar ekspressiyasini tartibga solish jarayonlarida ishtirok etadilar.

Molekulyar biologiya sohasidagi keyingi tadqiqotlar "gen" atamasiga aniqlik kiritishni yanada murakkablashtirdi. Eukariotlar genomlarida ulkan regulyator (yani tartibga soluvchi) qismlar aniqlandi. Gen atrofidagi regulyator qismlarni u bilan bog'lash yoki "gen" tushunchasida faqat transkripsiya joyini qoldirish kerakmi - bu yerda genetiklar bir fikrga kela olishmadi. Muammo shundaki, regulyator qismlar transkripsiya birliklari doirasidan o'n minglab nukleotid juftligi masofasida bo'lishi mumkin. Bundan tashqari, bir xil regulyator qismlar turli xil genlarga "xizmat ko'rsatishi" mumkin.

2.2. Pog'onali allelomorfizm. Soxta-allelizm

A.S. Serebrovskiy maktabi tomonidan o'tkazilgan tadqiqotlarda drosophila pashshasi tanasidagi tukchalar sonining kamayishiga olib keladigan *scute-achaete* genining mutatsiyalari o'rganildi. Bundan biroz oldin, olimlar rentgen nurlari kuchli mutagenik ta'sirga ega ekanligini aniqladilar; shu tufayli juda ko'p turli xil mutatsiyalarni tezda olish imkoniyati paydo bo'ldi.

Shu tarzda olingan *scute-achaete* genining bir necha mutatsiyasini o'rganish xromosomaning bir xil lokuslarida joylashgan mutatsiyalar mutlaqo bir xil fenotipik namoyon bo'lmasligi ma'lum bo'ldi (masalan, bitta holatda drosophilaning qornida va boshida joylashadigan tukchalar soni kamaygan, ikkinchisida - faqat qorinda va x.k.). Buni ko'p sonli allelomorfizm fenomeni deb hisoblash mumkin edi. Ammo, geterozigotlarda bu allellar orasidagi g'ayrioddiy munosabatlar ularning mutlaqo yangi xususiyatini aniqlashda yordam berdi.

Mutantlar chatishtirilganda, dominant-retsessiv munosabatlar bu yerda to'liq namoyon bo'lmadi. Naslda o'zgarishlar faqat ota-ona tanasining o'zgargan qismlarida namoyon bo'ldi (yuqoridagi misolda, faqat qorindagi tukchalar). Ota-onalardan faqatgina birida o'zgargan qismlardagi tukchalar avlodlarida odatiy ravishda rivojlandi. Nasllanish

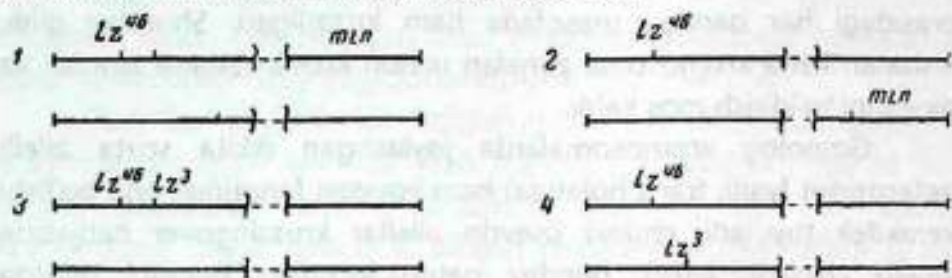
shunday tarzda o'tdiki, xuddi avlod "qorindagi tukchalar" bo'yicha gomozigot va "boshdagi tukchalar" bo'yicha geterozigot bo'lgandek. Biroq, bu xromosomaning bir qismida joylashgan bitta gen edi. Shunda, bu gen bir-biriga o'xshash funksiyaga ega bo'lgan hududlardan iborat deb taxmin qilindi. Ularning har biri Drosophila tanasining ma'lum bir qismidagi belgilarning rivojlanishini boshqaradi va mustaqil ravishda mutatsiyaga uchraydi. Bu hodisa **pog'onali allelomorfizm** deb ataladi.

Ushbu ma'lumotlarga asoslanib, A. S. Serebrovskiy "genning markaziy nazariyasini" yaratdi. Ushbu nazariyaga ko'ra, butun gen (yoki bazigen) har biri o'xshash funksiyaga ega bo'lgan alohida bo'limlardan - markazlardan, yoki transgenlardan iborat bo'lishi mumkin. Bazigen ichidagi transgenlar orasidagi allel aloqalar alohida funksional jihatdan farq qiluvchi genlar orasidagi munosabatlar bilan bir xil; bir mutatsiya boshqa transgenlarga ta'sir qilmasdan faqatgina birining faoliyatini buzishi mumkin.

Shu tariqa, ushbu tadqiqotlar Morganning gen tabiati haqidagi ikkita muhim qonunini shubha ostiga qo'ydi: gen mutatsiya paytida to'liq o'zgaradigan birlikdir va funksional jihatdan bo'linmaydigan birlikdir degan tushunchalarni. Bir necha yil o'tgach, gen - bu krossingover birligi degan qoida ham qayta ko'rib chiqildi. Bunga soxta-allelizm hodisalarini o'rganish sabab bo'ldi.

Soxta-allelizm birinchi marotaba Drosophila pashshasida kashf etilgan. Pashshalar xromosomasining ma'lum bir hududida joylashgan va barcha mutantlar uchun fenotipik jihatdan bir xil namoyon bo'ladigan *lozenge* mutatsiyasilik (ko'z fasetkalari tuzilishidagi o'zgarish) pashshalar chatishtirilganida, avlodda mutant organizmlar bilan bir qatorda yovvoyi genotipga ega bo'lgan Drosophilalarning ma'lum miqdori paydo bo'lgan. Bu hodisani faqat shu bilan izohlash mumkin ediki, mutatsion o'zgarishlar bir xil genning ikkita, qo'shni bo'lsada, lekin turli hududlariga ta'sir qilgan. Ularning orasida krossingover bo'lib o'tdi va rekombinatsiya natijasida yovvoyi turdagi xromosoma tiklandi. Shunday qilib, fenotipik jihatdan bir xil namoyon bo'ladigan, ammo krossingover yo'li bilan ajratiladigan mutatsiyalar mavjud bo'lishi mumkin (ya'ni, genning yaqin joylashgan bo'lsa ham, turli xil nuqtalari). Ilgari allellar mutlaqo bir xil hududlarni egallaydi, deb hisoblangan. Shu sababli, bir hil fenotipga ega bo'lgan, ammo

krossingover natijasida rekombinatsiyaga uchraydigan mutantlar uchrashi hodisasi soxta allelizm deb nomlandi.



Rasm 1. Sis-trans testi. Drosofilaning I xromosomasida joylashgan ikkita gen sxematik tarzda ko'rsatilgan: chap tomonda lozenge geni (ko'zning rivojlanishini boshqaruvchi) va o'ngda miniature geni (qanotlarning rivojlanishini boshqaruvchi). Genlar orasidagi masofa taxminiy. 1 va 2-sxemalarda, ushbu mutatsiyalar bir xil xromosoma (sis pozitsiyasi, 1-sxema) yoki turli xil (trans pozitsiyasi, 2-sxema) bo'lishidan qat'i nazar, ushbu ikkala genning mutatsiyalariga ega geterozigotaladar yovvoyi tur fenotipi namoyon bo'ladi. 3 va 4-sxemalarda bir xil lozenge genining ikkita mutatsiyasi ko'rsatilgan (46 va 3 - mutatsiyalarning tartib raqamlari). Bunday holda, mutatsiyalar bitta gen ichida joylashganida, geterozigot faqat yovvoyi turda, mutatsiyalar sis holatida bo'lganda ishlaydi (3-sxema). Trans holatida (4-sxema) u mutant fenotipni beradi.

Geterozigotaning juda yaqin masofada joylashgan gen hududlari o'rtasidagi munosabatlar alohida genlar o'rtasidagi munosabatlarga o'xshamaydi. Soxta-allelizm fenomeni kashf qilinishidan oldin, gomolog xromosomalarida ikki juft allel genlariga ega geterozigot organizm (har bir juftning a'zolaridan biri o'zgarishsiz qolgan, boshqasi mutatsiyaga uchragan) har doim yovvoyi fenotipga ega bo'lib chiqqan. Bu, shuningdek, o'zgarmagan genlar bir gomolog xromosomada, ularning mutatsiyaga uchragan allellari boshqa tomonda ("tsis" deb ataladigan holat) joylashganida, shunda allel juftlari bir biriga ko'ndalang joylashgan, ya'ni har bir gomolog xromosomada mutatsiya qilingan va buzilmagan gen bo'lgan, bu trans pozitsiya deb nomlanadi (1-rasm). Trans pozitsiya holatida, har bir xromosoma mutatsiyaga uchragan zonaga ega bo'ladi; ammo, geterozigotda gomolog xromosomaning buzilmagan hududi "har ikkalovi uchun ishlaydi" va xromosomalar bir-birini funksional jihatdan to'ldiradilar.

Ikki juft gen o'rtasidagi komplementarlik (yoki bur-birini to'ldirish) munosabatlari bu juftliklar orasidagi, hatto qo'shni genlar orasidagi har qanday masofada ham kuzatilgan. Shunday qilib, nisbatan katta xromosoma zonalarini uchun krossoverlarni ajratish va bir-birini to'ldirish mos keldi.

Gomolog xromosomalarda joylashgan ikkita soxta alleli geterozigot (yani, trans holatida) ham yovvoyi fenotipga ega bo'lishi kerakdek tuyuladi, chunki psevd allellar krossingover natijasida ajralib chiqadi. Biroq, bunday geterozigotning fenotipi odatda o'zgaradi. Shunday qilib, gen ichidagi aloqalar genlar orasidagi aloqalardan komplementarlik yo'qligi bilan farq qildi.

Ushbu qonuniyatlarga asoslanib, Lyuis "tsis-trans" testini taklif qildi, natijada bitta gendagi ikkita mutatsion o'zgarish, aniqrog'i, bitta funksional birlik ichida yoki turli genlarga tegishli ekanligi to'g'risida qaror qabul qilish imkoniyati paydo bo'ldi. Agar geterozigotda tsis yoki trans holatida joylashgan ikkita mutatsiya yovvoyi fenotipning rivojlanishiga imkon bersa, u holda bu mutatsiyalar turli genlarga zarar yetkazadi. Agar tsis holatida joylashgan ikkita mutatsiya yovvoyi fenotipning rivojlanishiga imkon bersa va trans pozitsiyada o'zgargan fenotipning rivojlanishiga olib keladigan bo'lsa, unda ular bir xil funksional birlikning ikkita qismini egallaydi, garchi ushbu joylarni kesib o'tish orqali ajratish mumkin bo'lsada (1-rasm).

Tsis-trans testida aniqlangan eng qiziqarli xususiyat bu bitta funksional birlikning bo'limlari o'rtasidagi o'ziga xos munosabatlar edi. Lyuis, shuningdek, K. Offerman bu munosabatni quyidagicha izohlashdi. Agar gen tomonidan ishlab chiqarilgan yakuniy mahsulot ketma-ket reaksiyalar natijasida paydo bo'lgan deb taxmin qilsak, unda keyingi reaksiyani boshlash uchun avvalgisining mahsuloti kerak bo'ladi. Bunday reaksiyalar zanjiri faqat xromosoma yuzasida sodir bo'ladi: oraliq mahsulotlar ham sitoplazma ichiga tarqalib keta olmaydi yoki reaksiya xromosoma yuzasida reagentlar bilan bevosita aloqa qilishni talab qiladi. Shuning uchun, funksional birlikning faoliyati xromosomaning tegishli hududining uzluksizligini talab qiladi va funksional birlik ichida komplementar munosabatlar mavjud emas. Bu aloqalar faqat funksional birliklar o'rtasida vujudga keladi, ularning har biri sitoplazmaga kiradigan to'liq mahsulot ishlab chiqaradi.

2.3. Gen xususiyatlari

Yuqori organizmlarda genning tuzilishini va funksiyasini o'rganish uchun olib borilgan uzoq muddatli tadqiqotlar natijalarini berdi va natijalarni quyidagicha umumlashtirish mumkin:

Gen bu ma'lum bir belgining rivojlanishini boshqaruvchi xromosomaning bir qismidir. Gen ma'lum bir uzunlikka ega va bir necha nuqtalarda zarar yetkazilishi mumkin, bu esa ularni krossingover orqali ajratib turadigan mutatsiyalar mavjudligi bilan tasdiqlanadi. Gen diskretidir, chunki uning alohida bo'limlari biroz farq qilishi mumkin va ayni paytda ixchamdir, chunki ularning birgalikdagi faoliyatida ma'lum bir bo'ysunish mavjud. Gen barqaror, mutatsiyalar bo'lmasa, u avloddan-avlodga o'zgarishsiz o'tadi. Bitta gen bitta belgining yoki butun belgilar guruhining namoyon bo'lishini boshqarishi mumkin. Bitta genning ko'p martali ta'siri pleyotropiya deb ataladi.

Odamlarda genning pleyotrop ta'siridan kelib chiqadigan irsiy kasalliklar ma'lum. Masalan, araxnodaktiliya (o'rgimchak barmoqlari) yoki Marfan sindromi. Ushbu kasallikda ko'z gavhari tuzilishining buzilishi, aortaning anormalligi, shuningdek uzun barmoq va oyoq-qo'llar kuzatilishi mumkin.

Pleyotropiya birlamchi va ikkilamchi bo'lishi mumkin. Birlamchi pleyotropiyada gen bir vaqtning o'zida bir nechta ta'sir ko'rsatadi. Shunday qilib, Hartnep sindromida gen mutatsiyasi triptofanning ichakda susayishiga va buyrak naychalarida reabsorbsiyasiga olib keladi, ichak va buyrak epitelial hujayralarining membranalari shikastlanadi

Ikkilamchi pleiotropiyada, bitta belgi boshidanoq paydo bo'ladi, undan keyin bosqichma-bosqich ko'plab belgilar paydo bo'ladi. Ikkilamchi pleyotropiyaning misoli - o'roqsimon hujayrali anemiya va fenilketonuriya kabi kasalliklar. Dastlab g'ayritabiiy protein paydo bo'ladi, keyinchalik bu boshqa patologik jarayonlarning rivojlanishiga olib keladi.

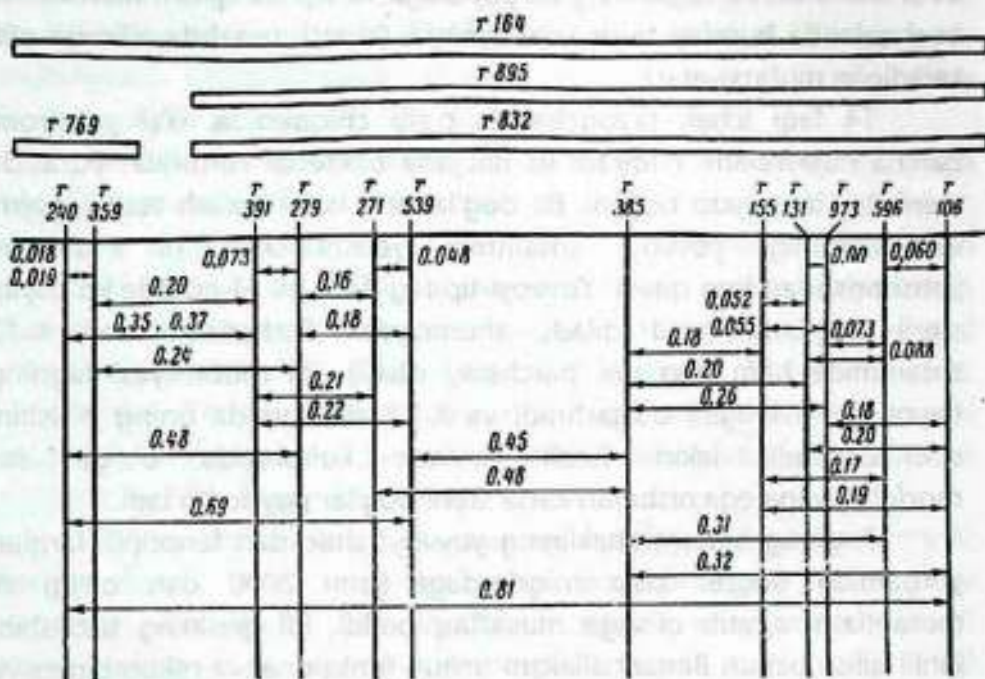
Genlar alternativ variantlar - allellar shaklida mavjud bo'ladi. Masalan, inson gemoglobininin turli xil variantlari mavjud: HBA, HBC ning mutant shakllari, HBS. 6-pozitsiyada HBA tarkibida glutamin kislotasi mavjud, HBSda esa glutamin kislotasi o'miga valin, HBC da - lizin.

HBC va HBS ning Gomozigot holatlari og'ir anemiyaga olib keladi. HBA / HBS bilan o'roqsimon hujayrali anemiya rivojlanadi. Ushbu gemoglobinlarning sintezi allel genlar tomonidan boshqariladi. Genotipda ikkita turli xil allellarning mavjudligi gemoglobin polipeptidining 2 xil shakllanishiga olib keladi. Boshqacha aytganda, ikkala allel ham o'z vazifalarini bir xil darajada namoyish etadi. Bunday genetik holat **kodominantlik** deb ataladi.

Dominantlik nisbiy xarakterga ega bo'lishi mumkin, masalan yuqori ko'z qovog'i bilan o'ralgan teri mo'g'uloid irqiga mansub odamlarda ko'zlarning shakli mug'uloid bo'lib, belgi dominantdir, negroidlarda esa bu belgi retsessivdir.

Genning keyingi xususiyati bu uning ta'sir qilish dozalari. Ushbu xususiyat tufayli gomozigotlar va geterozigotlarda belgining har xil namoyon bo'lishi kuzatiladi. Shunday qilib, bir qator xromosoma kasalliklari ma'lum bir genlar dozasi o'zgarishi natijasidir. Masalan, Shereshevskiy-Tyorner sindromida, gen dozasi yarmi yetishmasligi, Daun sindromida - dozani uch baravar oshishi kuzatiladi.

Genlarning xususiyatlari - bu ekspressivlik va penetrantlik. Ekspressivlik - bu genning fenotipik namoyon bo'lish darajasi. Masalan, polidaktilyada ikkala yoki bitta qo'lda barmoqlar soni ko'payishi mumkin. Penetrantlik - bu bir genning fenotipik namoyon bo'lishining ko'p uchrashi, foiz bilan ifodalanadi. Masalan shved genetiklarining fikriga ko'ra, shizofreniyaning ba'zi shakllari autosom-dominant ravishda nasllanadi. Shu bilan birga, gomozigotlarda penetrantlik 100% ni, geterozigotlarda esa - 20% ni tashkil qiladi. Yana bir misol, retinoblastoma va podagra (dominant turda nasllanadi) penetrantligi 60% ni tashkil qiladi. Bundan kelib chiqadiki, ushbu kasalliklarning genlariga ega bo'lgan 100 kishidan faqat 60 kishi kasallikka uchraydi.



Rasm 2. T4 fagingning r 164 qismni, r II hududidagi mutatsiyalarning xaritasi. R 164 bo'lim - bu butun hududning kichik r II qismi; tepasida mutatsiyalar raqamlari ko'rsatilgan (masalan, r 385; r 131). Strelkalar ustidagi raqamlar mutatsiyalar orasidagi rekombinatsiyaning foizini ko'rsatadi. Xaritadagi yuqoridagi to'rtburchaklar sezilarli darajada mutatsiyaga uchraydi - deletsiya.

2.4 Prokariotik genomning tuzilishi

1950-yillarning oxirida S. Benzer bir qator tajribalarni o'tkazdi, ularning natijalari shunchalik jiddiy ediki, ular gen tuzilishi haqidagi g'oyalarni sezilarli darajada o'zgartirishga majbur qildi. U bitta genning ko'p miqdordagi mutatsiyasi- Ichak tayoqchasi, yani Escherichia coli da parazitlovchi T4 fagingning rII (inglizcha *rapid lysis* yani tez parchalovchi) genini o'rgangan (2-rasm). Ushbu gen, aksariyat fag genlari kabi, ushbu fag naslining replikasiyasi va ko'payishi uchun javobgardir. Ba'zi bir mutatsiyalar naslining paydo bo'lishiga to'sqinlik qilishi mumkin (o'limga olib keladigan mutatsiyalar), ba'zi mutatsiyalar

ba'zi sharoitlarda faglarning ko'payishiga to'sqinlik qilishi mumkin va boshqalarida bunday ta'sir ko'rsatmaydi (shartli ravishda o'limga olib keladigan mutatsiyalar).

T4 fagi ichak tayoqchasida o'sib chiqqanida, o'zi yuqtirgan barcha hujayralarni o'ldiradi va natijada bakterial kulturalar yuzasida steril dog'lar paydo bo'ladi. Bu dog'larning hosil bo'lish tezligi, hajmi va shaffoqligi yovvoyi shtammni yetishtirishda rll mutantini yetishtirishdan farq qiladi. Yovvoyi tipdagi f4 T (rll +) odatda ko'payib, steril dog'larni hosil qiladi, shuningdek Escherichia coli K-12 shtammida ham (fag uni parchalay oladi). Rll mutatsiyasi fagning hayot davomiyligini o'zgartiradi va K-12 shtammida uning o'sishini sekinlashtiradi, lekin E.coli yovvoyi kulturasida o'ziga xos morfologiyaga ega nisbatan katta steril dog'lar paydo bo'ladi.

Fagning mutant shaklining yovvoyi shaklidan fenotipik farqlari yordamida Benzer ko'p miqdordagi (jami 2000 dan ortiq) rll mutantlarni ajratib olishga muvaffaq bo'ldi. Rll genining tuzilishini tahlil qilish uchun Benzer allelizm uchun funksional va rekombinatsiya testlaridan foydalangan. U mutantlarning juft yo'nalishli mutatsiyalarini amalga oshirdi, yovvoyi E. coli shtammni T4 fagining ikki xil mutant shakli bilan bir vaqtning o'zida yuqtirdi, natijada faglar geni tomonidan vaqtincha diploidiya holati E.coli hujayralarida hosil bo'ldi. Chatishtirish natijalari bo'yicha, tsis-trans testiga ko'ra, ikkita tahlil qilingan rll mutatsiyasining qaysi funksional birliklarga tegishligini - bir xil yoki farqli ekanligini aniqlash mumkin edi.

Agar fagning avlodi K-12 shtammida ko'paygan bo'lsa, tahlil qilingan mutatsiyalar allelik emas va turli funksional birliklarga tegishli edi. Agar K-12 shtammida fagning o'sishi bo'lmasa, u holda mutatsiyalar allel, ya'ni xuddi shu funksional guruhga tegishli edi.

Olingan natijalarga asosanib, xulosa qilish mumkinki, rlla va rllb mutatsiyalari (K-12 shtammida birgalikda o'stirilganda o'smadi) allel emas, ya'ni ular bitta funksional birlikka tegishli bo'lib, rlla va rllb, rllb va rlls bir-birini to'ldiruvchi, ya'ni har xil funksional birliklarga tegishli.

Shu tarzda 2000 mutantni o'rganish uchun 2 millionga yaqin o'zaro chatishtirish kerak bo'lardi, bu, albatta, juda mashaqqatli ish. Shu sababli, Benzer yovvoyi turga qaytmagan mutantlarni chatishtirdi. Ular deletsiyalar bo'lib chiqdi. Mutantlarni ajratish juda oson, chunki ular K-12 shtammida qat'iy steril dog'lar hosil qilmaydi, ya'ni ularda

xromosomaning bir yoki boshqa bo'lagi yo'qligi sababli teskari mutatsiyalar hosil qilmaydi. Tahlil qilingan mutatsiya bilan bunday mutatsiyani chatishtirganda yovvoyi turdagi rekombinantlar bitta holatda paydo bo'lishi mumkin, boshqasida esa – yo'q.

Bu birinchi holatda tahlil qilingan mutatsiya deletsiya hududiga tegishli emasligi, ikkinchisida u bilan mos kelishi va shuning uchun deletsiya bilan bir xil funksional guruhga tegishli ekanligi bilan izohlandi. Ustma-ust deletsiya deb ataladigan usuldan foydalanib, Benzer u kashf etgan barcha mutatsiyalar rII geniga tegishli ekanligini va chiziqli tartibda joylashganligini aniqladi. Tsis-trans testi, shuningdek, T4 fag xromosomasining rII mintaqasi ikkita funksional mustaqil bo'linmadan - Benzer sistronlar deb nomlangan A va B guruhlardan iboratligini ko'rsatdi.

Sistron xromosoma funksiyasining birligi, ya'ni komplementarlik testiga ko'ra, faqat bitta funksiyani boshqaradigan xromosoma segmenti. Boshqacha qilib aytganda, sistron xromosoma hududi bo'lib, uning ichida mutatsiya trans pozitsiyasida paydo bo'ladi. RII genining A va B funksional guruhlari bir-birini to'ldiradi, ya'ni o'zaro ta'sir qilganda, T4 fag K-12 shtammining hujayralarida ko'payish qobiliyatini oladi. Agar funksional guruhlardan birida inaktivatsiya qilinadigan mutatsiya yuzaga kelsa, to'laqonli faol oqsil hosil bo'lmaydi.

2.5. O'lchovlar, halqasimon xromosoma, episomalar

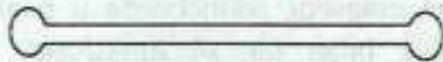
1956-yilda F.Yakob va E.Volman bakterial xromosomalarni tuzilishi uchun halqa modelini taklif qilishdi. Prokariotik genomlarning tuzilishini irsiy va fizik usullar (elektron mikroskopiya, pulsatsiya qiluvchi sohadagi elektroforez va boshqalar), keyinchalik esa genomga oid sikvenslash orqali o'rganish shuni ko'rsatdiki, ko'pgina prokariotik genomlar dumaloq ikki qatorli DNK molekulalaridan iborat. Chiziqli xromosomalar ba'zi bakteriyalarda ham mavjud edi, ammo ularning tuzilishi maxsus terminalli ketma-ketliklarga, telomerlarga ega bo'lgan va ko'payish uchun telomeraza ishlatadigan eukariotiklardan farq qiladi.



Halqasimon xromosoma



Uchlari yopiq bo'lmagan chiziqli xromosoma



Uchlari yopiq bo'lgan chiziqli xromosoma

3-rasm. Prokariotik xromosomaning tuzilishi.

Eukariotlardan farqli o'laroq, bakteriyalar boshqa mexanizmlarni qo'llaydilar (3-rasm): chiziqli xromosomalari bo'lgan streptomitsetalarda replikatsiyani boshlash uchun 3'-OH chetining erkinligini ta'minlovchi oqsillar 5'-uchlariga kovalent tarzda birikadi. *Borrelia spiroxetalarida* kovalent yopiq chetlarga ega chiziqli xromosomalarning yana bir turi topilgan. Ba'zi bakteriyalar asosiy halqa xromosomasidan tashqari qo'shimchasiga ega. Shunday qilib, *Vibrio cholera* bakteriyasida ikkita halqa xromosomasi, fitopatogen bakteriyada *Agrobacterium tumefaciens*da esa bitta halqa va bitta chiziqli xromosoma aniqlandi. Arxeiya genomlarida bitta halqali xromosoma bo'ladi. Lekin ikki halqa xromosomalarni o'z ichiga olgan arxeiya *Haloarcula marismortui* bndan mustasno.

Nukleotidlarning to'liq genom sikvensi (ketma-ketligini aniqlash) shuni ko'rsatdiki, bakteriyalarning genomlari kattaligi *Mycoplasma genitalium*da 0,58 million nukleotid juftlikka teng, *Bradhyrhizobium ponicum*da 9,2 million nukleotid juftlikka teng (1-jadval).

Oqsillar va RNKni kodlaydigan xromosoma genlaridan tashqari, prokariotlar genomiga boshqa genetik tuzilmalar ham kiradi (Lyuin, 2011): ko'chuvchi elementlar, plazmidlar, integratorlar, profaglar, CRISPR lokuslari va turli boshqaruvchi elementlar.

Ko'chuvchi elementlar - bu DNKning xromosoma ichida ko'chib o'tishga (transpozitsiya) yoki boshqa hujayraga o'tishga qodir bo'lgan qismlari. Bular tarkibiga, ularning ko'chishi uchun zarur bo'lgan fermentlarni (transpozazalar) kodlaydigan insetsion elementlari (IS elementlari), transpozonlar, shuningdek transpozaza genlari

bo'lmagan miniatyurali invertirlangan takrorlanadigan elementlar (MITE) kiradi. IS elementlar tuzilishining o'ziga xos xususiyati shundaki, ularning uchlarida qisqa invertsiyaga uchragan takrorlanishlar mavjud (5-rasm).

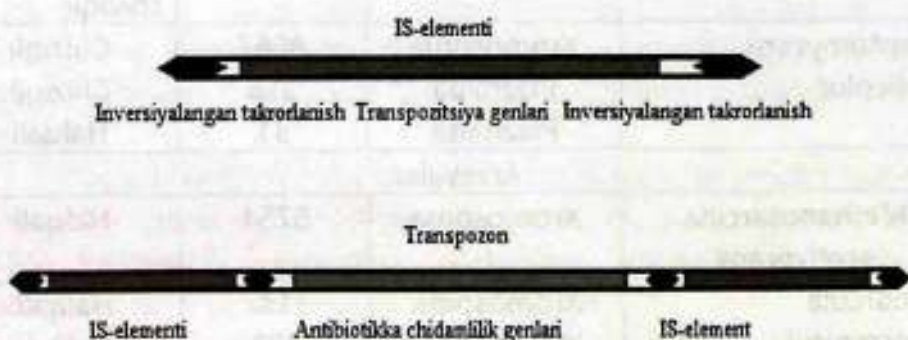
Bazi prokariotlar genomining o'lchamlari va tuzilishi

Bakteriya yoki arxeiya turi	Genom tarkibi	O'lchami (ming nj)	Shakli
Bakteriyalar			
Escherichia coli K12 (MG1655)	Xromosoma	4640	Halqali
Bradyrhizobium japonicum	Xromosoma	9207	Halqali
Mycoplasma genitalium	Xromosoma	580	Halqali
Vibrio cholera	Xromosoma	2941	Halqali
	Xromosoma	1072	Halqali
Agrobacterium tumefaciens	Xromosoma	2842	Halqali
	Xromosoma	2057	Chiziqli
	Plazmida	453	Halqali
	Plazmida	214	Halqali
Borrelia burgdorfei	Xromosoma	911	Chiziqli
	11 Plazmida	9-54	Halqali va chiziqli
Streptomyces coelicolor	Xromosoma	8667	Chiziqli
	Plazmida	356	Chiziqli
	Plazmida	31	Halqali
Arxeyalar			
Methanosarcina acetivorans	Xromosoma	5751	Halqali
Haloarcula marismortui	Xromosoma	3132	Halqali
	Xromosoma	288	Halqali
Nanoarchaeum equitans	Xromosoma	491	Halqali

Transpozonlar – bu “daydib yuradigan” ko’chuvchi genetik elementlardir, 1950–yilda birinchi marta amerikalik olim Barbara Mak Klinton tomonidan o’simliklarda (makkajo’xori) topilgan. Keyinchalik bu elementlarni boshqa amerikalik olimlar J. Bishop va A. Buxoriy mikroorganizmlarda va rus olimi G. Georgiev hayvonlarda (hasharotlarda) topdilar.

Transpozonlar – bu ikki chetidan bir xil IS elementlari (ingliz tilidan Insertion sequences – yani kirituvchi ketma-ketlik) bilan ajratilgan ko’p genli tuzilmalar. Transpozon ko’chirilganda, u “kesib tashlanib” genomning boshqa qismiga o’tkazilishi mumkin, yoki duplikatsiya natijasida asl nusxasi saqlanib qolishi mumkin. Transpozonlar har xil tuzilishga ega bo’lishiga qaramay, ularning barchasining ikkala uchida maxsus nukleotidlar ketma-ketligi mavjud va ularning markaziy qismida transpozaza fermenti sintezi uchun javob beradigan gen mavjud bo’lib, u DNK molekulasining ma’lum bir qismini unda “yopishqoq” chetlar hosil qilgan holda parchalaydi.

Ko’chuvchi elementlarning integratsiyasi (yani genga “kirishi”) nafaqat inaktivatsiyaga (genning “o’chirilishiga”) olib kelishi mumkin, balki qo’shni genlarni “yoqishi” va “o’chirishi” ham mumkin, chunki transpozonlarda transkripsiya promoterlari yoki terminatorlari bo’lishi mumkin. Xromosomaning turli nuqtalaridagi bir xil ko’chuvchi elementlar gomologik bo’laklar bo’lib, ular orasidagi rekombinatsiya genomning tuzilishi o’zgarishiga olib kelishi mumkin.



4 Rasm. Insertion element va transpozonning tuzilishi

Genomlardagi ko'chuvchi elementlarning soni juda katta farq qiladi. Ba'zi genomlarda faol ko'chuvchi elementlar umuman yo'q, boshqalarida esa ularning soni o'nlab bo'lishi mumkin. Masalan, *Sulfolobus solfataricus* arxeiya genomida 200 dan ortiq ko'chuvchi elementlar topilgan, ular bu genomning 11% ini tashkil etadi, lekin bu turning boshqa vakili *Sulfolobus acidocaldarius*ning genomida faol ko'chuvchi elementlar mavjud emas.

Ko'chuvchi elementlar tarkibiga integronlar - integratsiya geni, integratsiya sayti va integratsiya geni qarama-qarshi tomonga yo'naltirilgan targ'ibotchi bilan integral modulni o'z ichiga olgan genetik elementlar kiradi. Ushbu modul tufayli integronlar genomga integratsiyalashishi va o'nlab genlarni o'z ichiga olishi mumkin bo'lgan kasetlarda ko'chma genlarni ekpressiya qila oladilar. Antibiotiklarga chidamlilik genlarini qamrab oladigan integronlar bakteriyalarda antibiotiklarga chidamlilik rivojlanishining omillaridan biridir.

Plazmidlar – bu bakteriyalarda va eng sodda eukariotik hujayralarda xromosomadan tashqari joylashgan genetik elementlar, ular avtonom ravishda ko'payadi. Ko'pincha, ular halqali DNK molekulalaridir, ammo chiziqli xromosomalarga o'xshash plazmidlar ham mavjud. Xromosomalardan farqli o'laroq, plazmidlar "ixtiyoriy" genetik material bo'lib, ularning yo'qolishi hujayralar o'limiga olib kelmaydi. Shu bilan birga, ko'plab katta plazmidlarda hujayra uchun muhim bo'lgan o'nlab va yuzlab genlar kodlanadi, ular ma'lum atrof-muhit sharoitlarida zarur bo'lishi mumkin. Shuning uchun bunday "megaplazmidlarning" xromosomalardan terminologik farqlanishi shartli hisoblanadi.

Ba'zi hollarda plazmidlar bilan olingan yangi belgilar plazmidlarning nomlarini aniqlaydilar. Masalan, *Escherichia* hujayralariga donorlik xususiyatlarini beradigan F-plazmid (inglizcha *fertility factor* - hujayralar hosildorlik koeffitsienti) yoki hujayralarning antibiotiklarga chidamliligini aniqlaydigan plazmid R. Plazmidlarni avtonom ravishda ko'payish qobiliyati ko'payishni boshlash joyi (ori) va zarur oqsillarni kodlaydigan genlar to'plamining mavjudligi bilan ta'minlanadi. Plazmidlar o'zlarining ko'payishi uchun zarur bo'lgan fermentlarning faqat bir qismini o'z ichiga oladi, shu bilan birga hujayraning ko'paytirish apparati tarkibiy qismlaridan ham foydalanadi.

Ba'zi plazmidlar hujayraning xromosomasiga qo'shilib, uning tarkibida episom shaklida ko'payishi mumkin. Bir hujayradagi plazmidlarning nusxalari soni har xil bo'lishi mumkin, bittadan bir necha yuz nusxaga qadar, lekin barcha holatlarda ularning soni tartibga solinadi, chunki plazmid DNKning cheksiz ko'payishi hujayraning o'limiga olib keladi. Plazmid nusxalari sonini boshqarish mexanizmiga ko'ra ikki guruhga bo'lingan. Ba'zi bir plazmidlarda nazorat RNK bilan o'zaro ta'sir qiluvchi "qarshi RNK" yordamida amalga oshiriladi, ularning sintezi ko'payishni boshlaydi (ColE1 plazmid) yoki ko'payish oqsilining gen ifoda etilishini tartibga solish darajasida (plazmid R). Boshqa usul plazmidni ko'paytirishni boshqaruvchi oqsilning ori-mintaqasida takrorlanadigan ketma-ketlik (intron) bilan o'zaro ta'siri orqali ta'minlanadi. "Ortiqcha" nusxalar bilan nusxa ko'chirishni boshlash samaradorligi pasayadi. Hujayra bo'linishida plazmidlar tasodifiy avlod hujayralari o'rtasida taqsimlanishi mumkin. Agar yuqori nusxali plazmidlar uchun barcha plazmidlarning ikkita avlod hujayradan biriga kirish ehtimoli juda kam bo'lsa, unda kam nusxali plazmidlar uchun bu ehtimol juda katta. Masalan, ikki nusxasi bo'linmasdan oldin hujayrada mavjud bo'lgan plazmid uchun tasodifiy yo'qotish ehtimoli 50% ni tashkil qiladi. Shuning uchun evolyutsiya jarayonida kam nusxali plazmidlar uchun ularning populyatsiyasida saqlanishini ta'minlaydigan maxsus mexanizmlar ishlab chiqilgan.

Ulardan birinchisi bo'linish oldidan ko'paytirilgan plazmidlarning avlod hujayralari o'rtasida aniq taqsimlanishi (segregatsion doimiylik). Plazmidni barqarorlashtirishning yana bir mexanizmi plazmid bo'lmagan hujayralarning segregatsiyadan keyingi o'limi hisoblanadi. Ushbu tizimda ikkita gen ishtirok etadi, ularning mahsuloti turg'un toksin va uni faoliyatini to'xtatadigan "antitoksin", uning yemirilish vaqti ancha qisqadir. Plazmidni o'z ichiga olgan hujayralar ikkala komponentni sintez qiladi va yashovchan bo'lib qoladi. Plazmidni yo'qotgan hujayralarda antitoksin inaktivatsiyadan keyin turg'un toksin qoladi, bu ularning o'limiga olib keladi.

Prokariotlar hujayraga tashqaridan kiradigan ko'chuvchi elementlar va viruslar bilan kurashishning bir necha usullarini ishlab chiqdilar. DNKni cheklash-modifikatsiyalash tizimlari samarali DNKni o'ziga xos cheklovli fermentlar bilan ajratib turadi, ularning ta'siridan

DNK metillanishi natijasida o'zgartirilgan hujayralar himoya qilinadi. Ko'pgina bakteriyalar va ko'pgina arxeylarning genomlarida noyob ketma-ketlik bilan bo'shliqlar tomonidan ajratilgan qisqa takrorlanadigan ketma-ketliklar (20 dan 40 nukleotid juftligigacha) joylar topildi. Ushbu klasterlar CRISPR tuzilmalari deb nomlanadi (inglizcha *Clustere Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* - klaster muntazam ravishda intervalgacha bo'lgan qisqa palindromik takrorlanish). Bo'shliq ketma-ketliklar viruslar, plazmidlar va ko'chuvchi elementlardan "tanlangan" deb taxmin qilinadi va CRISPR tuzilmalari roli bo'shliq ketma-ketligiga to'g'ri keladigan ko'chuvchi elementlarning tarqalishiga to'sqinlik qilishdan iborat.

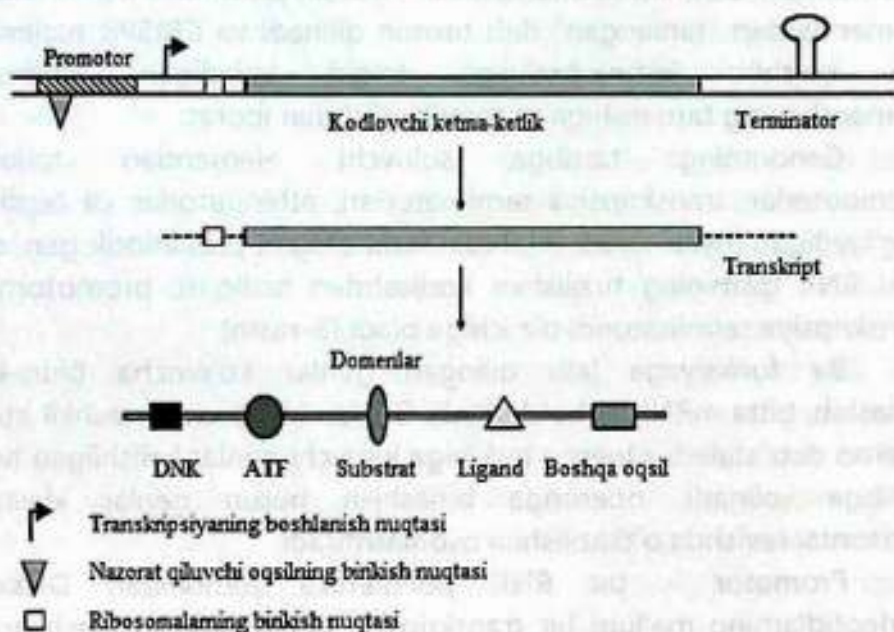
Genomning tartibga soluvchi elementlari tarkibiga promouterlar, transkripsiya terminatorlari, attenuatorlar va oqsillarni bog'laydigan joylar kiradi. Alohida ifoda etilgan prokariotik gen, oqsil yoki RNK qismining tuzilishini kodlashdan tashqari, promotorni va transkripsiya terminatorini o'z ichiga oladi (5-rasm).

Bir funksiyaga jalb qilingan genlar ko'pincha birin-ketin joylashib, bitta mRNKga ko'chiriladi. Genlarning bunday tashkil etilishi operon deb ataladi. Operon tarkibiga kiruvchi genlar kelishilgan holda tartibga solinadi, operonga birlashish butun genlar klasterini gorizontal ravishda o'tkazilishini osonlashtiradi.

Promotor - bu RNK polimeraza tomonidan DNKdagi nukleotidlarning ma'lum bir transkripsiya jarayomini boshlash uchun maydon deb tan olinadigan ketma-ketlik. Promotorlar ikkita konservativ hududga ega, ulardan biri tanib olish uchun zarur, ikkinchisi esa RNK polimerazaga promouterni kuchli bog'lash uchun kerak. Ko'pgina bakteriyalarda, bu transkripsiyaning boshlanish joyidan 35 va 10 nukleotidlar masofasida joylashgan TTGACA va TATAATning konsensusli ketma-ketligi. Genlarning rag'batlantiruvchi hududlarida oqsillarni bog'laydigan tartibga soluvchi joylar - repressorlar yoki transkripsiya aktivatorlari bilan o'zaro ta'sir qiladigan maxsus nukleotid ketma-ketliklar bo'lishi mumkin. Transkripsiyaning boshlanish nuqtasi va boshlang'ich kodon o'rtasida, odatda ribosoma bog'laydigan joy joylashgan bo'lib, ularning ketma-ketligi 16 ribosomali RNKning 3'-uchiga to'g'ri keladi.

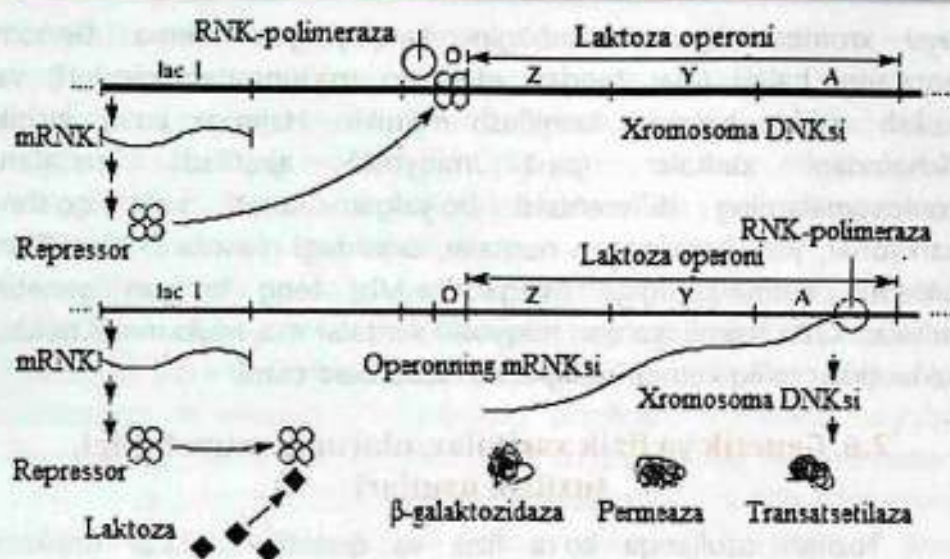
Terminator - gen oxirida transkripsiya tugaganligining signalini (ketma-ketligini) o'z ichiga olgan DNKning bir qismi. Aksariyat

hollarda, terminator ketma-ketliklarida RNK-da zanjir hosil qiluvchi teskari bir necha nukleotidlar mavjud. Transkriptni to'xtatishda attenuatorlar, transkripsiya attenuatorlari ham ishtirok etishlari mumkin. Masalan, E.Colining triptofan operonida triptofanning haddan tashqari ko'payishi sharoitida mRNK sintezi darajasining pasayishini ta'minlaydigan, ya'ni gen ifoda etilishini tartibga soluvchi muhim funksiyani bajaradigan attenuator mavjud.



5-rasm. Prokariotik genning tuzilishi.

Operon modeli birinchi marta 1960-yilda frantsuz biokimyochilari F. Yakob va J. Monot tomonidan laktoza fermentatsiyasi jarayoni misolida ishlab chiqilgan. Laktoza operon tizimida uchta fermentni kodlovchi uchta tarkibiy gen (Z, Y, A) mavjud (7- rasmga qarang). Asosiy ferment β -galaktozidaza.



6 Rasm. Laktoza operonining faoliyati.

Operonni tartibga solish tizimiga promouter, operator va gen-regulyator kiradi. Promouter – bu operator dan oldinda joylashgan va RNK polimeraza fermenti tomonidan "tanib olinadigan" joy, u tarkibiy genlarni transkripsiya qiladi. Fermentning kichik bir qismlaridan biri (δ -zarracha) promouter RNK polimerazasini matritsaga bog'laydigan ma'lum bir nukleotid ketma-ketligini (Pribnov bloki) aniqlaydi.

Agar ferment yonida joylashgan operator tartibga soluvchi gen nazorati ostida ishlab chiqarilgan repressor oqsiliga bog'lanmagan bo'lsa, ferment transkripsiyani boshlaydi. Ushbu aloqaning yo'qligi, hujayrada repressorni bog'laydigan substrat - laktoza mavjudligi bilan bog'liq. Hujayrada laktoza miqdori pasayishi bilan tartibga soluvchi oqsil ajralib chiqadi va operatorga bog'lanib, shu bilan tarkibiy genlarning transkripsiyasini to'xtatadi. Ushbu turdagi tartibga solish manfiy induksiya deb ataladi, chunki Repressorning yo'qligi operonni boshlaydi. Prokariotlarda operonni tartibga solishning boshqa mexanizmlari ham aniqlangan. Masalan, yuqorida ko'rsatib o'tilganidek, triptofan sintezida, u repressiya turida amalga oshirilishi mumkin, bunda oxirgi mahsulotning o'zi (triptofan) korepressor bo'lib, tartibga soluvchi oqsil bilan birgalikda operatorga bog'lanadi va transkripsiyaning oldini oladi.

Genom xaritasi - bu genomda genlarning va boshqa tarkibiy qismlarining bir-biriga nisbatan joylashishini (tartib va masofa) va

qaysi xromosomaga mansubligini aniqlaydigan sxema. Genom xaritalarini hajmi (ular taqdim etadigan ma'lumotlar miqdori) va tuzilish usullari bo'yicha tasniflash mumkin. Hajmiga ko'ra, kichik o'lchamdagi xaritalar (past miqyosli) ajratiladi, masalan, xromosomalarning differentsial bo'yalgan surati yoki qo'shni markyorlar, yani belgilangan nuqtalar, orasidagi masofa 7-10 million nukleotid ketma-ketligiga (megabaza-Mb) teng bo'lgan genetik xaritalar. Katta hajmli (yo'qori miqyosli) xaritalar esa, mukammal holda, nukleotidlar to'liq ketma-ketligini ko'rsatib bera oladi.

2.6. Genetik va fizik xaritalar, ularning muvofiqligi, tuzilish usullari

Tuzilish usullariga ko'ra fizik va genetik xaritalar (birikish xaritalari) ajratiladi. Butun xromosomaning yoki uning segmentining fizik xaritalari genetik materialni to'g'ridan-to'g'ri o'rganish asosida qurilgan va DNKdagi genlarning haqiqiy joylashuvi haqida tasavvur beradi, ularning orasidagi masofa va ularning yon tomonlaridagi belgilar nukleotid juftligi bilan ifodalanadi, bu ularni aniqlash va o'rganishni, shuningdek sikvenslashni osonlashtiradi.

Genetik xaritalari markyor maydonlarining chiziqli joylashuvini ko'rsatadi, ularning orasidagi masofa sM bilan o'lchanadi (santimorgan - rekombinatsiya chastotasining shartli o'lchov birligi). Lokus orasidagi masofa 1% rekombinatsiya chastotasida 1 sM ni tashkil qiladi va jismoniy masofa taxminan 1 Mb (1 million nukleotid jufti) ga to'g'ri keladi. Rekombinatsiya chastotalari va shuning uchun haqiqiy 1 sm uzunlik genomning turli qismlarida o'zgarib turadi, bu esa genetik xaritalarni ishlatishda fizik (haqiqiy) masofa haqida faqat taxminiy ma'lumotlarni olish imkonini beradi.

Qo'llaniladigan usulga qarab, turli xil aniqlik darajalariga ega bo'lgan xromosomalarning fizik xaritalarini olish mumkin. Shunga ko'ra, kichik miqyosli fizik xaritalar ajralib turadi, ular sitogenetik (xromosomal) va transkriptiv (kDNK xaritalari) va keng miqyosli - makrorestriksion va kontig xaritalarini o'z ichiga oladi. Fizik xaritalar butun genom uchun ham, alohida olingan xromosoma uchun ham tuzilishi mumkin. Alohida xromosomalarni oqimdagi xromosomalarni o'lchamlari (oqim sitometriyasi) bo'yicha saralash orqali olish mumkin, shuningdek, gibrid

hujayralar avlodlari (odam-sichqon gibrid hujayralari bo'linish paytida asosan odam xromosomalarini yo'qotadi, natijada faqat bitta xromosoma qoladi, bunday gibrid hujayra ko'payadi va hujayra avlodini saqlab turadi). Agar ma'lum bir DNK parchasini ko'p miqdorda olish kerak bo'lsa, PZR (polizanjir reaksiyasi) va klonlash usullari keng miqyosli xaritalarni yaratishda qo'llaniladi.

Sitogenetik xaritalar genni differentsial bo'yalish usullari bilan aniqlangan xromosoma hududlariga nisbatan joylashishi to'g'risida ma'lumot beradi. Ushbu bo'yash usuli tufayli mikroskopning ko'rish sohasidagi xromosoma "ko'ndalang chizilgan" ko'rinadi. Bo'yalgan qismlarning joylashishi (bendlar, yani chiziqlar) har bir xromosoma uchun o'ziga xosdir. FISH-usulidan foydalanish 2-5 Mb o'lchamdagi sitogenetik xaritalarni tashkil qilish imkonini beradi, va uning interfazali xromosomalar uchun modifikatsiyalangan usuli - 0, 1 Mb gacha. Shunday qilib, FISH usuli yordamida genning joylashishini subsegment va lokus-bendgacha aniqlash mumkin. Masalan, ISCN-1995 tomonidan qabul qilingan sitogenetik nomenklaturasida va marker sifatida ishlatiladigan noma'lum funksiyasi bo'lgan DNK segmentlarining nomenklaturasiga binoan, yozuv 22q1 1.2 (D22S75), gen 22 xromosoma uzun yelkasi 1-chi hudud 1-segmentining 2-subsegmentida joylashtirilganligini anglatadi. Bu D22S75 in situ (yani malum bir holatida) gibridlash - FISH usuli yordamida aniqlangan (D - DNK, 22 - xromosoma raqami, S - noyob marker, 75 - xromosomaning ushbu hududidagi zondning raqami).

Transkripsiya xaritalari kDNK (komplementar, yani qo'shimcha DNK kDNA, inglizcha cDNA) ning xromosomada joylashishi to'g'risida ma'lumot beradi. Bu genlarni aniqlashga imkon beradigan, teskari transkriptazada katalizatsiyalangan reaksiyasida yakuniy mRNK matritsada sintezlangan DNK. U ko'pincha eukariotlar va prokariotlar genlarini klonlashtirish uchun qo'llaniladi, malum bir kasalliklarga javobgar genlarni aniqlashga yordam beradi. kDNA matritsa sifatida mRNK qo'llanilishi yordamida yoki kimyoviy (ma'lum aminokislotalar ketma-ketligidan foydalangan holda) uslub bilan sun'iy ravishda sintezlanadi va fuga bilan situ gibridizatsiyasi yordamida kDNA zondlari bilan belgilanadi. Transkripsiya xaritasini tuzishda yanada istiqbolli usul alohida kDNA klonlarining qisman sekvensiyasiga va o'ziga xos marker saytlarini aniqlashga asoslangan. Bu

ekspressiyalanadigan markyor saytlari eSTS deb nomlangan (STS - ketma-ketlik bilan belgilangan saytlar). eSTS saytining qaysi xromosomaga mansubligini aniqlash uchun monoxromosomal duragaylarning DNKsi yordamida eSTS praymerlari yordamida PZR bilan amalga oshiriladi. Keyinchalik, aniq bir inson xromosomasining faqat alohida qismlari mavjud gibrid hujayralarining DNKsi PZR yordamida klonlashtiriladi va xromosomada eSTSning joylashuvi aniqlanadi. Nurlantirish duragay xaritalarida eSTSni in situ (ma'lum bir joyda) gibridlanishni qo'llash orqali xaritalashni ham amalga oshirish mumkin.

Nazorat uchun savollar:

1. Qanday ilmiy kashfiyotlar molekulyar genetika rivojiga olib keldi.
2. Pog'onali allelomorfizm haqida tushuncha va uning ahamiyati.
3. Soxta allelizm. Uning mohiyati.
4. Viruslar, bakteriofaglardagi genning tuzilishi.
5. Gen nazariyasining asosiy tushunchalari.
6. Genning xususiyatlari.
7. Prokariotik genomning tuzilishi.
8. O'lchovlar, halqali xromosoma, episomlar, F-faktor.
9. Genetik va fizik xaritalar, ularning aniqligi, genetik xaritalarni tuzish usullari.

3-BOB. EUKARIOTIK GENOMNING TUZILISHI

Ko'rib chiqiladigan savollar: Umumiy xususiyatlar. Prokariotik genomdan o'ziga xos farq qiluvchi jihatlari. Genom o'lchovlari va C. kattalik paradoksi. xudbin DNK gipotezasi. Hujayrada genomning bloksimon tashkil etilishini va DNKning kompaktizatsiyasi. Eukariotik genomning asosiy tarkibiy qismlari. DNK reassotsiatsiyasi kinetikasi. Yo'ldosh DNK. Gomopolimer va oddiy takrorlanadigan ketma-ketliklar. Minisatellitli (kichik yo'ldoshli) DNK. Bernardi izoxoralari.

3.1 Umumiy xususiyatlari. Prokariotik genomdan farqlab turuvchi o'ziga xosliklari

Genom - bu xromosomalarning gaploid to'plamidagi genlar majmui. Eukariotik genom prokariotlarga nisbatan ancha murakkab. Eukariotik hujayraning genetik apparati hujayra yadrosi ichida joylashgan, uning ichida esa irsiyatning asosiy tashuvchilari - xromosomalar joylashgan. Xromosomalar soni turlarga xos va ikkitadan (ot askaridasi) minggacha (sodda o'simliklar) o'zgaradi. Eukariotik hujayralardagi DNK miqdori bakteriyalarga qaraganda ancha ko'p. C o'lchov birligii yordamida hisoblanadi - yani gaploid to'plamning xromosomalaridagi, demak genomdagi, DNK miqdori. Turli xil turlarda 104 dan 1011 gacha o'zgarib turadi va ko'pincha turlarning tashkil etilish darajasi bilan bog'liq emas. Inson genomidagi DNK tarkibidan oshib ketgan C ning eng katta qiymatlari ba'zi baliqlar, dumli amfibiyalar va nilufarlarga xosdir.

Eukariotik genomning xususiyatlaridan biri bu DNKning oqsillar bilan tarkibiy va funksional aloqasi. Bu genetik ma'lumotni uzatish jarayonining xususiyatlari va oqsillarning tartibga solish funksiyalariga bog'liq. Hujayralar bo'linishining murakkab jarayoni davomida (mitoz yoki meyoza) axborot hujayradan hujayraga uzatiladi. Interfazdagi avlod hujayralari o'rtasida uni to'liq va aniq taqsimlash uchun DNK miqdorini ikki baravar oshirish jarayoni sodir bo'ladi va bo'linish

(profaza) boshlanishida interfaza xromosomalarining kondensatsiyasi jarayoni sodir bo'ladi. Natijada, xromosomalar ixcham zich jismlar shaklini oladi. Xromosomalarning siqilishi anafazadagi turli qutblarga ajralish paytida chalkashib ketish xavfini oldini oladi. Xromosomalarning ushbu tarkibiy o'zgarishlarida yadro oqsillari - DNKning superspiralizatsiyasini amalga oshiruvchi gistonlar ishtirok etadi. Gistonlar, shuningdek, interfazali xromosomalarning matritsali faolligini tartibga soluvchi rolini o'ynaydi, chunki gistonning xromosoma faoliyat ko'rsatadigan hududi bilan aloqasi uni geteroxromatik holga, ya'ni yuqori spirallangan va shuning uchun faol bo'lmagan holatga keltiradi.

Eukariotik xromosomalar tarkibidagi oqsillarni mavjud bo'lgani sababli, ularning miqdori DNK bilan birga ikki baravar ko'payadi, natijada xromosoma repliksiya jarayoni ancha uzoqroq bo'ladi.

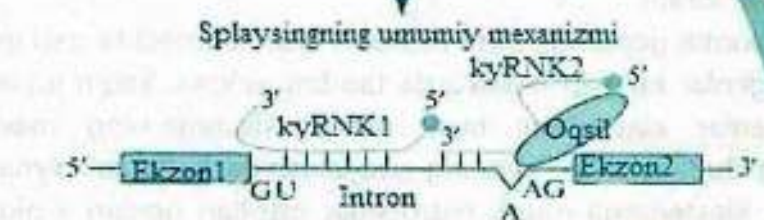
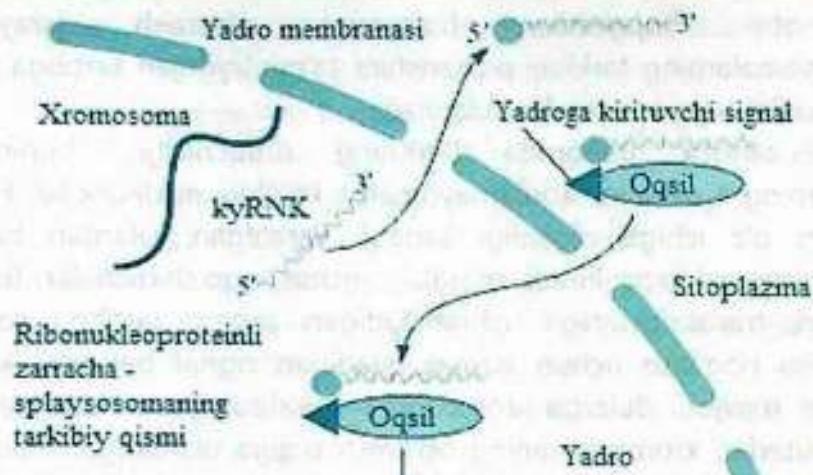
Eukariotik genomning o'ziga xos xususiyati - bu DNKning ortiqchaligi bo'lib, uning miqdori barcha hujayra oqsillarining tuzilishini kodlash uchun zarur bo'lgan miqdordan oshib ketadi. Ortiqchalikning sabablaridan biri takroriy nukleotidlarning mavjudligi. Ularning mavjudligi birinchi marta XX asrning 60chi yillarning oxirlarida paydo bo'lgan. DNK renaturatsiyasi kinetikasini (yakka zanjirlarning qayta birlashishi) o'rganib, amerikalik tadqiqotchilar R. Britten va D. Devidson shunday xulosaga kelishgan. Xozirgi paytda eukariotik DNK tarkibida ikki xil takrorlanishlar mavjudligi aniqlandi - o'rtacha takrorlanadigan nukleotidlar juftliklari va juda ko'p takrorlanadigan. O'rtacha takrorlash o'nlab va yuzlab nusxalar shaklida bo'ladi; ularning o'rtacha hajmi $\approx 300-400$ n.j. Ular to'g'ridan-to'g'ri va inversiyaga uchraga, yani teskari (palindromlar) bo'lishi mumkin. Takrorlanishlar orasida DNKning takrorlanmaydigan bo'limlari mavjud. Yuqori darajada takrorlanadigan n.j. - bu qisqa DNK bo'laklari (o'nlab n.j.) bo'lib, ular juda ko'p nusxada taqdim etiladi. Ba'zi hollarda, ushbu takroriy tarkibiy qismlarning tarkibi butun genomdan farq qiladi, buning natijasida takrorlanishlar ma'lum bir suzuvchi zichlikka ega bo'lgan alohida fraksiyani hosil qilishi mumkin. Ushbu fraksiya yo'ldosh DNK deb ataladi. U hech qachon transkripsiya qilinmaydi va shuning uchun u "jim" deb nomlanadi. Yo'ldosh DNK xromosomalarning geteroxromatik hududlarida: telomerlarda, tsentomera yaqinida, yadrochada joylashganligi aniqlandi. U genetik

ma'lumotni hujayradan hujayraga o'tkazish jarayonida xromosomalarning tarkibiy o'zgarishini ta'minlaydigan tartibga solish funksiyasini bajaradi deb hisoblaniladi.

Eukariotik genomda DNKning ortiqchaligi, shuningdek, oqsillarning tuzilishini kodlamaydigan ko'plab nukleotidlar ketma-ketligini o'z ichiga olganligi sababli yaratilgan. Ulardan ba'zilari genlarning tarkibiga kiradi, masalan, intron - qo'shimchalar. Bundan tashqari, transkripsiyaga uchramaydigan, ammo tartibga soluvchi oqsillarni bog'lash uchun xizmat qiladigan signal beruvchi ketma-ketliklar mavjud. Bularga xromosoma spiralizatsiyasini boshqaruvchi promouterlar, xromosomaning bo'linish o'qiga ulanadigan hududlari va boshqalar kiradi.

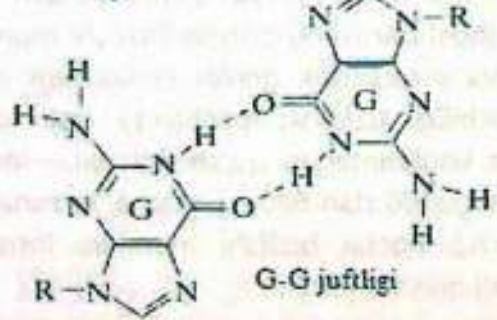
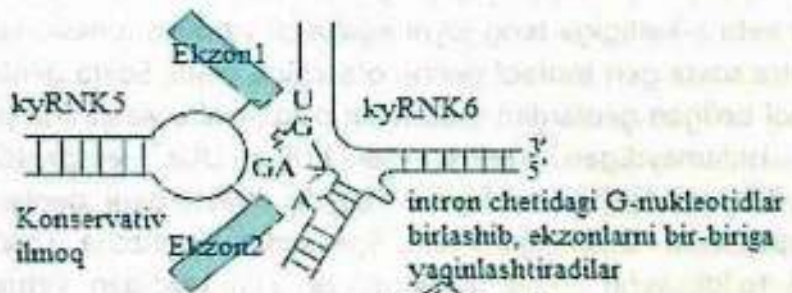
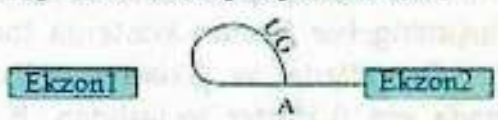
Eukariotik genomda bitta nusxada faqat bir nechta gen mavjud. Aksariyat genlar ko'plab nusxalarda taqdim etilgan. Yaqin joylashgan bir xil genlar klasterlarni hosil qiladi. Klasterlarning mavjudligi genlarning duplikatsiyasi ularning rivojlanishida katta rol o'ynaganini isbotlaydi. Klasterlarga misol: eritrotsitlar oqsillari genlari - globinlar. Gemoglobin - bu 4 polipeptid zanjiridan iborat bo'lgan tetramer: 2 α va 2 β . Zanjirning har bir turi klasterda tashkil etilgan genlar bilan kodlangan. Odamlarda α -klaster 11-chi xromosomada, 16-xromosomada esa β -klaster joylashgan. B-klaster DNKda 50 ming nukleotid ketma-ketligiga teng joyni egallaydi va besh funksional faol gen va bitta soxta gen (nofaol genni) o'z ichiga oladi. Soxta genlar bir vaqtlar faol bo'lgan genlardan mutatsion o'zgarishlar natijasida paydo bo'lgan, ishlamaydigan, relik genlardir. Ular ekspressiyaga uchramaydi (yani faol bosqichga o'tmaydi). Klasterdagi genlar bir-biridan speyserlar bilan ajratilgan. Speyserlar (inglizcha *spacer* - bo'shliqni to'ldiruvchi) - bu transkripsiya qilinmaydigan kiritmalar, ularda ba'zan regulyator (boshqaruvchi) qismlar bo'lishi mumkin.

Eukariotik genlar va prokariotik genlar o'rtasidagi asosiy farq shundaki, ularning ko'pchiligi uzluksiz tuzilishga ega va kodlash hududlaridan - ekzon va kodlanmagan qo'shimchalar - intronlardan iborat. Ekzonlarning uzunligi 100 dan 600 n.j. gacha, intronlar esa bir necha o'ndan minglab n.j. gacha bo'lishi mumkin. Intronlar gen uzunligining 75% ni tashkil qilishi mumkin.



pro-mRNKning "lasso" hosil qilib parchalanishi

- G (guanin)
- U (uridin)
- A (adenin)



7- rasm. Splysing sxemasi.

Genlarning uzoq-uzoq tuzilishi ularning faoliyatini mukammalroq boshqarish uchun zamin yaratadi.

Uzoq-uzoq tuzilishga ega bo'lgan genlarning transkripsiyasi natijasida birlamchi pro-iRNK hosil bo'ladi, u genning to'liq nusxasi bo'lib, ham ekzon, ham intronlarga mos bo'laklarni o'z ichiga oladi. Transkripsiya jarayonida turli xil genlarni o'qiydigan uch xil RNK-polimerazalari ishtirok etadi.

RNKP-I turli xil rRNK shakllarining tuzilishini kodlovchi genlarni o'qiydi (5.8S, 18S, 28S). RNKP-II oqsillar va ba'zi kyRNK (kichik yadro RNKsi) larning tuzilishini kodlovchi genlarni transkripsiya qiladi.

Nihoyat, RNKP-III 5S rRNK, transport RNK va kyRNK genlarini o'qiydi. Turli xil miqdordagi transkripsiya omillari bo'lgan oqsillardan tashkil topgan oqsil kompleksi transkripsiya jarayonining boshlanishida ishtirok etadi. Sutmizuvchilarda bu umumiy massasi 600 kDa bo'lgan 12-14 polipeptidlardan iborat kompleks. Transkripsiyaning intensivligini tartibga solishda maxsus tartibga soluvchi hududlar - enxanserlar va saylanserlar ishtirok etadi. Birinchisi transkripsiya jarayonini kuchaytiradi, ikkinchisi susaytiradi. Ular promouterdan minglab n.j. masofa uzoqlikda bo'lishi mumkin. Ularning nazorati ostida tartibga soluvchi oqsillar sintez qilinadi. Transkripsiya jarayonida DNKdagi tarkibiy o'zgarishlar tufayli promouter va enxanser (yoki saylenser) birlashadi va tartibga soluvchi oqsillar transkripsiya omillari yoki RNK polimeraza bilan bog'lanadi.

Pro-iRNK oqsil sintezi uchun matritsa rolini o'ynashi uchun u yetilish davri (prosessing) bosqichidan o'tishi kerak. Ushbu davrning asosiy jarayoni pro-mRNK-dan intronlarga to'g'ri keladigan qismlarni olib tashlash va qolgan ekzonlarni bitta zanjirga birlashtirishdan iborat. Ekzonlarni "o'zaro bog'lash" jarayoni spaysing deb nomlanadi (8-rasm). Spaysingni amalga oshirishda kichik yadroviy RNK (kyRNK) va oqsillar katta rol o'ynaydi. Jarayon barcha eukariotlarda xuddi shunday davom etadi. kyRNK molekulari ham pro-iRNK bilan, ham bir-biri bilan komplementar bog'lanadi. Ular intronlarni olib tashlashni ta'minlaydi va ekzonlarni bir-biriga yaqin ushlab turadi.

Spaysing jarayoni alternativ tabiatga ega bo'lishi mumkin, ya'ni ekzonlarni o'zaro bog'lash turli kombinatsiyalarda amalga oshirilishi mumkin. Ko'pgina genlarda o'nlab yoki undan ortiq ekzon mavjud, shuning uchun yakuniy mRNK variantlarining soni $2n$ ga teng, bu erda

n - ekzononlar soni. Alternativ splaysing ma'lumotni yozib olish tizimini tejamkor qiladi, chunki turli xil oqsillarni sintez qilish uchun bitta gendan ma'lumot olish mumkin. Bundan tashqari, u ma'lum bir oqsil mahsulotidagi hujayralar ehtiyojlariga qarab ma'lumot oqimini tartibga solish qobiliyatini yaratadi. Alternativ splaysing, xususan, immunoglobulinlar, transkripsiya omillari va boshqa oqsillarni sintez qilishda qo'llaniladi.

iRNKning to'liq shakllanish jarayonida uning ikkala uchi ham o'zgartiriladi: 5'-uchiga kep-tuzilmasi va 3'-uchiga poliadenil zanjirini birlashtirish. Kep-tuzilma guanin nukleotidining 5'-uchining mRNKning chetki asosiga birikishi natijasida hosil bo'ladi.

Eukariotik organizmlarda translyatsiya mexanizmi prokariotlardan tubdan farq qilmaydi. Shu bilan birga oqsil sintezining ushbu bosqichida, bakteriyalarga qaraganda ancha ko'p oqsillarni translyatsiya qilish omillari ishtirok etadi.

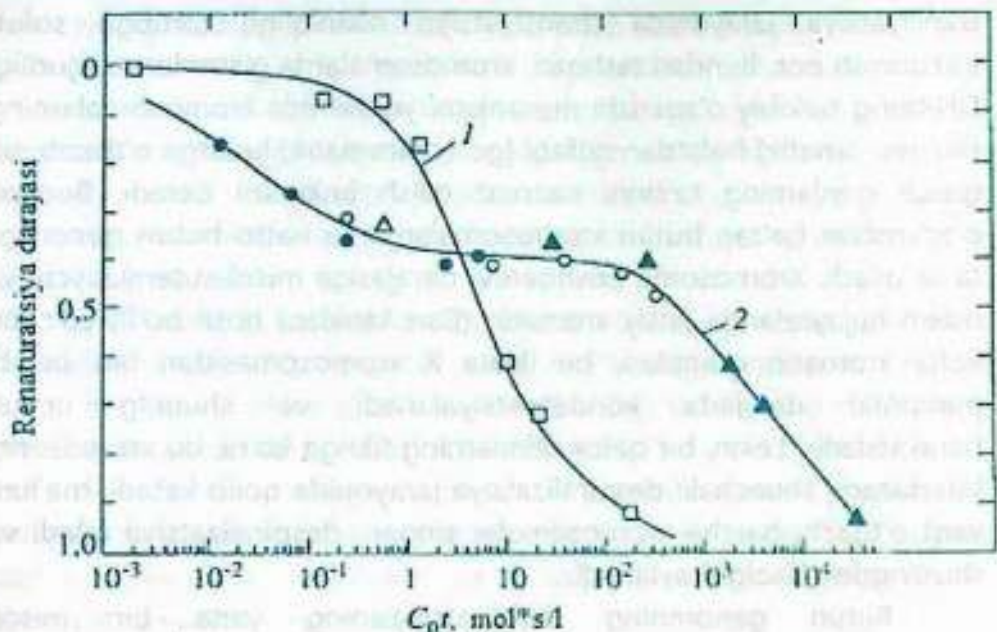
Eukariotik genom tuzilishida shuningdek xromosomalarning ixtisoslashgan chetlari - telomeralar muhimdir. Telomerik DNK ko'plab marotaba takrorlanadigan qisqa nukleotidlarning bloklaridan iborat. Telomerik DNK birinchi marta bir hujayrali sodda organizmlarda o'rganilgan.

U 6-8 juft nukleotidlarning bloklaridan iborat. Bir zanjirda bu TTGGGG (G-boy zanjir) blok, ikkinchisida - AACCCC (C-boy zanjir). Odamlarda bu ketma-ketlik bitta TTAGGG asosiga farq qiladi, o'simliklarda TTAGGG universal bloki mavjud. Odamlarda telomerik DNK uzunligi 2 dan 20 ming n.j. gacha bo'lishi mumkin. Telomerik DNK hech qachon transkripsiya qilinmaydi va yo'ldosh DNK tarkibiga kiradi. Telomeraza fermenti xromosomalarning telomerik hududlari bilan bog'lanadi, ularda yuzaga keladigan buzilishlarni yo'q qiladi. Hujayra qarishi ushbu ferment faolligining pasayishi natijasida terminal bo'limlarining yo'qolishi natijasida telomerlarning qisqarishi bilan bog'liq.

Prokariotik bilan taqqoslaganda, eukariotik genomning faoliyati gen ta'sirini tartibga solishning ko'p bosqichli tabiatidan sezilarli farq qiladi. Prokariotlarda faqat bitta turdagi tartibga solish turi mavjud - operon tizimidan foydalangan holda transkripsiya jarayoni orqali. Eukariotlarda genlarning uzoq-uzoq tuzilishi tufayli, transkripsiyadan tashqari, shuningdek posttranskripsion (splaysing, modifikatsiya) va

translyatsiya jarayonida (translyatsiya noaniqligi) tartibga solish imkoniyati bor. Bundan tashqari, xromosomalarda gistonlar mavjudligi DNKning tarkibiy o'zgarishi mexanizmi yordamida xromosomalarning faol (euromatik) holatdan nofaol (geteroxromatik) holatga o'tkazib, bir guruh genlarning ta'sirini nazorat qilish imkonini beradi. Bunday o'zgarishlar ba'zan butun xromosomalarga va hatto butun genomga ta'sir qiladi. Xromosoma boshqaruvi darajasiga misol sutemizuvchi va odam hujayralarida jinsiy xromatin (Barr tanalari) hosil bo'lishidir. Bu katta xromatin granulasi, bu ikkita X xromosomasidan biri bo'lib, maksimal darajada kondensatsiyalanadi va shuning uchun harakatsizdir. Lekin, bir qator olimlarning fikriga ko'ra, bu xromosoma interfazada shunchaki despiralizatsiya jarayonida qolib ketadi, ma'lum vaqt o'tgach, barcha xromosomalar singari, despiralizatsiya qiladi va shuningdek "faolga" aylanadi.

Butun genomning inaktivatsiyasining yana bir misoli hayvonlarda spermatogenez jarayonidir, bu davrda barcha spermatozoidlar xromosomalari kondensatsiyalanib, harakatsiz bo'lib qoladi. Bu jinsiy hujayralarining ularning DNKlariga zarar yetganda (masalan, nurlanish paytida) himoya mexanizmidir. Agar ularda yuzaga keladigan mutatsiyalar ularning o'limiga olib kelmasa, embrionni differentsiatsiyalash jarayonida erkak genomining funksional faolligi tiklanganda yuzaga keladi. Ammo, aksariyat mutatsiyalarning resessivligi, hech bo'lmaganda keyingi avlodgacha (gomezigoz holatiga o'tguncha) ularning tashqi namoyon bo'lishiga turtki beradi yoki ular umuman yo'q bo'lib ketadi.



8- Rasm. Denaturatsiyaga uchragan DNK zanjirlarining reassosiatsiyasi (qayta bog'lanishi) kinetikasi, turli manbaalardan olingan: 1 — *E. coli*dan; 2 — buzoqning qalaonsimon bezi hujayralaridan

DNKning ikki zanjirlili tuzilishi o'rnatilgandan so'ng ko'p o'tmay, DNKning kuchli isitilishi uning ikkita zanjiri ajralib chiqshi (erishi) va DNK ikki zanjirli holatdan bitta zanjirli holatga o'tishi aniqlandi. Bu uning tabiiy tuzilishini buzilishiga olib keladi, ushbu jarayonning nomi - DNK denaturatsiyasi deb ataladi. Biroq, denaturatsiyaga uchragan DNK soviganida, komplementar zanjirlar bir-birini topadilar va asl molekulada bo'lgani kabi bir-biriga bog'lanadilar. Ushbu jarayon renaturatsiya yoki qayta assotsiatsiya deyiladi. Ushbu hodisa kashf etilgandan so'ng, u genomning tuzilishini o'rganish uchun tadqiqotchilar tomonidan qo'llanilgan.

3.2. Genom o'lchovlari va C kattaligi paradoksi. Xudbin DNK gipotezasi.

DNKni qayta bog'lash jarayoni odatdagi ikkinchi darajali kimyoviy reaksiyaga juda o'xshash va shuning uchun uni oddiy formulalar bilan tavsiflash mumkin: $C_t/C_0 = 1/(1 + k_2(C_0t))$, bu yerda C_0 va C_t bitta zanjirli DNKning boshlang'ich (nol) nuqta va reassotsatsiya reaksiyasi boshlanganidan so'ng t vaqtidagi konsentratsiyasidir, k_2 - ikkinchi darajali reaksiya tezligining doimiyidir.

Qulaylik uchun qayta bog'lanish jarayonining tasviri chizilganida, unda qayta bog'langan molekularning fraksiyalari ordinat o'qi bo'ylab va C_0t qiymati absissa o'qi bo'ylab chiziladi. Ushbu rasm yordamida oddiy organizmlarning (viruslar va bakteriyalar) DNKni qayta birlashtirish kinetikasi egri chiziqlari S-shakliga ega. Bu ikkinchi darajali kimyoviy reaksiyaning kinetikasiga mos keladi. Agar tajribada ushbu egri chiziqdan og'ish kuzatilsa, bu DNK zanjirlarining o'zaro ta'sir tezligi nuqtai nazaridan turlicha ekanligini ko'rsatishi kerak: ba'zilar tezroq reaksiyaga kirishadi, boshqalari esa sekinroq. Inson DNKsi mayda bo'laklarga bo'linganida va ularni qayta birlashtirish kinetikasi o'lchanganda, bu jarayonni tavsiflovchi egri chiziq standartdan uzoq ekanligi aniqlandi (7-rasm).

Bu inson DNKsida turli tezlikda bir-biriga bog'lanadigan nukleotidlar ketma-ketligi mavjudligi va tajribada kuzatilgan umumiy reaksiya egri chizig'i ko'plab mustaqil ikkinchi darajali reaksiyalarning yig'indisini aks ettiradi. Ushbu tajribalar amalga oshirilganda, matematik bir qurilma mavjud bo'lib, bu deyarli har qanday bo'lsa ham, individual nisbatan bir hil kinetik tarkibiy qismlarni murakkab umumiy egri chiziqdan ajratib olishga imkon berdi. Inson DNKsining turli tarkibiy qismlarining qayta birlashish tezligidagi farqlar DNKdagi alohida nukleotidlar ketma-ketligining turli xil sonda uchrashi bilan bog'liq edi. Faqat bir marta genomda uchraydigan bo'laklar unikal (noyob) deb nomlangan. Agar genomdagi ma'lum bir nukleotid ketma-ketligi noyob bo'lmasa, lekin ma'lum miqdordagi bir xil nusxalar bilan ifodalangan bo'lsa (ya'ni, u takrorlangan bo'lsa), unda bu ketma-ketlik, tabiiyki, sof kimyoviy qonunlar asosida komplementar zanjimi ancha tezroq topadi va u bilan qayta bog'lanadi (reassotsiatsiyalanadi).

Ushbu tahlil natijasida, inson genomida taxminan 75% DNK bo'laklari gaploid to'plamda faqat 1 nusxada (noyob) borligi aniqlandi (tabiiyki, diploid bo'lgan yadroda har bir noyob nukleotid ketma-ketligining 2 nusxasi mavjud). Genomning qolgan qismi takroriy ketma-ketliklardan iborat (takroriy), ular orasida 10% juda tez qayta bog'lanadigan takrorlanishlar (har bir genomga 104 yoki undan ko'p nusxa) va 15% ga yaqin o'rta tezlikda bog'lanadigan takrorlanishlar bor.

Bugungi kunga qadar inson genomida kamida oltita turdagi yo'ldosh takrorlanishlari aniqlangan. Bular asosan klassik yo'ldoshlarning uch turi. 1chi yo'ldosh uzunligi 42 n.j. bo'lgan nukleotidlarning takrorlanadigan elementar ketma-ketligidan iborat. (7ta xar xil xromosomada joylashgan); 2chi va 3chi yo'ldoshlar uzunligi 5 n.j. bo'lgan elementar (eng soda) takrorlanishlardan iborat (birinchisi 4ta, ikkinchisi 12 xar xil xromosomalarda topilgan).

Bundan tashqari, barcha inson xromosomalarda alfa-yo'ldosh takrorlanishlari mavjud. Ular uzunligi 171 n.j. bo'lgan elementar takrorlanadigan nukleotid ketma-ketligiga ega. Bundan tashqari, faqat to'qqiz xromosomada joylashgan uzunligi 68 n.j. bo'lgan beta-yo'ldosh takrorlanishlari mavjud. Shuningdek, uzunligi 220 n.j. bo'lgan gamma - yo'ldoshi inson genomida uchraydi, lekin ancha kamroq: ma'lum bo'lishicha, ular faqat ikkita inson xromomasida (8 va X) mavjud.

Barcha yo'ldosh DNKlarning xromosomalarda bo'ylab tarqalishi tasodifiy ko'rinmaydi. Masalan, ularning ba'zilari xromosomalarning chetiga va tsentromera (xromosomalarning toraygan qismlari, har doim markazda bo'lmaydi) hududlarida joylashadi. Xususan, kattaligi 0,1 dan 4 million n.j.gacha bo'lgan barcha inson xromosomalarning tsentromeralari asosan alfa yo'ldosh DNKdan iborat.

Oddiy yo'ldosh DNK bilan bir qatorda, inson genomida mini- va mikrosatellitlar (yani kichik va o'ta kichik yo'ldoshlar) deb nomlangan nukleotidlar ketma-ketligi mavjud bo'lib, ular barcha xromosomalarning ko'p qismlariga tarqalib, inson genomining taxminan 3 foizini tashkil qiladi. Inson genomida bunday yo'ldoshlardan biri o'rtacha har 2 ming n.j. masofa oraliqida uchraydi. Minisatellitlar - bu 11 dan 500 n.j. gacha bo'lgan o'lchamdagi nukleotidlarning takrorlanivchi ketma-ketligi. Bunday takrorlanish klasterlari inson genomida 0,1 dan 20 ming n.j. gacha joyni egallaydi, va barcha xromosomalardagi bunday hududlarning umumiy soni bir

necha mingga teng. Mikrosatellitlar undan ham kichikdir. Ularning takrorlanadigan nukleotidlar ketma-ketligi 10 va undan kam n.j. dan iborat. Mikrosatellitlar odatda inson genomida kichik bo'limlarni egallaydi (150 n.j.gacha). Zanjirda faqat bitta "harf" takrorlanganida, bunday tuzilmalar gomopolimer nukleotid ketma-ketligi deb nomlanadi. Inson genomidagi nukleotidlarning gomopolimer ketma-ketligiga misol bitta AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA ketma-ketligi va shunga mos ravishda 2chi zanjirdagi TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT.

Ikki juft nukleotid (dinukleotid takrorlanish) dan tashkil topgan mikrosatellitlar inson genomining taxminan 0,5 foizini tashkil qiladi. Eng keng tarqalgan dinukleotidlar AC va AT (barcha dinukleotidlarning mos ravishda 50% va 35%). Ammo inson DNKsida bir juft GC dan iborat bo'lgan dinukleotidning takrorlanishi atigi 0,1% ni tashkil qiladi. Ko'proq murakkab "mikrosatellitlar" (trinukleotid takrorlanishlar) - bu AAT (barcha trinukleotidlarning 33%) va AAC (21%). Genomda juda kam uchraydigan uchlik CGG, X xromosomasining mo'rtlik sindromini aniqlaydigan FMR - 1 genida joylashgan. Oddiy (sog'lom) odamlarda CGG ning gendagi nusxalari soni 6 dan 54 gacha o'zgaradi. Ammo kasal odamlarda bu uchlik "ko'payadi" va ularning genidagi soni 200-1300 nusxaga yetishi mumkin. Yo'ldosh takroriyliigi va insonning turli kasalliklari o'rtasidagi munosabatlar haqida kelgusi boblarda ko'proq ma'lumot keltiramiz. Ammo bunday nukleotidlar ketma-ketligi odatda genomga nega kerakligi hamon sir bo'lib qolmoqda.

Yuqoridagi misol va boshqa ko'plab holatlar shuni ko'rsatadiki, mikro- va minisatellitlar juda o'zgaruvchan, ya'ni polimorfdir. Ularning tarqalishi va har bir alohida odamning genomidagi soni shunchalik o'ziga xoski, uni barmoq izlarining analogi sifatida ishlatish mumkin. Bu kashf qilingandan so'ng, olimlar bu bilimdan foydalanib boshlashdi. Hozirgi vaqtda inson genomining keraksiz bo'lib tuyulgan bunday qismlarni (lekin balki kerakli, faqat biz bu haqda yetarlicha bilmaymiz) inson o'zining amaliy maqsadlari uchun qo'llay boshladi. Yo'ldosh DNK o'zgaruvchanligi asosida odamlarning oilaviy aloqalari, odamning turli kasalliklarga moyilligi va boshqalar diagnostikasi ishlab chiqilgan.

Va nihoyat, inson genomini sikvenslash paytida megasatellitlar deb nomlangan yana bir turdagi yo'ldosh DNK topildi. Ushbu takrorlanishlar 2,5 dan 5 ming n.j. gacha bo'ladi va 50 dan 400

martagacha takrorlanadi. Megasatellitlar oz miqdordagi xromosomalarda uchraydi (4, 8, 19 va X larda).

Garchi ko'p hujayrali eukariotlarning genom hajmi prokariotlarga qaraganda ancha katta bo'lsada, ular orasidagi GC ketma-ketligining uchrash hilma-hilligi juda kichikdir. Ayniqsa umurtqalilar genomi ajralib turadi, ularda, umuman olganda, 40% dan 45% gacha GC ketma-ketligi uchraydi. Ushbu hodisaning sabablari quyidagi bo'lishi mumkin: bakteriyalardan farqli o'laroq, umurtqali hayvonlar nisbatan yaqinda ajralib chiqan va GC tarkibidagi sezilarli farqlarni to'plash uchun yetarli vaqt bo'lmagan.

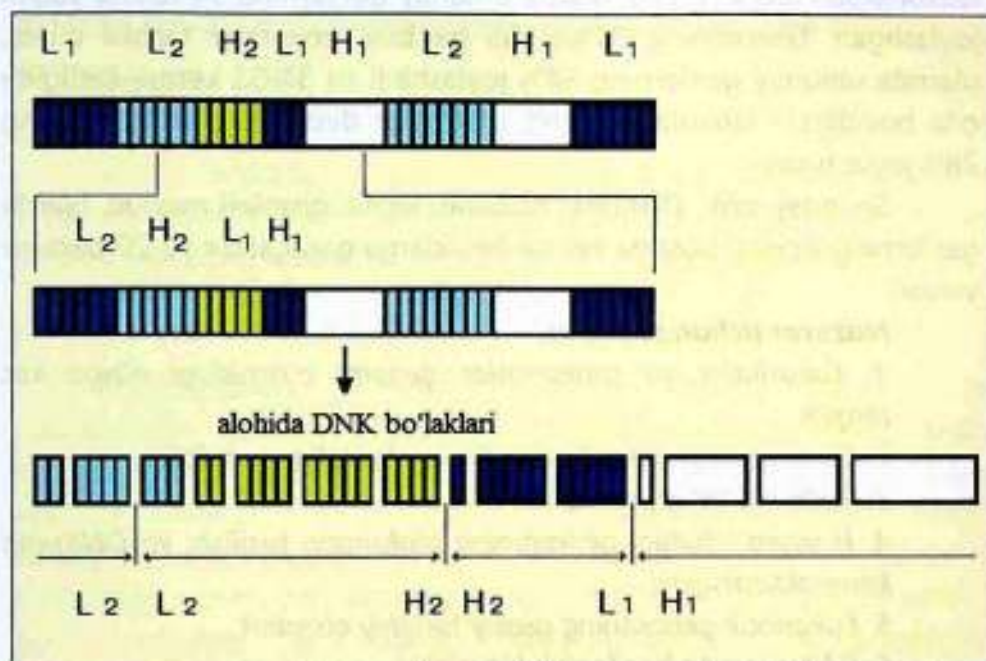
Tarkibidagi GC ketma-ketliklari uchrashida o'xshashlikka qaramay, umurtqalilar genomi ancha murakkab tarkibga ega. Agar umurtqalilar genomi DNKsi tasodifiy ravishda 30-100 kb (kilobaza) uzunlikdagi bo'laklarga bo'linganda va bu qismlar nukleotid tarkibiga ko'ra taxlab chiqilsa, ular bir-biridan tarkibidagi GC ketma-ketligi bo'yicha farq qiluvchi oz sonli sinflarni tashkil qiladi. Har bir sinf mutlaqo bir xil bo'lmassada, o'xshash chiziqlar ("bendlar") bilan ajralib turadi.

3.3. Gomopolimer va oddiy takrorlanadigan ketma-ketliklar. Minisatellitli DNK. Bernardi izoxorasi.

Issiq va sovuq qonli umurtqali hayvonlarning o'rtasida ularning genomlari umumiy tuzilishi bo'yicha sezilarli farqlar mavjud. Issiq qonlilar genomlarida genomning taxminan 2/3 qismini o'z ichiga oladigan ikkita yengil tarkibiy qismlar (L1 va L2) va genom DNKsining qolgan qismini tashkil etadigan ikki yoki uchta og'ir tarkibiy qismlar (H1, H2 va H3) mavjud. Sovuq qonlilar genomi DNKsi asosan yengil tarkibiy qismlardan iborat.

DNK bo'laklarining kompozitsion tarqalishi, asosan, ushbu qismning o'lchamidan mustaqildir, bu esa DNKning uzaytirilgan bo'limlari tarkibining gomogenligini (yani bir hil ekanligini) namoyish etadi. 1985-yilda bu mexanizmni kashf etgan olimning ismiga bag'ishlab, bunday bir hil hududlarni Bernardi izoxorlari deb nomlashdi. DNKni parchalash paytida izoxorlar tarqalib ketganda, har xil GC tarkibidagi bo'laklarning to'rtta asosiy oilasi aniqlanadi. Bernardi GC ga boy (og'ir) izoxorlar issiq qonlilar genomining 1/3 qismini

tashkil etadi va sovuq qonli umurtqali hayvonlarda deyarli yo'q deb taxmin qildi (10-rasm).



9- Rasm. Issiqqonli hayvonlar DNKsining mozaik tuzilishi sxemasi.

Issiq qonlilar genomning mozaik tuzilishga egaligini kashfiyot qilinishi xromosomalarning differentsial bo'yalishi to'g'risidagi ma'lumotlarga mos keladi. Issiq qonlilarning metafaza davridagi xromosomalarni fluorestsent bo'yoqlari, proteolitik fermentlar yoki turli xil denaturatsiyalovchi moddalar ta'sir qilgandan so'ng, Gimza usuli bilan bo'yaganda, turli xil to'q va och chiziqlar (G va R deb nomlangan bendlar) hosil bo'ladi. Biroq, sovuq qonli umurtqali hayvonlarning metafaza davridagi xromosomalari bo'yalganida, to'q va och chiziqlar uncha keskin farq qilmaydi, yoki umuman hosil bo'lmaydi. Shundan kelib chiqqan holda, GC ga boy va GC-kam izoxorlar taxminan G - va R - «bendlarga» to'g'ri keladi degan taxmin bor edi. Replikatsiya davri xaqidagi ma'lumotlar shuni ko'rsatadiki, GC ga boy izoxorlarda joylashgan genlar hujayra tsiklining boshida ko'payadi, GC kam izoxoralarda joylashgan genlar hujayra tsiklining oxiriga yaqin ko'payadi.

Odam genomida iyerarxik tuzilmalar mavjudligi haqida gapirish mumkin. Bunga izoxorlar misol bo'la oladi - uzun, o'rtacha 300 ming

n.j. ga teng DNK bo'laklari, tarkibidagi nukleotid asoslar yoki GC ketma-ketliklar miqdori bo'yicha bir hil. Genomning 62 foizi GC-kam izoxorlardan iborat bo'lib, ularda umumiy genlarning 34 foizga yaqini joylashgan. Genomning 31%ni GS ga boy izoxoralar tashkil qiladi, ularda umumiy genlarning 38% joylashadi va 3%GS ketma-ketligida o'ta boyitilgan izoxoralarda (NS izoxoralar deb atalagan) genlarning 28% joylashgan.

Shunday qilib, DNKning nisbatan kichik qismlari mavjud, ularda genlarning zichligi boshqa ketma-ketliklarga qaraganda 10-20 baravar yuqori.

Nazorat uchun savollar:

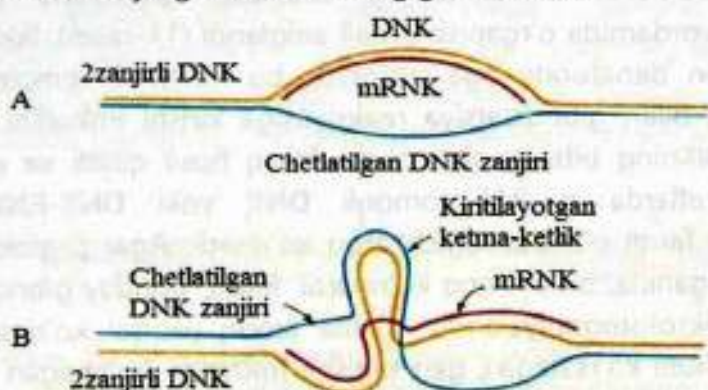
1. *Eukariotlar va prokariotlar genomi o'rtasidagi o'ziga xos farqlar.*
2. *Genomining o'lchovlari va C ning kattaligi paradoksi.*
3. *Xudbin DNK gipotezasi.*
4. *Hujayra ichidagi genomining bloksimon tuzilishi va DNKning kompaktizatsiyasi.*
5. *Eukariotik genomning asosiy tarkibiy qismlari.*
6. *DNKni qayta bog'lanish kinetikasi.*
7. *Yo'ldosh DNK haqida tushuncha.*
8. *Gomopolimer va oddiy takrorlanadigan ketma-ketliklar.*
9. *Minisatellit DNK haqida tushuncha, uning ahamiyati.*
10. *Bernard izoxorasi.*

4-BOB. EUKARIOTIK GENLARNING MURAKKAB TUZILISHI.

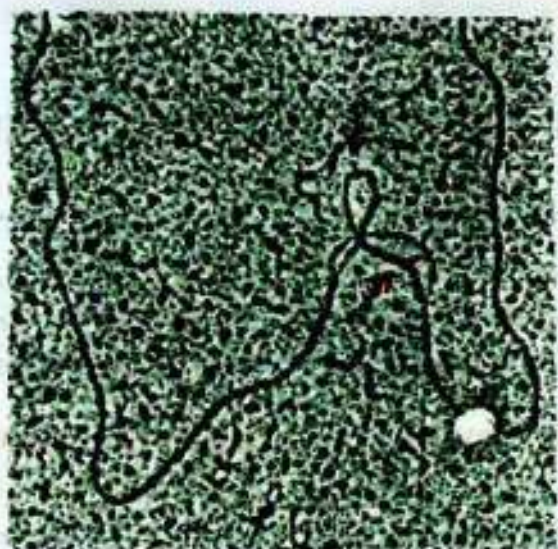
Ko'rib chiqiladigan savollar: Umumiy tavsif. Uziq-uziq tuzilish - ekzon va intron. Genlarning uziq-uziq tuzilishini aniqlash va o'rganish usullari: elektron mikroskop (D-ilmuqlar, R.-imoqlar), restriksion tahlil.

4.1. Umumiy tavsif. Uziq-uziq tuzilish - ekzon va intron.

Bakteriyalarda polipeptid zanjirlari tripletli (ya'ni uchta nukleotiddan iborat) kodonlarining uzilmas ketma-ketligi bilan kodlanadi. Ko'p yillar davomida yuqori organizmlarning genlari ham uzluksiz ekanligiga ishonishgan. 1977 yilda ushbu nuqtai nazar noto'g'ri ekanligi isbotlandi, chunki bir nechta laboratoriyalarda ba'zi genlarning uziq-uziq tuzilishga ega ekanligi aniqlandi. Masalan, gemoglobinning β -zanjiri aminokislotalari ketma-ketligini kodlaydigan gen, kodlamaydigan 550 juftlikdan iborat uzun hududga va 120 juftlikdan iborat qisqa hududga ega. Shunday qilib, β -globin geni uchta kodlaydigan ketma-ketligiga bo'linadi.



10- rasm. Elektron mikroskopi yordamida kiritildan ketma-ketliklarni aniqlash. mRNA molekulasini (qizil chiziq) tegishli genni o'z ichiga olgan genom DNK bilan gibridlanadi. A - agar gen uzluksiz bo'lsa, 1zanjirli DNKning bitta halqasi ko'rinadi (ko'k rangda ko'rsatilgan); B - agar gen tartibida kiritma bo'lsa, 1zanjirli DNKning ikkita halqasi (ko'k rangda ko'rsatilgan) va 2zanjirli DNKning bitta halqasi (ko'k va sariq) ko'rinadi.



11 rasm. Elektron mikroskopdagi β -globin mRNKsi gibriddingining va β -globin genini o'z ichiga olgan DNK bo'lagining ko'rinishi. Qalin ikki zanjirli DNK ilmoqlari bu mRNKda bo'lmagan DNKga kiritilgan ketma-ketliklardir (11, B rasmda bo'lgani kabi). Yuqori strelka katta kiritma ketma-ketlikni, pastki strelka kichigini bildiradi.

Ushbu ajoyib tuzilish β -globin mRNKsi va sichqonning β -globinni kodlovchi DNKsi bo'lagi orasidagi gibridlarni elektron mikroskop yordamida o'rganish orqali aniqlandi (11-rasm). Ikki zanjirli DNK qisman denaturatsiyaga uchraydi, bu mRNKni komplementar DNK zanjiri bilan gibrizatsiya reaksiyasiga kirishi imkonini beradi. So'ngra, DNKning bitta zanjirli qismi ilmoq hosil qiladi va elektron mikrofotograflarda u ikki tomonli DNK yoki DNK-RNK-gibrid qismlaridan farqli o'laroq, ingichkaroq ko'rinadi. Agar β -globin geni uzliksiz bo'lganida, bitta ilmoq ko'rinardi. Biroq, bunday gibridlarning elektron mikrofotografiyalarida uchta ilmoq yaqqol ko'rinadi (12-rasm). Bu shuni ko'rsatadiki, gen tegishli mRNKda bo'lmagan kamida bitta DNK hududi bilan uzilgan. Qo'shma ketma-ketligi to'g'risida yana bir ma'lumot β -globin geni va mRNKning teskari transkripsiyasi mahsulotining restriksion bo'laklarini xaritalash orqali olingan. Ushbu xaritalar orasidagi katta farqlar genom DNKda kodlaydigan ketma-ketliklari orasidagi translyatsiyaga uchramaydigan (ya'ni kodlamaydigan) ketma-ketliklar mavjudligini ko'rsatdi. Restriksion

xaritalar bunday qo'shimcha ketma-ketliklarning joylashishini aniqlashga imkon berdi.

Gen ekspressiyasining qaysi bosqichida qo'shma ketma-ketliklari olib tashlanadi? Yadrodan ajratib olingan yangi sintezlangan RNKlar ulardan hosil bo'ladigan mRNK molekulariga qaraganda ancha uzunroq. Xususan, β -globin genining birlamchi transkriptida ikkita kodlamaydigan hudud mavjud. Dastlabki 15S transkriptda ushbu qo'shimcha ketma-ketliklari kesib tashlanadi, kodlovchi ketma-ketliklar esa bir vaqtning o'zida splaysing fermenti bilan birlashtiriladi. Ushbu ferment juda aniq faoliyat ko'rsatadi. Natijada, yetuk 9S-mRNK hosil bo'ladi. Uziq-uziq ("parchalangan") genlarning kodlovchi ketma-ketliklari "ekzonlar" deb nomlanadi, va qo'shma ketma-ketliklari "intron" deb ataladi (ingliz tilidan *expressed regions* – ekspressiyaga uchraydigan hududlar va *intervening sequence* – uzilib qoladigan ketma-ketlik).

Yana bir uziq-uziq eukariotik gen - tovuq tuxumi ovalbumini geni bo'lib, u yettita uzun intron bilan ajratilgan sakkizta ekzondan iborat (12-rasm). Konalbumin geni bundan ham ajablanarli: uning tarkibida kamida 17 ekzon mavjud. Ushbu genlarning ekspressiyasining umumiy xususiyati shundaki, ularning ekzonlari mRNK va DNKda bir xil ketma-ketlikda joylashgan. Shunday qilib, uziq-uziq genlar, uzluksiz genlar singari, ularning polipeptid mahsulotlari bilan kolineardir (yani bir hil ketma-ketlikka ega).

Bugungi kunga qadar xaritalanganga barcha qushlar va sutemizuvchi genlari (giston genlaridan tashqari) intronlarni o'z ichiga oladi.



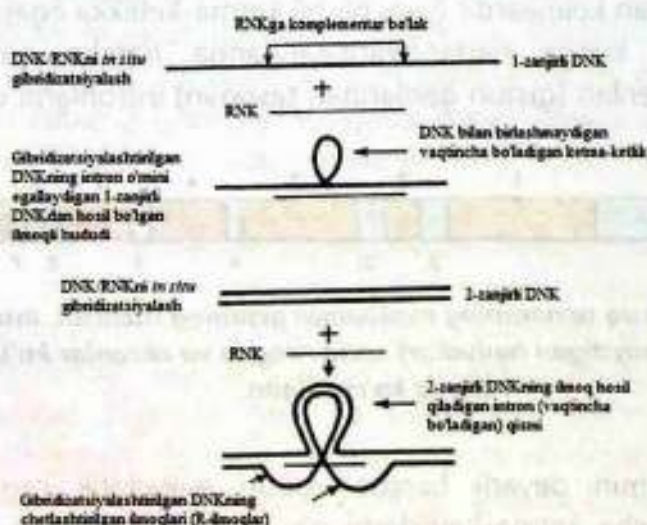
12-Rasm. Tovuq tuxumining ovalbumin genining tuzilishi. Intronlar (kodlamaydigan hududlar) sariq rangda va ekzonlar ko'k rangda ko'rsatilgan.

Nima uchun deyarli barcha yuqori eukariotik organizmlar genlari qo'shimcha ketma-ketliklarni o'z ichiga oladi? Ular ehtimol, uziq-uziq genlar evolyutsiya jarayonini aks ettiradi. Ekzonlar birlashgan

katta tarkibiy yoki funksional elementlarga (domenlarga) mos kelishi mumkin, bu yangi xususiyatlarga ega bo'lgan oqsillarni hosil qilish imkoniyatini beradi. Boshqa ehtimolga ko'ra, kesib tashlangan qo'shinchilik ketma-ketliklar mRNKning yadrodan sitozolgacha oqishini tartibga soladi. Ushbu gipotezaga ko'ra, birlamchi transkriptning splyasingsi (biriktirilishi) hal qiluvchi rol o'ynaydi: u hujayrada qaysi oqsil sintezlashini aniqlaydi.

4.2. Genlarning uziq-uziq tuzilishini aniqlash va o'rganish usullari: elektron mikroskop (D-ilmuqlar, R.-ilmuqlar), restriksion tahlil.

Genni identifikatsiyalash (yani aniqlab olish) gen mahsulotidan kelib chiqqan holda, masalan, blot-gibridlash yo'li bilan gen klonotekasida tegishli genni qidirish uchun ishlatiladigan mRNK yordamida amalga oshirilishi mumkin. Shu usul bilan ribosomal genlar, kichik yadroviy RNK, tRNK va boshqalar ajratilib, klonlashtirilgan. Oqsildagi aminokislotalar ketma-ketligi ma'lum bo'lsa, u holda invitro usulida (yani suniy ravishda) sintez qilingan oligonukleotid mos keladigan genni ajratib olish uchun ishlatilishi mumkin (oligonukleotid zondlari usuli). Kodlar lug'ati asosida oligonukleotidlar to'plami sintezlanadi, ular o'rganiladigan polipeptid tarkibiga kiradigan 5-10 aminokislotalarni kodlashi mumkin va ular zond sifatida ishlatiladi.



13 rasm. R-ilmuqlarning geterodupleks tahlilidan foydalanib, eukaryotik genning ekzon-intron tarkibini aniqlash

Gen ajratib olingandan so'ng, uning tuzilishi restriksion xaritasi yordamida o'rganiladi va nukleotidlarning ketma-ketligi aniqlanadi.

Eukariotik genlarning tarkibiy va funksional tuzilishini (ekzonlar, intronlar, initsiatsiya va terminatsiya saytlari) tahlil qilish uchun, gen muhandislik usullaridan tashqari, RNK-DNK gibrid molekularini elektron mikroskop ostida tahlil qilish (geterodupleks tahlil) ham qo'llaniladi. Eukariotik genlar uziq-uziq tuzilishga ega bo'lganligi sababli, ulardagi kodlovchi hududlari (ekzonlar) yetuk mRNKda bo'lmagan qo'shimcha ketma-ketliklar (intronlar) bilan uzilib qoladi va gibridlangan RNK-DNK preparatlarida elektron mikroskop yordamida intronlar joylashishini aniqlanish mumkin.

Agar RNK bitta zanjirli DNK bilan gibridlashtirilsa, u holda gibrid ikki zanjirli komplementar hududlar bir zanjirli DNKlarga qaraganda qalinroq bo'ladi va intron hududlarining nokomplementar ketma-ketliklari bitta zanjirli DNKning ilmoqlarini hosil qiladi, ularning uzunligi va o'lchami gen ichidagi intronning joylashishini va hajmini aniqlaydi (13-rasm, a).

Agar RNK ikki zanjirli DNK bilan gibridlashtirilsa, u holda DNK-dupleks zanjirlarining biri RNK ga almashtiriladigan joylarda bitta zanjirli DNK ilmoqlari (R-ilmoq) hosil bo'ladi. RNK bilan birlasha olmaydigan oraliq ketma-ketlik ikki zanjirli DNKning qalinroq ilmog'ini hosil qiladi, bu ilmoq RNK-DNK gibridlanish hududidan ajralib turadi. Ushbu ilmoq intronga to'g'ri keladi (13-rasm, b). Elektron mikroskopik xarita miqyosi taxminan 10-50 nukleotid juftligini tashkil etadi.

Eukariotik genlar tuzilishining uziq-uziq tuzilishi va ulardagi ekzon va intronlarning holati yetuk mRNK (yoki kDNK) ning nukleotid ketma-ketligini genom nusxasi bilan taqqoslash orqali aniqlanishi mumkin.

Nazorat uchun savollar:

1. Eukariotik genom tuzilishining umumiy xususiyatlari.
2. Ekzon va intronlar tushunchasi.
3. Genlarning uziq-uziq tuzilishini aniqlash va o'rganish usullari: elektron mikroskop (D-ilmoqlar, R-ilmoqlar).
4. Restriksion tahlil, uning mohiyati.

5-BOB. GEN TUZILISHINI O'RGANISH

Prokariotlarda genlarni operonlardan tashkil etilish prinsipi. Genlarning kimyoviy sintezi. Molekulyar klonlash uchun vektorlar. Genom kutubxonalarini yaratish, restriksion xaritalarini qurish. Sauzern-bloting tahlili. "Xromosoma bo'yicha yurish." Nozern-bloting tahlili. Polimeraza zanjirli reaksiyasi. Nukleotidlar ketma-ketligini aniqlash (sikvens tahlili). Drozofiladagi transformatsiya.

5.1. Prokariotlarda genlarni operonlardan tashkil etilish prinsipi.

Bakteriyalar atrof-muhitdagi o'zgarishlarga tezda moslasha olishlari kerak. Ularning tirik qolishi metabolizmni bir substratdan ikkinchisiga o'tkazish (yani boshqa ozuqani hazm qila boshlash) qobiliyatiga bog'liq, chunki tashqi muhitdagi ozuqa moddalari doim o'zgarib turishi mumkin.

Bakteriya tegishli substrat bo'lmaganda uni hazm qilish uchun kerak bo'lgan fermentlarini sintez qilmaydi, ammo shu substrat paydo bo'lgan paytda istalgan vaqtda ularni sintez qilishga qodir. Bunday qobiliyatga ega bo'lish uchun bakteriyalar genlari klasterlarga (yani guruhlariga) shunday yo'l bilan birlashtirilganki, ma'lum bir biosintez yo'li uchun zarur bo'lgan fermentlarni kodlaydigan genlar bir hil tarzda tartibga solinadi.

β -galaktozid moddasi yo'qligida *E. coli* hujayralarida shu moddani parchalaydigan fermentning juda oz sonli molekulari bo'ladi - tom ma'noda bir nechta. Fermentning vazifasi β -galaktozid molekulasini tarkibiy monosaxaridlarga bo'lishdir. Masalan, laktoza glyukoza va galaktozaga parchalanadi, ular o'z navbatida metabolizmning keyingi bosqichlarida qo'llaniladi. Bakterial hujayralarga galaktozid qo'shilishi bilan, 2-3 daqiqadan so'ng paydo bo'ladigan yangi molekularlar sintezi natijasida fermentning faolligi

juda tez oshadi. Ko'p o'tmay, ularning hujayradagi soni 5000 dan oshadi. Substrat muhitdan chiqarilganda, ferment sintezi qanday boshlangan bo'lsa, shunday tez to'xtaydi.

Substratning ta'siri ostida ferment sintezi tufayli uning faolligining tez o'sishi induksiya deb ataladi va substratning ta'siri ostida faollikning pasayishi genlarning repressiyasi deb ataladi.

Genlarni ular kodlaydigan oqsillar ta'siriga ko'ra ikki guruhga bo'lish mumkin. Fermentativ yoki strukturaviy funksiyalar uchun zarur bo'lgan oqsillarni kodlaydigan genlar tarkibiy deyiladi. Aksariyat bakterial genlar ushbu toifaga kiradi, shuning uchun juda ko'p turli xil protein funksiyalari va tuzilmalari mavjud.

Boshqa genlarning ekspressiyasini (yani faolligini) tartibga soluvchi oqsillarni kodlovchi genlar regulyator (yani tartibga soluvchi) deb ataladi. Tartibga soluvchi genlarning mahsuloti (regulyator oqsillar) hujayrada erkin tarqaladi va o'z nishonini topib, uni faol holatga keltiradi. Genlarning bunday o'zaro ta'siri trans-tartibga solish deb nomlanadi. Trans-ta'sir qiluvchi oqsil nishon-genni yo musbat (+) - agar tartibga solingan gen o'zaro ta'sir natijasida yoqilgan bo'lsa yoki u o'chirilgan bo'lsa - manfiy (-) tartibga solishi mumkin. Tartibga soluvchi oqsil, odatda, nishondagi genning tsis-tartibga soluvchi ketma-ketligi bilan bog'lanadi. Bu ketma-ketlik odatda (lekin har doim ham emas) genga yaqin joylashgan bo'ladi.

Bakteriyalarning tarkibiy genlari ko'pincha klasterlarga (guruhlariga) birlashtirilgan bo'ladi, guruh ichidagi genlar kodlaydigan oqsillarning vazifalari bir-biriga bog'liq bo'ladi.

E. coli-dagi genlar klasteriga misol - laktoza genlari, ular substratning ta'siri ostida induksiyaga (faollashtirilishga) va repressiyaga (o'chirilishga) uchraydi.

Butun klaster taxminan 6000 nj ni tashkil qiladi. *Lacl* geninig o'z promotori va terminatori bor. *Lacl* hududining oxiri P_{lac} promoteriga to'g'ridan-to'g'ri ulanib ketadi, O_{lac} operatori *lacZ* genining dastlabki 26 nj-ni egallaydi. G'ayrioddiy darajada uzun bo'lgan *lacZ* genidan keyin *lacY* va *lacA* genlari, shuningdek, umumiy transkripsiya terminatori joylashgan.

Genlar quyidagi vazifalarga ega: *lacZ* mahsuloti β -galaktozidni tarkibiy monosaxaridlarga parchalaydi, *lacY* mahsuloti β -galaktozid-permeazdir, u β -galaktozidni hujayra ichiga olib kiradi. *LacA* geni

transatsetilaza oqsilini kodlaydi, bu ferment atsetil guruhini atsetil-CoA dan β -galaktozidga o'tkazadi.

LacZ va *lacY* genlarining mutatsiyalari Lac^- fenotipini beradi, bunday hujayralar laktoza bilan oquzqlana olmaydi. *LacZ* mutantlarida β -galaktozidazaning fermentativ faolligi yo'q. *LacY* mutantlari laktozani muhitdan o'zlashtira olmaydi. *lacA* mutantlari kutilmagan holda, fenotipik namoyon bo'lmaydi.

Yuqorida keltirilgan bu tizim, shu jumladan tarkibiy genlar va ularning ekspressiyasini boshqaruvchi elementlar, operon deb ataladigan umumiy tartibga solish birligini tashkil qiladi. Operon modelini 1961 yilda F. Jakob va J. Mono taklif qilgan. Qisqa vaqt ichida ushbu model nafaqat genetiklarning, balki butun dunyo bo'ylab ko'plab biologlarning diqqat markazida bo'lib qoldi. U gen faoliyatini tartibga soluvchi asl mexanizmni ko'rishga imkon berdi.

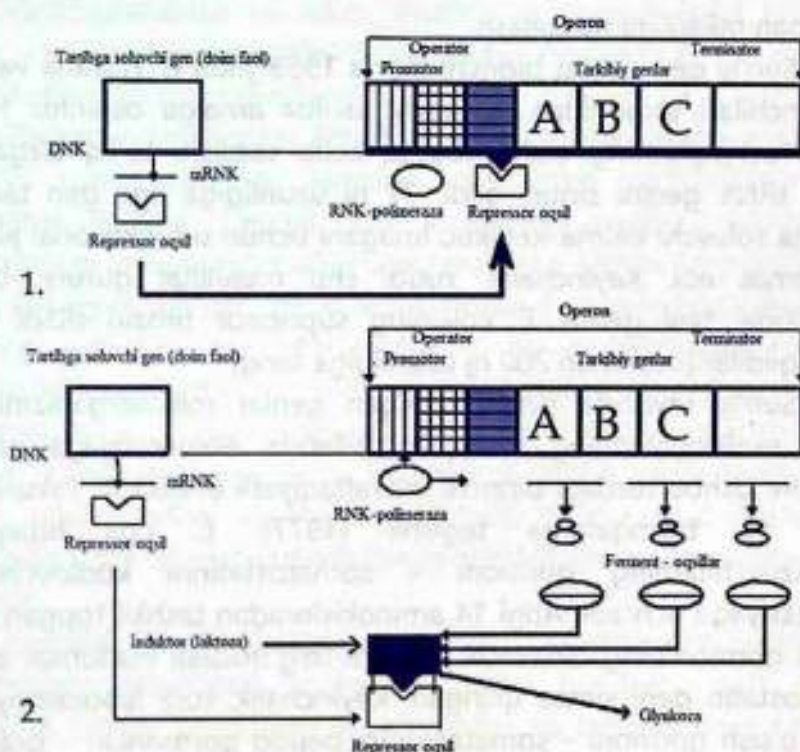
LacZ, *Y*, *A* genlarining transkripsiyasi *lacI* geni kodlaydigan repressor oqsili tomonidan boshqariladi. *LacZ*, *Y* va *A* genlari manfiy ravishda tartibga solinadi: ularning transkripsiyasi repressor oqsili tomonidan o'chirilmaguncha davom etadi. Repressor genining mutatsiyalari *lacZ*, *Y*, *A* transkripsiyasining doimiy faolligini keltirib chiqaradi.

lac-repressor oqsili O_{lac} operatori bilan *lacZ*, *Y*, *A* klasteri transkripsiyasi jarayonining boshlanishida bog'lanadi, natijada RNK polimeraza harakati va transkripsiyaning initsiatsiyasiga (boshlanishiga) to'sqinlik qiladi (15-rasm).

Repressor oqsilida ikkita bog'lanish sayti (nuqtasi) mavjud: biri induktor uchun, ikkinchisi operator uchun. Qachonki induktor (laktoza) hujayralarga kirib, shu nuqta bilan bog'lansa, u oqsil molekulasining konformatsiyasini shu qadar o'zgartiradiki, boshqa nuqtaning bog'lanish qobiliyati buziladi. Natijada, repressor transkripsiyani to'xtata olmaydi va u boshlanadi. Induktor olib tashlanganida, repressor yana operatoridagi o'z o'rnini egallaydi va transkripsiyani to'xtatadi.

Mikroorganizmlardagi genlarning operonlardan tashkil etilishning asosiy afzalligi - bu faoliyatni tartibga solishni muvofiqlashtirish: barcha genlar bir ovozda ekspressiyaga uchraydi yoki o'chiriladi. mRNK har doim 5'-oxiridan translyatsiyaga uchraydi. Bu nima uchun induksiya har doim hujayrada β -galaktozidaza, so'ngra

β -galaktozid-permeaza va shundan keyingina β -galaktozid transasetilaza paydo bo'lishiga olib kelishini ko'rsatib beradi. Va bitta mRNKni translyatsiya qilinishi nima uchun induksiya sharoitidan qat'iy nazar har uch fermentning nisbiy miqdori bir xil bo'lib qolishini tushuntiradi.



14-rasm. Laktoza operoni misolida, prokariotlarda genlarning ekspressiyasini tartibga solish sxemasi: 1 - operon "ishlamaydi" - "o'chirilgan" (repressiyalangan); 2 - operon "ishlaydi" - "yoqilgan" (depressiyalangan, ekspressiyalangan).

1997 yilda to'liq DNK ketma-ketligini aniqlash bilan yakunlangan E. coli genom loyihasini amalga oshirish jarayonida olingan ma'lumotlarga ko'ra, E. coli genomida 2584 operon aniqlangan. Ular orasida 73% bitta tsistron, 16% - 2 tsistron, 4,6% - 3 tsistron (shu jumladan lac-operoni), 6% - 4 va undan ortiq tsistronga ega (masalan, trp-, his-operonlar). Ularning barchasida kamida bitta promotor mavjud va maxsus funksional nazorat qilish saytlari orqali tartibga soluvchi oqsillar tomonidan nazorat qilinadi. Eukariotlarda operonlar aniqlanmadi.

5.2. Genlarning kimyoviy sintezi.

Genlarni hosil qilishning bir necha usullari ma'lum:

1. Tabiiy manbalardan to'g'ridan-to'g'ri ajratish (klonlash).
2. Kimyoviy sintez.
3. komplementar DNK (kDNK) olish uchun genga mos keladigan mRNK-ni nusxalash.

Sun'iy gen sintezi birinchi marta 1969 yilda G. Horana va uning yordamchilari tomonidan kimyoviy usulda amalga oshirildi. Horana guruhi achitqilarning o'sha vaqtga kelib tuzilishi to'liq o'rganilgan alanin tRNK genini sintez qildi. 77 nj uzunligiga ega gen tarkibida tartibga soluvchi ketma-ketlik bo'lmagani uchun u funktsional jihatdan faol emas edi. Keyinchalik, xuddi shu mualliflar guruhi, birinchi funktsional faol genni, E. coli-ning supressor tirozin tRNK genini sintez qildilar (taxminan 200 nj uzunligiga teng).

Sun'iy ravishda sintez qilingan genlar mikroorganizmlarning gibrid molekularining bir qismi sifatida ekspressiyaga uchrashi mumkin. Ushbu turdagi birinchi muvaffaqiyatli urinish K. Takura va G. Boyer va boshqalarga tegishli (1977): E. coli hujayrasida sutemizuvchilarning gormoni - somatostatinni kodlovchi gen ekspressiyaga uchradi. Atigi 14 aminokislotadan tashkil topgan ushbu peptid gormonining birlamchi tuzilishi to'g'risidagi ma'lumot asosida somatostatin geni sintez qilingan. Keyinchalik, turli laboratoriyalarda inson o'sish gormoni - somatotropin, peptid gormonlari - bradikinin va angiotenzin, neyropeptid - leykenkefalin, interferon ishlab chiqaradigan E. coli shtammlari yaratildi.

584 nj uzunligiga ega bo'lgan inson o'sish gormoni geni hozirgi kunda sun'iy ravishda sintez qilingan eng uzun gen hisoblanadi. U triptofan operoni promotori nazorati ostida E. coli-da replikatsiyalanadigan plazmidga kiritilgan. Kimyoviy ravishda o'zgartirilgan plazmidga ega har bir E. coli hujayrasi, promoter induktsiyasi natijasida taxminan 3 million molekula inson o'sish gormonini hosil qildi. Ushbu polipeptid, gipofiz bezi olib tashlangan tajribaviy kalamushlarda tekshirildi, natijada inson o'sish gormoni bilan mutlaqo bir xil bo'lib chiqdi.

Insulin genini yaratish uchun avval 40 dan ortiq olti a'zoli oligonukleotidlar sintez qilindi, keyinchalik ular DNK ligazasi

yordamida birlashtirildi. Uzunligi 271 va 286 nj ga teng bu ikki zanjirli polinukleotidlar plazmidlarga joylashtirildi. Gibrid molekularning ekspressiyasini ta'minlovchi tartibga soluvchi hududlari ham DNKga kiritildi. Klonlangan genlar proinsulin (insulinning nofaol shakli) sintezini kodladi, uni oddiy kimyoviy ishlov berish natijasida faol gormonga aylantirish mumkin. Insulin ikkita polipeptid zanjiridan iborat - A (21 aminokislotalar qoldiqlaridan iborat) va B (30-dan), ular disulfid aloqalari bilan bog'langan.

Teskari transkripsiya fermentlaridan foydalanishga asoslangan genlarni sun'iy ravishda yaratish usuli ham qo'llaniladi. Ushbu mexanizm RNKga bog'liq DNK polimerazasining yoki teskari transkriptaza (revertaza), faoliyatiga asoslangan. Ushbu ferment birinchi marta onkogen viruslar RNKsi replikasiyasini o'rganishda aniqlangan. Ferment turli xil RNKlardan, shu jumladan sintetik poliribonukleotidlardan, DNK nusxalarini yaratishga qodir. Revertazadan foydalanib, deyarli har qanday genni yaratish mumkin, buning uchun mos keladigan mRNKlarni ajratib olish kerak (ularni ajratib olish usullari yaxshi o'rganilgan). Ushbu usul ma'lum bir to'qimada jadal ravishda transkripsiya qilinadigan genlar sintezi uchun qulaydir.

Masalan, odamlarning, boshqa sutemizuvchilarning va qushlarning globinlarini kodlovchi genlar, buqaning ko'z gavhari oqsillarini, tuxum oqini, ipak tolasi oqsilini va boshqa ba'zi oqsillarni kodlaydigan genlar olingan va klonlangan.

5.3. Molekulyar genetikaning zamonaviy usullari.

Molekulyar klonlash yoki bir xil DNK molekularini tanlab, yig'ib olish jarayoni bir necha bosqichlardan iborat: restriksiyalovchi endonukleza bilan yordamida DNKning parchalanishi, bu parchalarni *in vitro* (sun'iy muhitda) avtonom replikasiyalanishga qodir bo'lgan vektor DNK molekulasini bilan birlashtirish, qabul qiluvchi organizmga vektorni kiritish, bu organizmda rekombinant DNKning to'planishi.

Genetik muhandislikning rasmiy tug'ilgan sanasi deb 1972 yil hisoblanadi, o'shanda P. Berg AQShda birinchi rekombinant DNKni *in vitro* (probirka ichida) yaratgan. Bu DNK genetik materialni uchta manbadan birlashtirgan: SV40 maymun onkogen virusining to'liq

genomini, o'rtamiyona bakteriofag (bakteriyalarni shikastlaydigan virus) λ genomini va E. coli laktoza operoni genini. Loyihalashtirilgan rekombinant molekulaning funksional faolligi sinovdan o'tkazilmagan, chunki mualliflar genetik muhandislik usullari inson salomatligi uchun xavfli bo'lgan mikroorganizmlarning paydo bo'lishiga olib kelishidan cho'chiganlar, masalan, hayvonlarning onkogen viruslarini odamlarning ichaklariga yuqtiradigan E. coli bakteriyalarining.

Gibrid DNKning funksional faol molekularini birinchi bo'lib 1972-1973 yillarda S. Koen, D. Helinskiy, G. Boyer va ularning yordamchilari yaratishgan.

1962 yilda V. Arber shuni kashf etdiki, bakteriyalarda o'zlarining (bakterial) DNKlarini faglarining begona DNK-sidan ajratib beradigan maxsus fermentlar mavjud. Ushbu fermentlar fag DNKsini u-yoki-bu darajada degradatsiyaga uchratib (soddalashtirib) uning ko'payish qobiliyatini pasaytiradi (ya'ni cheklaydi). Bunday fermentlar restriksiyalovchi (cheklovchi) endonukleazlar yoki restriktazalar deb nomlangan. Restriksiyalovchi fermentlarining tabiiy vazifasi bakteriyalarni viruslardan himoya qilishdir. Bakteriyalar DNKsining restriksiya saytlari (restriktazaning bog'lanish nuqtalari) metilizatsiya (metil guruhlari qo'shilishi) orqali o'zgartiriladi, shu sababli restriktaza o'z DNK-sini parchalay olmaydi. Ammo virusli DNK metil guruhlari tomonidan himoyalangan va fermentlar uni parchalaydi.

Birinchi restriktaza X. Smit va uning sheriklari tomonidan 1970 yilda Haemophilus influenzae bakteriyasidan ajratib olingan, bu ferment ikki zanjirli DNKni aniq belgilangan nuqtalarda kesish qobiliyatiga ega. Bu ferment Hind III deb nomlangan.

Restriktazalarining uchta turga bo'lish mumkin: ular DNKni "tanishi" va parchalashi yo'llari, oqsilning tuzilishi va reaksiya uchun zarur bo'lgan sharoitlar bo'yicha. Gen muhandisligida ikkinchi turdagi restriktazalar qo'llaniladi, ular DNKni ma'lum nuqtalarini "tanib oladi" va parchalaydi. Odatda, ferment palindrom bo'lgan 4-6 nj uzunlikdagi ma'lum bir ketma-ketlikni "taniydi" va uni o'rtasidan yoki bir nechta yon tomonidan kesib tashlaydi. Ikkinchi holda, "yopishqoq" deb nomlangan bir zanjirli uchlar hosil bo'ladi. Bir xil restriktaza ta'sirida hosil bo'lgan "yopishqoq" uchlar bir-biriga komplementarligi sababli

o'zaro gibridlanishi mumkin. Bu keyinchalik turli xil DNK molekularini birlashtirishga imkon beradi.

Gen muhandisligida keng qo'llaniladigan EcoRI va BamHI fermentlari "yopishqoq" uchlarni xosil qiluvchi restriktazalarga misol bo'la oladi. Birinchisi *E. coli* shtammida mavjud bo'lgan R plazmid bilan kodlangan, ikkinchisi *Bacillus amyloliquefaciens* hujayralarida topilgan. To'liq ikki zanjirli ("to'mtoq") uchlarni hosil qiluvchi restriktazalarning misoli Haelll *Haemophilus aegyptium* shtammidan ajratilgan (16-rasm).

Restriktaza nomi	Ular tanib olib, parchalaydigan ketma-ketliklar
Bam H I	5'-G-1G-A-T-C-C-3' 3'-C-C-T-A-G1-G-5'
EcoR I	5'-G1-A-A-T-T-C-3' 3'-C-T-T-A-A-1G-5'
Hind III	5-A-1A-G-C-T-T-3' 3'-T-T-c-G-A-1A-5'
Hae III	5'-G- G-C-1C-3' 3'-C-1C-G- G-5'
Hpa II	5'-C1-C-G-G-3' 3'-G-G-C-1C-5'
Sma I	5'-C1-C-C-G-G-G-3' 3'-G-G-G-C-C-1C-5'

15-rasm. Ba'zi restriktazalar va ular tanib olib, parchalaydigan ketma-ketliklar.

Restriktazalar qaysi organizmdan ajratilgan bo'lsa, o'shaning nomi bilan belgilanadi. Bakterial turlar nomidan uchta harf ishlatiladi, masalan, *Bacillus globigi* dan BgIII, *E. coli* dan EcoRI, *Haemophilus influenzae* HindIII. Uchta harfdan keyin ma'lum bir shtammni ko'rsatadigan harf va Rim raqamini qo'yiladi.

Hozirgi kunda DNKni deyarli 120 xil ketma-ketlikda parchalaydigan 400 dan ortiq restriktazalar ma'lum.

5.4. Molekulyar klonlash uchun vektorlar.

Vektor - bu DNKning klonlanadigan bo'lagini ko'chirib oladigan DNK molekulasidir. Har qanday vektor mustaqil ravishda ham rekombinant DNKning barqaror nasllanishini ta'minlashi kerak. Bundan tashqari, vektor gen muhandislik muolajalarini osonlashtiradigan qo'shimcha xususiyatlarga ega bo'lishi mumkin, masalan, unga begona DNK kiritilganda inaktivatsiyaga uchraydigan ("o'chiriladigan") markerga ega bo'lishi mumkin.

Molekulyar klonlash uchun vektor tizimlari odatda plazmidalar va bakteriofaglarining replikonlari asosida yaratiladi.

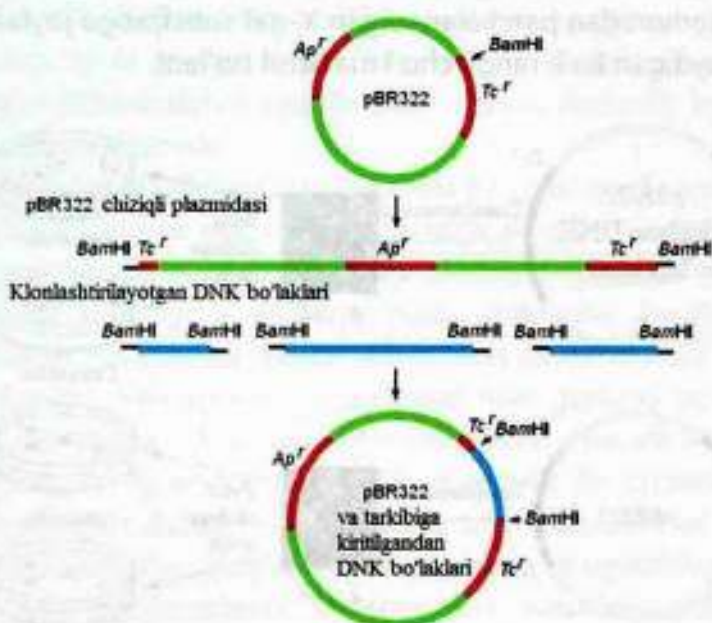
Bakterial hujayrada klonlash uchun vektor sifatida ishlatiladigan plazmida quyidagi elementlarni o'z ichiga olishi kerak: 1) DNK normal replikasiyasi va plazmidaning ushbu bakteriya turidagi hujayralarida ko'payishi uchun ori sayti (replikatsiya boshlanadigan joy); 2) O'z ichiga begona DNK fragmentini olgan plazmidaga ega bo'lgan hujayrani tanlashga imkon beradigan dominant selektiv marker; 3) Noyob restriksiya sayti, ya'ni vektorda faqat bir marta uchraydigan.

Yaxshi o'rganilgan pBR322 va pUC9 plazmida vektorlari kichik ColEI plazmidasidan kelib chiqadi, bu plazmida E. coli hujayralarida xromosomadan alohida ko'payadi va har bir hujayrada 10-20 nusxada mavjud bo'ladi. Bakteriyalarni ma'lum sharoitdagi muhitga joylashtirib, ushbu plazmidalarning selektiv amplifikatsiyasiga (tanlab olib ko'paytirishga) erishish mumkin, natijada ular har bir hujayrada 1000 nusxani tashkil qiladi. PBR322 plazmidasida ampitsillin (Ap') va tetratsiklin (Tc') antibiotiklariga chidamlilik genlari mavjud.

Tc' genida BamHI restriktazasi tomonidan kesiladigan noyob sayt mavjud (17-rasm). Plazmida DNKsini BamHI restriktazasi parchalaganidan so'ng, maxsus "yopishqoq" uchlari bo'lgan bir zanjirli DNK hosil bo'ladi. Bu bir zanjirli DNK klonlanayotgan DNK parchalari bilan aralashtiriladi (shuningdek BamHI bilan parchalangan, va xuddi shunday "yopishqoq" uchlari hosil bo'lgan). Yuqori haroratda DNK ligaza yordamida ular "tikiladi" va begona DNKni o'z ichiga olgan plazmida hosil bo'ladi. Ushbu plazmidaga kiritilishi mumkin bo'lgan eng katta DNKning hajmi 10 ming nj ni tashkil qiladi.

Begona bo'lakni plazmidaga kiritish jarayoni singari, plazmidaning E. coli hujayrasida transformatsiyalanishi (o'zgarishi)

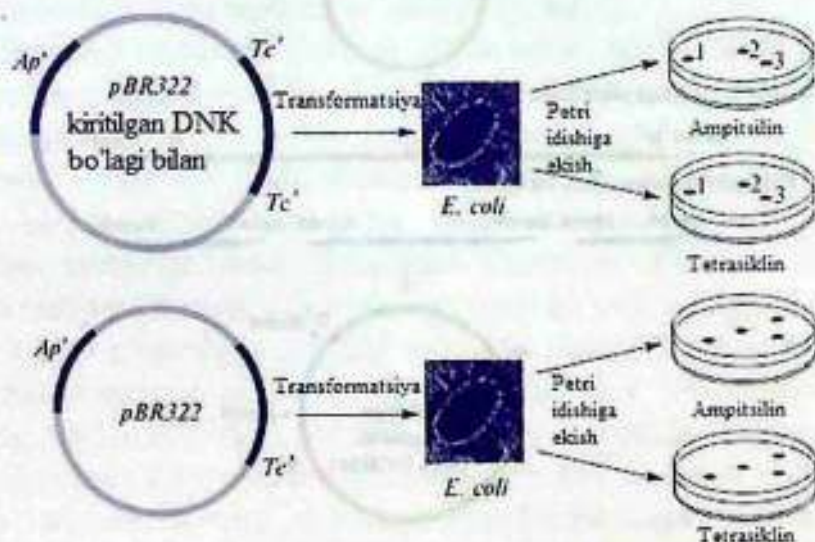
ham statistik jarayon bo'lib, uning natijasida uchta turdagi hujayralar paydo bo'lishi mumkin: plazmidani o'z ichiga olmaganlar, begona bo'lakni qo'shmagan plazmidani o'z ichiga olganlar, begona bo'lakni qo'shgan plazmidani o'z ichiga olganlar. Kerakli (begona DNK bo'lagini qo'shgan plazmidani o'z ichiga olgan) hujayralarni tanlab olish uchun maxsus sxemadan foydalanishadi (18-rasm).



16-rasm. Klonlangan DNK parchalarini pBR322 plazmidiga kiritish sxemasi.

pBluescript II KS (+/-) plazmidasi vektor sifatida keng qo'llaniladi. Uzunligi 2961 nj bo'lgan bu halqa molekulasida boshqa plazmid - pUC19 asosida yaratilgan. PBluescript plazmidasi har bir hujayrada 100 gacha nusxalar hosil qilishga qodir; maxsus marker - bu ampitsilinga chidamlilik genidir (Ap^r). Bu plazmida bitta hududda yig'ilgan bir qator noyob restriksiya saytlariga ega. Bunday saytlar polilinker yoki ko'plab marta klonlashtirish sayti (inglizcha *multiple cloning site*, MCS) deb ataladi. PBluescript plazmidasida, uzunligi 200 nj bo'lgan MCS hududi 20 tagacha restriksiya saytlarini o'z ichiga

oladi va lacZ genining 5'-oxiriga yaqin joylashadi. Plazmidlar lacZ geni bo'yicha mutant hujayralarga kiritiladi va ular o'stiriladi, natijada bu genning normal faolligi uning plazmidida tarkibida ishlashi tufayli ta'minlanadi. Begona DNKning polilinker hududiga kiritilishi sababli plazmidadagi lacZ genining faoliyati ham buziladi. Normal va mutant genlarni o'z ichiga olgan bakteriyalarning osonlik bilan ajratib olish mumkin. Agar mutant hujayralar β -galaktozidaza (lacZ genining mahsuloti) tomonidan parchalanadigan X-gal substratiga joylashtirilsa, suvda erimaydigan ko'k rangli cho'kma hosil bo'ladi.



17- rasm. Klonlangan DNK parchalarini o'z ichiga olgan plazmidlarni aniqlash sxemasi.

Plazmidada kiritilgan hujayralar ampitsillinli muhitda yashash qobiliyatiga qarab tanlab olinadi. Begona DNKli plazmidalari bo'lgan hujayralar bo'yalmagan koloniyalarni hosil qiladi. Agar koloniyalar ko'k rangda bo'lsa, unda bu hujayralardagi plazmidalarda begona DNK mavjud emas.

Bakterial sun'iy xromosomalar (inglizcha BAC - *bacterial artificial chromosome*) *E. coli* ning F-plazmidasidan hosil bo'ladi. Ushbu plazmidada nafaqat uning DNKsi replikatsiyasini, balki hujayradagi nusxalar sonini boshqaradigan genlar mavjud. Tartibga soluvchi genlar: *oriS*, *repE* (F-omilning bir tomonlama replikatsiyalanishini boshqarish), *par A* va *par B* (*E. coli* hujayralarida nusxalar sonini 1-2

dan oshirmay ushlab turish). Bundan tashqari, plazmidada xloramfenikolga chidamlilik genlari (Cm^r) va klonlash segmenti mavjud. Klonlash segmenti tarkibiga quyidagilar kiradi: bakteriofaglarining λ cosN va P1loxP saytlari (bu ikkala sayt restriksion xaritalarini qurish uchun foydalaniladigan chetlarni olish imkonini beradi), ikkita insertsiya (qo'shilish) sayti (Hind III va Bam H I), shuningdek -C-G- ketma-ketliklariga boy bo'lgan restriksiya saytlari (NotI, EagI, XmaI, SmaI, BglI va SfiI). Klonlangan parcha hajmi taxminan 300 ming nj ni tashkil qiladi. Klonlangan DNKni o'z ichiga olgan hujayralar koloniyalarini ajratib olish uchun filtrlarda ushbu DNKni gibridizatsiya qilishadi.

Ba'zida plazmidalar eukariotlarda ham uchraydi, ammo ularning aksariyati fenotipda namoyon bo'lmaydi va ularni faqat molekulyar usullar yordamida aniqlash mumkin. Ulardan eng yaxshi o'rganilgani - bu achitqi ichidagi 2 mikronli halqa (inglizcha 2 μ -circle). Ushbu plazmidani ham klonlash uchun vektor sifatida qo'llashadi.

Tuproq bakteriyalari plazmidalari ham genlarni ko'chirib o'tish uchun ishlatiladi. Masalan, *Agrobacterium tumifaciens*ning Ti plazmidasi va *Agrobacterium rhizogenes*ning Ri plazmidasi. Ushbu bakteriyalar ikki pallali o'simliklarning tahminan 60% ni va ba'zi bir pallali o'simliklarni yuqtiradi, kasallangan o'simliklarda "tojsimon gallar" (*A. tumifaciens*- o'simtasimon shishlar), yoki "pahmoq ildizlar" (*A. Rhizogenes*) paydo bo'ladi. Ushbu bakteriyalarning transformatsiyalovchi (o'zgartiruvchi) omillari - katta plazmidalar: Ti (inglizcha *tumor inducing* - o'simtani qo'zg'atuvchi) va Ri (inglizcha *root inducing* ildiz qo'zg'atuvchi). Ti plazmidasi - bu pUC19 ga o'xshash xalqasimon DNK, lekin juda katta hajmi bilan farq qiladi (pUC19 da 2.69 ming nj bo'lsa, Ti da - 200 ming nj bor). Unda quyidagi tarkibiy qismlar bor: replikatsiyani boshlovchi sayt, T-hudud (T - *transfer*, yani uzatish - plazmidadan ajralib, hujayra yadrosiga uzatiladi), T-hududning chap va o'ng (LB - *left border* va RB - *right border*) chegaralari deb ataladigan 25 nj uzunlikdagi ikkita takrorlanishlar, VIR (virulentlik) hududi - T-hududni mezbon genomiga kiritish jarayonini boshqaruvchi oltita genni va bir qator boshqa genlarni o'z ichiga oladi. Transgenni mezbon genomiga muvaffaqiyatli kiritish uchun faqat LB va RB o'rtasida joylashgan hudud zarur, boshqa barcha funksiyalar esa plazmidaning ichida qoladi. Bunday

transformatsiya mexanizmi juda oddiy bo'lib chiqdi va Ti plazmidasi asosida turli xil vektorlar yaratildi. Selektiv markerlar sifatida T-hududga antibiotiklarga (kanamitsin, karbenitsillin) yoki gerbitsidlarga chidamlilik genlari kiritildi.

Yuqumli bakteriya o'simlikning shikastlangan qismi bilan o'zaro aloqa qilganda VIR hududi faol holatga o'tadi, uning faoliyati natijasida plazmidning chegara hududlarida, avval o'ngda (RB), so'ngra chapda (LB) bitta zanjirli chetlar paydo bo'ladi. Bitta zanjirli T-DNK molekulasi hosil bo'ladi, bakteriyadan o'simlik hujayrasi yadrosiga o'tkaziladi va uning xromosomasiga bakterial konyugatsiya jarayoniga o'xshash mexanizm orqali joylashadi. Shunday qilib, o'simlik xromosomasi plazmidaning T-hududiga kiritilgan transgeni o'z ichiga oladi. Markerlangan (belgilangan) genlarning mavjudligi tegishli antibiotiklar yoki gerbitsidlar qo'shilgan muhitda transformatsiyaga uchragan (o'zgartirilgan) hujayralarni yoki o'simliklarni tanlab olish imkoniyatini beradi.

Fag vektorlari orasida eng ko'p λ fagining hosilasi ishlatiladi. Fagning chap va o'ng yelkaları litik tsikl (mezbon hujayra genomiga birikish) uchun zarur bo'lgan barcha genlarga ega; lizogeniyani (mezbon hujayrasi nobud bo'lishini) boshqaradigan va yelkalar orasida joylashgan genlar esa, aksincha, olib tashlanadi. Bunday o'zgartirilgan faglar litik tsikldan o'tadi, ammo lizogenez bo'lmaydi. Ikki yelkaning orasiga ko'paytirish kerak bo'lgan DNK parchasi joylashtiriladi, bu parcha fagning rivojlanishi uchun kerak emas. O'zgartirilgan markaziy parchaning va har bir yelkaning birlashgan joyida bir xil restriksiya sayti mavjud, masalan, EcoRI. Ushbu fagning yelkalarida boshqa bunday sayt yo'q. Klonlash jarayonida fag DNKsi va klonlanayotgan DNK bo'lagi EcoRI yordamida parchalanadi, so'ngra bu parchalar aralashiriladi va yuqori haroratda ligaza fermenti yordamida uzilgan joylarida "qayta tikiladi".

λ fagi ichiga uzunligi 37-52 ming nj bo'lgan DNKni sig'dirish mumkin, shundan taxminan 30 ming nj ni yelkaları egallaydi, ya'ni, yelkalar orasiga kiritilgan bo'lak 7-22 ming nj uzunligida bo'lishi mumkin, o'rtacha 15 ming nj. Yelkalar orasiga qo'shimchalar kiritilmagan, yoki aksincha, juda katta qo'shimchalar kiritilgan faglar bakteriyalarni yuqtira olmaydi va ko'paymaydi. Kerakli o'lchamdagi

faglar *E. coli* koloniyalarida o'ziga hos blyashkalarni hosil qiladi (yani koloniyalar o'smay qolgan hududlar).

Ba'zi bakteriofaglarining nisbatan katta genomlari bor, bu ularga begona DNKning katta qismlarini kiritishga imkon beradi. Masalan, P1 fagida, uzunligi 110-115 ming nj bo'lgan genom bor, ushbu genom oqsil qatlamiga o'ralgan. Gen muhandisligi tajribalarida P1 fagi kerakli qismlari xalqasimon plazmidga kiritilgan. Shundan so'ng, P1 plazmidida vektorini 2 ta yelkaga "kesishadi", ular orasiga 100 ming nj gacha begona DNK kiritiladi. Rekombinant fag so'ngra tegishli mezbon-xujayralarda ko'paytiriladi.

Kosmidalar – bu tabiatda uchramaydigan, faqat sun'iy ravishda plazmidalar va faglar birikmasi natijasida yaratilgan vektorlar. Kosmida tarkibida quyidagilar mavjud: *ori* ketma-ketligi (*E. coli* hujayrasida ko'payish uchun), *Ap'* dominant selektiv markeri va DNK parchalarini kiritish va klonlash uchun noyob restriksiya saytlari. Bundan tashqari, kosmidalar λ fagidan kelib chiqqan *cos* saytiga ega. *Cos* saytlar - bu shunday hududlardir, ularda λ fagi genomining ko'plab nusxalari bitta uzun zanjirga birlashtirilgan, bu zanjir konkatomer deb nomlanadi. Ushbu zanjirni 48 ming nj hajmli qismlarga bo'lib chiqishadi va fag ichiga joylashtirishadi. Fagning *Cos* saytlari plazmidaga kiritiladi va natijada hajmi 5 ming nj bo'lgan kichik kosmidalar paydo bo'ladi. Bunday kosmidaga 35-47 ming nj hajmli DNK bo'laklari joylashtirilganda, molekula fag hosil bo'lishi uchun yetarli uzunlikka ega bo'ladi. Ushbu fag keyin *E. coli* hujayrasiga kiritiladi. Kosmida vektoridagi klonlangan DNK parchasining hajmi o'rtacha 35-45 ming nj ni tashkil qiladi.

Bunday vektorlar ikki yoki undan ko'p mezbon organizmlar hujayralarida ko'payish qobiliyatiga egadir. Masalan, YEp24 plazmidasi, achitqilar va *E. coli* hujayralarida ko'payish qobiliyatiga ega. Uning tarkibiy qismlari: *E. coli* ichida ko'payish imkonini beradigan *ori* ketma-ketligi, *Ap'*, *Tc'* selektiv markerlari (*E. coli* uchun), URA3 (achitqi hujayralari ichida uratsilning biosintezini boshqarish), shuningdek, achitqilarga xos bo'lgan 2 μ -circle ketma-ketligi - achitqi hujayrasida avtonom ravishda (o'z-o'zidan) ko'payishiga imkon beradi.

5.5. Achitqilar sun'iy xromosomalari (YAC).

Ushbu turdagi vektorlar quyidagi elementlarga ega: 1) har bir uchida telomeralar; 2) sentromerik ketma-ketliklar (CEN); 3) har bir yelkada selektiv markerlar (TRP1 va URA3 - triptofan va uratsilga chidamlilik); 4) avtonom ravishda ko'payadigan ketma-ketliklar – ARS, achitqi hujayrasida ko'paytirishga imkon beradigan; 5) YAC hududlari uchun noyob bo'lgan va DNKni kiritish vazifasini bajaradigan restriksion saytlar.

DNK klonlari achitqi hujayralariga transformatsiya orqali kiritiladi. Klonlarda chap va o'ng yelka borligiga amin bo'lish uchun, ularni TRP1 va URA3 markerlari bo'yicha tanlab olishadi. Klonlangan DNK ketma-ketliklarining o'lchamlari katta: odatda bir necha yuz ming juft nukleotidlar va undan ham ko'proq.

Genom kutubxonalarini yaratish. Genom kutubxonasi – bu shunday DNK klonlari to'plami to'plamiki, unda ma'lum bir turdagi organizm genomini tashkil etuvchi DNK parchalarining kamida bittadan nusxasi mavjud.

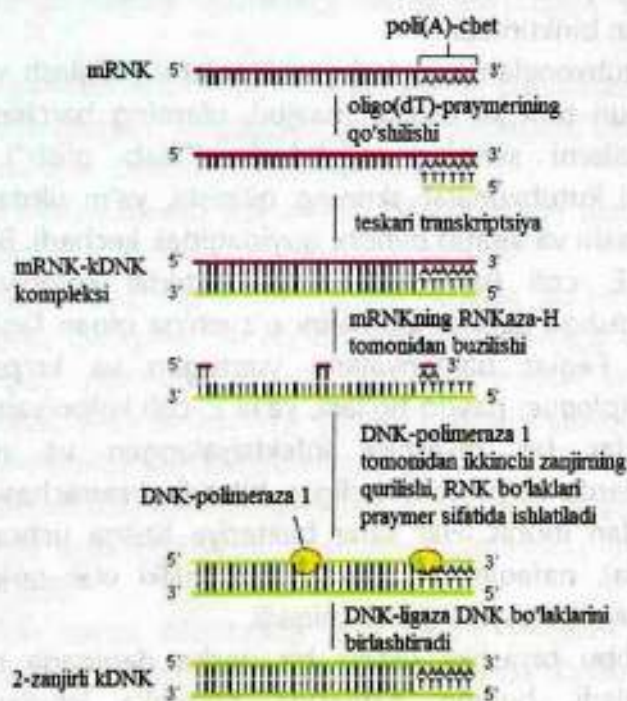
Individual xromosomalardan yoki ularning qismlaridan olingan shunga o'xshash to'plamlarga xromosoma kutubxonolari deyiladi.

Genom kutubxonalarini tayyorlash bosqichlari: umumiy DNKni ajratib olish, restriktaza fermentlari yordamida uning parchalash, olingan qismlarni plazmid yoki fag asosida yaratilgan vektor molekulalariga qo'shish va qabul qiluvchi bakteriyalarga rekombinant DNKni kiritish. Genom kutubxonalarini yaratishning uchta usuli ma'lum: 1. Genom DNK restriktaza fermenti bilan to'liq parchalanadi va keyinchalik klonlovchi vektorga kiritiladi. Ushbu usulning noqulayligi shundaki, klonlangan qo'shimchalar hajmi juda kichik: taxminan 4 ming nj; 2. DNK mexanik yo'l bilan parchalanadi (ultratovush ta'siri ostida, o'ta ingichka igna ichidan o'tkazish), bu nisbatan katta bo'laklarni olishga imkon beradi - 20-150 ming nj, ammo "yopishqoq" uchlari yo'qligi sababli qo'shimcha muolajalar kerak; 3. Restriktaza fermentlari yordamida qisman parchalash qo'llaniladi. Bu shuni anglatadiki, mavjud bo'lgan restriksiya saytlaridan faqat bir qismi kesish uchun ferment tomonidan ishlatiladi.

Ushbu usul kiritilgan DNK qismlari bo'yicha farq qiladigan bakteriyalar yoki rekombinant faglar klonlarining to'plamini olishga

imkon beradi. Birinchi genomlar kutubxonasi 1978 yilda T. Maniatis va yordamchilari tomonidan yaratilgan. Ular *D. melanogaster* genomidan olingan DNKni ishlatgan va uni *E. coli* hujayralarida klonlagan.

RNKga komplementar DNK nusxalari (kDNK, yoki cDNA) kDNK kutubxonasini tashkil qilishi mumkin. kDNK kutubxonasi RNK ajratilgan hujayralardagi gen faolligi spektrini aks ettirgani sababli, bunday kutubxonalarni yaratish va tahlil qilish, ayniqsa hujayralarning har xil turlarida gen faolligini taqqoslash uchun foydalidir. Shuni ham ta'kidlash kerakki, kDNK kutubxonasidagi klonlar yetuk, ya'ni protsessing jarayonidan o'tgan, mRNKlardir. Ularda intronlar mavjud emas.



18-rasm. Ikki zanjirli komplementar DNK sintezi.

Eukariotlarda faqat mRNKlar poli (A) + - dumlarga ega. Ushbu hususiyatdan foydalanib, mRNKni ajratib olishadi. Keyin, *in vitro* tizimida mRNK molekulasiga oligo (dT) qisqa zanjir qo'shiladi. Bu zanjir yuqori harorat ta'siridan so'ng qo'shimcha DNK zanjirini sintez qiladigan teskari transkriptaza (RNKga bog'liq DNK polimeraza) fermenti uchun praymer vazifasini bajaradi. Teskari transkriptaza

deyilishiga sabab - RNK \rightarrow DNK yo'nalishida, ya'ni teskari tomonga transkripsiya bo'lib o'tadi. Keyin, RNKaza H, DNK polimeraza I va DNK ligazasidan foydalanib, RNK zanjiri chiqarilib, uning o'rniga yangi DNK zanjiri sintez qilinadi, uning qismlari ligaza fermenti yordamida "tikiladi" (19-rasm).

kDNK molekulari sintez qilingandan so'ng ular klonlash uchun tayyorlanadi. T4 faginig DNK ligaza fermentidan foydalanib, kDNK molekulariga linker (bog'lovchi) DNK qo'shiladi. Bog'lovchi DNK – bu nisbatan qisqa 8-12 nj hajmli ikki zanjirli DNK. Bog'lovchi DNK restriktaza fermentlaridan biri "tanib oladigan" saytni o'z ichiga oladi. Ushbu sayt yordamida kDNK klonlari vektor DNK bilan ligaza fermenti tomonidan biriktiriladi.

Kutubxonalarda joylashgan klonlarni aniqlash va ularni ajratib olish uchun turli xil usullar mavjud, ularning barchasining mohiyati kutubxonalarni skrining qilishdadir ("elab olish"). Masalan, A-faglardagi kutubxonalar skrining qilinishi, ya'ni ulrdagi DNK-klonlar tahlil qilinishi va ajratib olinishi quyidagidek kechadi. Birinchidan, Petri idishida *E. coli* bakteriyalarining bakterial koloniyalari o'stiriladi, so'ngra idishga genom klonlarini o'z ichiga olgan faglar suspenziyasi qo'yiladi. Faglar bakteriyalarni yuqtirgan va ko'paygan joylarda blyashka (*plaque*) paydo bo'ladi, ya'ni *E. coli* koloniyalarining yuzasida teshik. Har bir blyashka infeksiyalangan va nobud bo'lgan bakteriyalarda ko'payib ketadigan bitta fag zarrachasining ko'p sonli avlodlaridan iborat. Har safar bakteriya lizisga uchraganida (nobud bo'lganida), nafaqat fag zarrachalari, balki ular tarkibidagi DNK – klonlari ham ko'payib, ajralib chiqadi.

Ushbu blyashka ustiga bir necha daqiqaga membrana filtri joylashtiriladi, buning natijasida blyashka ichidagi DNK unga bog'lanadi. Filtr ishqor eritmasiga joylashtirilganida DNKning denaturatsiyasiga uchraydi va bitta zanjirli DNK hosil bo'ladi. Shundan so'ng, filtrlar markerli (belgilangan) zond bilan inkubatsiya qilinadi. Belgilangan zondni blyashkadagi DNK bilan gibridlash natijasida u fotoplyonkada qora nuqta ko'rinishiga keladi. Shu nuqta joylashishi bo'yicha bakterial koloniyada blyashka topiladi. Ushbu blyashka ichidagi faglarni to'plab, yangi bakteriyalarni yuqtirilsa, faglarni yanada ko'paytirish va shunga mos ravishda molekulyar tahlil uchun yetarli bo'lgan miqdordagi DNK-klonlar sonini hosil qilish mumkin.

5.6. Restriksion xaritalarni tuzish.

Klonlangan DNK ketma-ketliklari DNK molekularining gomogen (bir hil) populyatsiyasi bo'lganligi sababli ularning restriktaza fermentlar tomonidan bo'linishi kichikroq diskret (alohida) bo'laklarning paydo bo'lishiga olib keladi. Maxsus tahlil yordamida DNK molekulasida restriksiyalangan (cheklangan) bo'laklarning joylashishini aniqlash, ya'ni restriksion xaritasini tuzish mumkin.

Restriksion xaritalarni tuzishning ko'plab yo'li mavjud. Aniq, batafsil va foydali xaritani olish uchun odatda bir necha yo'l qo'llaniladi. Ularning eng keng tarqalgani quyidagilar:

1. DNKni bir necha restriktaza fermentlari bilan bir vaqtda parchalash;
2. Tanlangan restriksion bo'lakni ketma-ket parchalash;
3. Markerlanmagan (belgilovchi zond kiritilmagan) DNK yoki bir uchidan markerlangan DNKni qisman parchalash;
4. DNKni ekzonukleaza fermentlari bilan qisman parchalash va undan keyin restriktaza fermentlari bilan parchalash.

Ushbu usullarning qaysi biri har bir holatda qo'llanilishi ko'p sabablarga bog'liq. Olingan DNK bo'laklarining o'lchamiga ko'ra, hech bo'lmaganda bazi parchalanish nuqtalarining nisbiy joylashishini aniqlash mumkin. Fermentlarning juftlashtirilgan kombinatsiyalari sonining ko'payishi bilan joylashishi aniqlangan saytlar soni ko'payadi, bu jarayonni takrorlashadi va nuqtalarning joylashishi haqida yanada aniq ma'lumotga ega bo'lishadi. Natijada restriksion saytlarning xaritasi hosil bo'ladi.

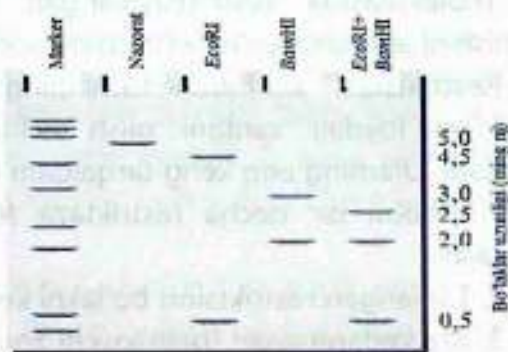
Restriksion xarita tuzishning eng oddiy misolini quyidagi. Aytaylik, 5 ming nj hajmli DNK bo'lagi klonlandi. DNKning bitta alikvotasiga (eritmaning ma'lum bir qismi) EcoRI restriktaza fermentini, ikkinchisiga BamHI, uchinchisiga - ikkalasining aralashmasini qo'shishadi. Parchalarni elektroforez yordamida ajratgandan so'ng, ularning o'lchamlarini boshqa, ulchovi aniqlangan, DNK bo'laklari (DNK o'lchovi markerlari) bilan taqqoslash orqali aniqlash mumkin. Elektroforezdan keyin gel etidiy bromidi bilan bo'yaladi va ultrabinafsha nurida suratga olinadi.

DNKning 5 ming uj hajmi klonlangan chiziqli bo'laklari

Restriktazalar bilan parchalash va agaroz gelda elektroforez qilish

Uzun bo'laklar -

Kalta bo'laklar +



Marker bo'laklari uzunligi bo'yicha kalibrovka egrisini tuzish va tahti qilinayotgan bo'laklar uzunligini aniqlash



5 mmi

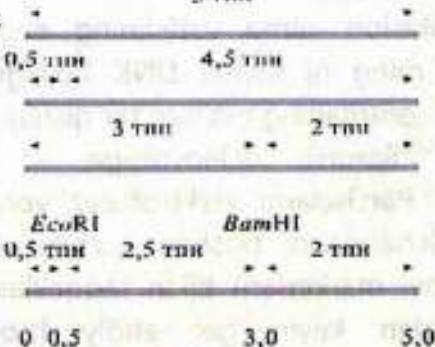
Parchalanmagan DNK

EcoRI

Restriksiya haritasining tuzilishi

BamHI

Yakuniy restriksiya harita



19-rasm. *EcoRI* va *BamHI* fermentlarining restriksiya saytlari asosida restriksiya xarita tuzish.

Olingan fotosuratlarda har bir parcha elektroforez ta'sirida boshlang'ich nuqtadan bosib o'tgan masofani o'lchashadi. Molekulyar o'lchami ma'lum bo'lgan markerlar uchun ham o'tigan masofa aniqlanadi va kalibrlash egrisi chiziladi. Keyin, bu egri chiziqda har bir bo'lakning joylashishi u o'tgan yo'lning uzunligiga qarab topiladi va uning o'lchamlari aniqlanadi. Keltirilgan misolda (20-rasm), ZfcoRI restriktazasi ta'siridan keyin ikkita parcha paydo bo'ladi - 4,5 va 0,5 ming nj. Bu shuni anglatadiki, boshlang'ich DNK bo'lagida faqat bitta restriksiya nuqtasi mavjud va ushbu nuqta bo'lak uchlarning biridan 0,5 ming nj masofada joylashgan. Xuddi shu mantiq bo'yicha, bitta BamIII restriksiya sayti mavjud, u uchlarning biridan 2 ming nj masofada joylashgan. Ikkala restriktaza fermenti birlashgan ta'siri ostida boshlang'ich bo'lak uchta qismga parchalanadi: 2,5, 2.0 va 0,5 ming nj. Ushbu parchalarni yakuniy restriksion haritada shunday joylashtirish kerakki, yuqorida keltirilgan, restriktaza fermentlardan har birining alohida ta'siri natijasida, olingan ma'lumotlarga zid kelmasligi kerak.

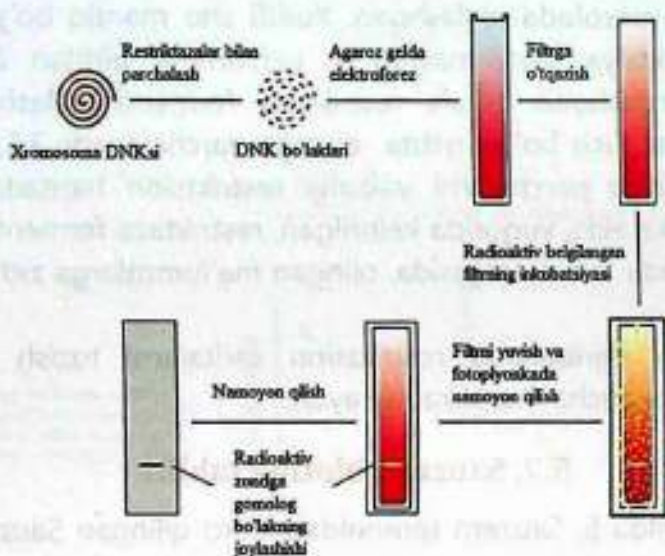
Haqiqiy tajribalarda restriksion xaritalarni tuzish keltirilgan misoldan ko'ra ancha murakkab jarayon.

5.7. Sauzern bloting tahlili.

1975 yilda E. Sauzern tomonidan ixtiro qilingan Sauzern - blot (inglizchadan to'g'ridan-to'g'ri "Janubiy dog' " – Edvin Sauzern dog'i) tahlili xromosomalar tuzilishidagi o'zgarishlarni fizik xaritada aniqlash, gen joylashishini aniqlash, takrorlanishlarni aniqlash, "xromosoma yurishi" va boshqalarni aniqlash imkonini beradi. Odatda DNK parchalarini ajratish uchun agaroz gelida elektroforez ishlatiladi. Gel tarkibidagi DNKni denaturatsiya qilinshadi va gelga nitroselulozali filtr qo'yiladi. DNK filtrga o'tkaziladi, va yuqori harorat yoki ultrabinafsha bilan ishlov berish orqali fiksatsiya qilinadi ("qotiriladi"). Ushbu muolaja namlangan qog'ozni siyohi qurimagan yozuvli matoga qo'yishni eslatadi (ingliz tilidan, blotting – "namlash", "dog' qoldirish"). Bir qator qo'shimcha muolajalardan so'ng elektroforez ta'sirida gelda parchalangan DNKning barcha fraktsiyalari filtrga o'tkaziladi. Keyin filtrni gibridizatsiyalovchi bufer eritmasiga joylashtirishadi, eritma tarkibida markerli zond (radioaktiv izotop yoki kimyoviy belgi) mavjud.

Ushbu zond DNKning komplementar sayti bilan bog'lanadi. Filtrni yuvgandan keyin signalni aniqlashni boshlash mumkin. Agar zond radioaktiv bo'lsa, filtrga rentgen plyonkasi qo'llaniladi va nurlanish maydoni aniqlandi. Agar zond kimyoviy modifikatorlar yordamida belgilangan bo'lsa, unda detektsiyani (aniqlashni) xuddi shu filtrda amalga oshirishadi.

DNK xaritasida inversiyaning uzilib qolish nuqtasini xaritalash uchun Sauzern bloting tahlili ishlatilishiga misol 21 rasmda keltirilgan.



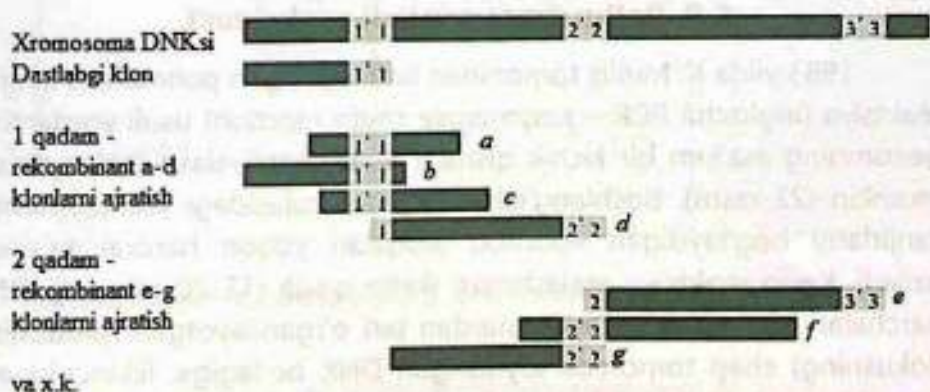
20-rasm. Sauzern bloting gibrizatsiyasi sxemasi.

"Xromosoma bo'yicha yurish." 1979 yilda W. Bender, P. Spierer va D. Hogness tomonidan taklif etilgan "xromosoma bo'yicha yurish" usuli yordamida klonlash jarayoni DNKning uzun parchalarni (traktlarini) olish imkonini beradi. "Yurishni" boshlash uchun ma'lum bir zond kerak, ya'ni xromosomaning ma'lum bir hududidan DNK bo'lagi kerak: bu genning DNKsi yoki P-elementining DNKsi bo'lishi mumkin, shu zondni insertsiyasidan (kiritilishidan) so'ng, u klonlangan genda mutatsiyani qo'zg'atishi kerak. "Yurish" - bu genom kutubxonasi bo'lgan DNK bo'lagiga chegaradosh bo'lgan DNK bo'laklari klonlarini aniqlash jarayoni.

"Yurish" jarayoni quyidagi bosqichlarni o'z ichiga oladi: 1) boshlang'ich zondni olish; 2) genom kutubxonalarida qidirish; 3)

klonni ajratib olish va restriksion xaritasini tuzish; 4) yangi zondni ajratish va kutubxonalarda izlash.

Boshlang'ich DNK klonini qandaydir tarzda olish kerak. Ushbu klonning markerlangan cheti (21-rasm, 1) A-fagi yoki kosmidalar asosida yaratilgan kutubxonani skrininglash uchun ishlatiladi va barcha rekombinatsiyalangan faglar tanlab olinadi. Odatda, bir nechta faglar tanlanadi (21-rasmda *a-d*). Kerakli yo'nalispda "yurish" uchun, olingan barcha klonlar xromosomaning chetiga eng yaqin 1'-bo'lagi bilan bir hillikka tekshiriladi, 1'-bo'lagi bilan bir hil bo'lgan klonlar (teskari yo'nalishda ketgan) olib tashlanadi, va faqat 1-bo'lagi (markerlangan chekka bo'lak) bilan bir hil bo'lgan klonlar tanlab olinadi (rasmda *d*-kloni). Tanlab olingan *d* kloni, xromosomalarda *in situ* gibridlanadi (joylashishi aniqlanadi), shu tariqada u genomda xuddi boshlang'ich klon joylashgan hududda ekanligiga ishonch hosil qilishadi. Keyin *d*-klonining restriksion xaritasi tuziladi va yana ikkita bo'lak: 2 (cheti belgilangan) va 2'(unga eng yaqin bo'lak) tanlab olinadi. Ushbu klonni zond sifatida ishlatib, kutubxona skrining qilinadi. Yangi olingan klonlardan faqat 2' bo'lagi bo'lmaganlari tanlanadi, ya'ni *e* klonlari. So'ngra muolajalarning barchasi 3 va 3' bo'laklari bilan takrorlanadi va hokazo. "Yurish" yordamida xromosoma DNKsining uzun bo'laklari klonlanadi. Drozofila genomidan 800 ming nj hajmli bo'lak klonlangan bir hodisa ma'lum.



21- Rasm. "Xromosoma bo'ylab yurish" sxemasi.

Usulning noqulayliklari bor, masalan, agar zond sifatida qo'llanilayotgan DNK bo'lagidagi ketma-ketlik genom bo'ylab ko'plab

marta takrorlansa, uni klonlash juda murakkab bo'lib qoladi. Bunday holda, birinchi qadam xromosomaning bir qismida, ikkinchisi - boshqa qismda (takrorlanadigan ketma-ketlik joylashishi aniqlangan nuqtada) amalga oshirilishi mumkin. Yana bir noqulaylik - bu har bir qadamning qisqa masofasi.

5.8. Nozern bloting tahlili.

Sauzern blotingga o'xshash, ammo RNKni tahlil qilish uchun ishlatiladigan usul Nozern bloting deb nomlanadi. 1977 yilda J. Alwine, D. Kemp va G. Stark tomonidan ishlab chiqilgan. Bu usulda, hujayradan ajratilgan RNK molekulalari gel elektroforez yordamida uzunligi bo'yicha bo'linadi va keyin filtrga o'tkaziladi. Marker bilan belgilangan bitta zanjirli DNK zond bilan gibridizatsiyalashtirgandan so'ng, elektroforegrammada RNKning ma'lum bir hududi va DNK zondining bir hilligini anglatuvchi signal aniqlanadi. Molekulyar massa markerlaridan foydalanib, ushbu gen transkriptining hajmini aniqlash mumkin.

Nozern bloting quyidagi tajribalarda qo'llaniladi: 1) ma'lum bir gen kodlaydigan mRNK hajmini aniqlash uchun; 2) ma'lum bir gen kodlaydigan mRNK u yoki bu hujayrada mavjudligini, ya'ni shu genning ekspressiya (faollik) darajasini aniqlash; 3) hujayra rivojlanib borarkan, unda ushbu RNK miqdori qanday o'zgarishini aniqlash.

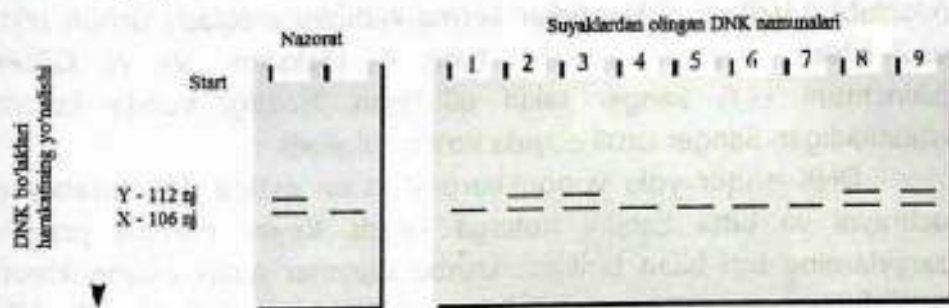
5.9. Polimeraza zanjirli reaksiyasi.

1983 yilda K. Mullis tomonidan ixtiro qilingan polimeraza zanjirli reaksiya (inglizcha PCR – *polymerase chain reaction*) usuli yordamida genomning ma'lum bir kichik qismini amplifikatsiyalash (ko'paytirish) mumkin (22-rasm). Boshlang'ich DNK molekulasidagi komplementar zanjirlarni bog'laydigan vodorod aloqalari yuqori harorat ta'sirida uziladi. Keyin reaksiya aralashmasi ikkita qisqa (12-20 ming nj) DNK parchalari ishtirokida soviydi, ulardan biri o'rganilayotgan hududning (lokusning) chap tomonida joylashgan DNK bo'lagiga, ikkinchisi esa o'rganilayotgan lokusning o'ng tomonidagi DNKning boshqa zanjirining bo'lagiga komplementardir. Praymerlar deb nomlangan ushbu parchalar DNKning tegishli nuqralari bilan bog'lanadi va DNK matritsasida yangi qo'shimcha komplementar zanjirni sintez qilish

uchun boshlang'ich nuqtani belgilaydi. Ushbu sintezini DNK polimeraza fermenti amalga oshiradi. Keyingi tsiklda olingan DNK zanjirlari aralashmasi yana isitiladi va yangi sintezlangan DNK zanjirlari matritsa sifatida ishlatiladi. Praymerlarning yangi partiyasi mos keladigan saytlarni bog'laydi va yangi sintez tsikli sodir bo'ladi. Tirik hujayrada DNK polimeraza hujayra bo'linishi paytida DNK replikasiyasini amalga oshiradi, ya'ni genom DNKni to'liq ishlab chiqaradi. PZR paytida ikkala praymer orasida joylashgan faqat kichik bir qism sintez qilinadi. 30 tsikl davomida sintez qilingan parchalar soni 1 milliardga yaqinlashadi.

DNK 94-95 ° C haroratda isitiladi va 60 ° C da soviydi; oddiy DNK polimerazasining normal ishlashi uchun bu harorat juda yuqori. Shuning uchun issiq buloqlarda yashaydigan *Thermus aquaticus* bakteriyalaridan ajratilgan maxsus ferment (Taq-DNK polimeraza) ishlatiladi.

PZR usuli quyidagi tahlillarning asosidir: sud tibbiyotida shaxsni aniqlash, odamlar orasidagi qarindoshlikni aniqlash. Hususan, oxirgi rus podshoxi oilasining o'ldirilishi tergov davomida 9 kishi suyaklarining qoldiqlaridan grammlarda o'lchangan DNK miqdorlari ishlatilgan: taxminan 20 ta pikogram (10 ga yaqin hujayrada shuncha DNK mavjud).



22-rasm. Suyak qoldiqlarining DNKsi tahlili bo'yicha jinsni aniqlash.

DNK bo'yicha jinsni aniqlash shunga asoslanganki, inson jinsi X va Y-xromosomalarida ikkita allel holatida bo'lgan gomologik gen joylashgan. Ushbu gen tish emalining tarkibiy qismini - amelogeninni kodlaydi, Y xromosomasida X xromosomasiga qaraganda 6 nj ga uzunroq. DNK tarkibida Y xromosomasi bor-yo'qligini aniqlash uchun,

butun genom DNKdan faqat amelogenin genining X va Y xromosomalarida farq qiladigan bo'lagi tahlil qilinadi. Ushbu bo'lakning kattaligi umumiy genom hajmidan o'ttiz million marta kichikroq.

Olingan PZR-bo'laklarining hajmini aniqlash uchun ular agaroz gelida elektroforez bilan ajratiladi. 21-rasmda suyak qoldiqlaridan olingan DNKdagi amelogenin genining parchalarini ajratish natijalari ko'rsatilgan. O'ng tomondagi to'qqiz yo'lakda tahlil qilingan DNK qismlari mavjud. Chap tomonda nazorat namunalari bo'lgan ikkita yo'lak: erkak va ayolning qonidan ajratilgan genom DNKsi asosida sintez qilingan qismlar. Erkaklarda ikkita parcha hosil bo'ladi: 112 nj (Y xromosomasidagi amelogenin geniga mos) va 106 nj (X xromosomasidagi huddi shu genga mos keladi). Ayollarda ikkita X xromosomasi bor, ularning har biri 106 nj hajmli bo'lak hosil qiladi. O'rganilgan to'qqizta namunalarning 4tasida ikkita chiziq, 5tasida esa bitta chiziq ko'rinadi. Binobarin, halok bo'lganlar orasida 4 erkak va 5 ayol bo'lgan. 1918 yil iyul oyida Yekaterinburgda otib o'ldirilgan qirollik oilasida aynan shuncha ayollar bo'lgan.

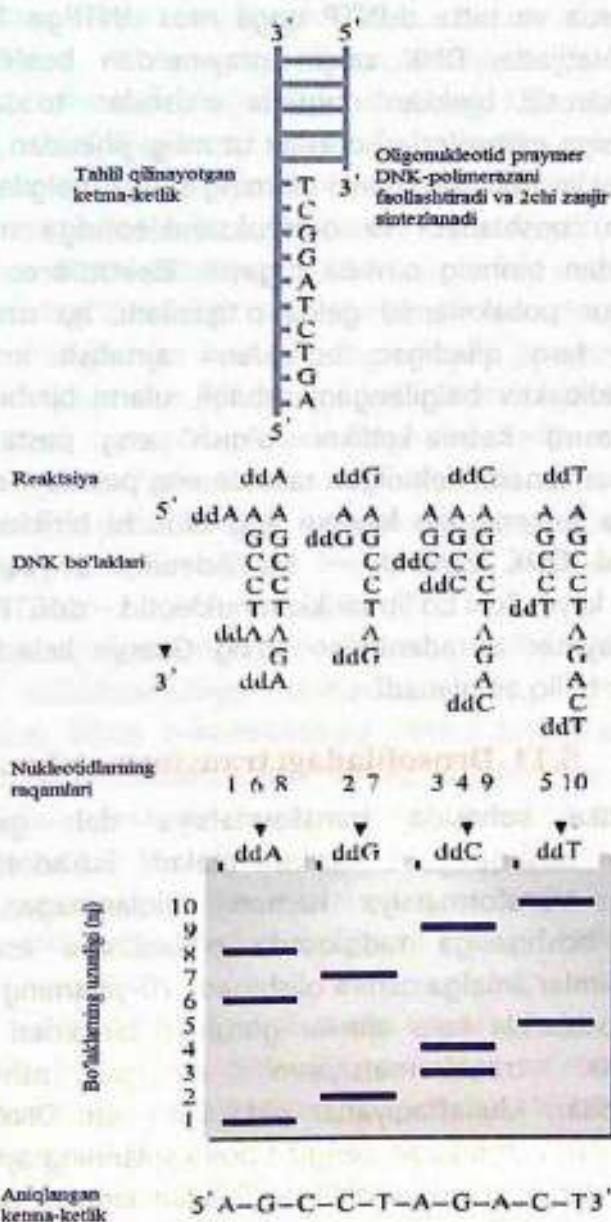
5.10. Nukleotidlarning ketma-ketligini aniqlash (sikvenslash).

XX asrning 70-chi yillarida DNKning bo'laklarini ko'paytirib (klonlab), ulardagi nukleotidlar ketma-ketligini aniqlash uchun ikkita usul ishlab chiqilgan. Ulardan birini A. Maksam va W. Gilbert, ikkinchisini - F. Sanger taklif qilishgan. Hozirgi kunda ko'proq ishlatiladigan Sanger usuli quyida ko'rib chiqiladi.

DNK ishqor yoki yuqori harorat ta'siri ostida denaturatsiyaga uchraydi va bitta zanjirli holatga keladi. Keyin, maxsus praymer zanjirlarning biri bilan birikadi. Ushbu praymer qisqa oligonukleotid tuzilishiga ega (23-rasm). Oligonukleotid shunday yo'l bilan sintezlanadiki, uning 3'-cheti ketma-ketlik bo'yicha sikvens qilinayotgan ketma-ketlikdan oldin oxirgi bo'ladi. Oligonukleotid DNK polimeraza zanjirni to'ldirishi uchun praymer bo'lib xizmat qiladi.

Har bir sikvens tadqiqoti uchun bitta zanjirli DNK va unga birlashtirilgan praymer bilan to'rtta idishda reaksiya o'tkaziladi. Har bir idishda DNK hosil qiluvchi to'rt hil normal modda (dNTP - dezoksinukleozid) mavjud: dATP, dTTP, dCTP va dGTP, shuningdek

DNK polimeraza (ko'pincha T7 faginging DNK polimerazasi ishlatiladi), 4ta idishdagi aralashmalar bir-biridan shu bilan farq qiladiki, ularda didezoksinukleotid (ddNTP - ddATP, ddGTP, ddCTP, yoki ddTTP) deb nomlangan o'zgartirilgan asoslar mavjud, bu nukleotidlarda dezoksinuklotidlardan farqli o'laroq 3'chetda OH o'rniga H bo'ladi.



23-rasm. Nukleotidlarning ketma-ketligini aniqlash uchun tajriba sxemasi.

Didezoksinukleotid o'sib borayotgan DNK zanjiriga qo'shilishi mumkin, ammo bu yerda sintez to'xtaydi, chunki 3'-OH yo'qligi fosfodiferning keyingi nukleotid bilan bog'lanishiga to'sqinlik qiladi. ddNTPlar 32P, 33P yoki 35S izotoplari bilan radioaktiv ravishda yoki radioaktiv bo'lmagan yo'l bilan belgilanadi. Har bir idishga 4 hil dNTP teng miqdorda va bitta ddNTP unga mos dNTPga 100:1 nisbatda qo'shiladi. Natijada, DNK zanjiri praymerdan boshlab o'sadi va didezoksinukleotid birikkan nuqtada o'sishdan to'xtaydi. Shuning uchun reaksiya mahsulotlari orasida uzunligi jihatidan farq qiladigan ko'plab bo'laklar mavjud, chunki ularning sintezi belgilangan nuqtada (praymerdan) boshlanadi va didezoksinukleotidga mos keladigan nukleotidlardan birining o'rnida tugaydi. Elektroforez agaroz gelda emas, maxsus poliakrilamid gelda o'tqaziladi, bu uzunligi xatto 1 nukleotidga farq qiladigan bo'laklarni ajratish imkonini berdi. ddNTPlar radioaktiv belgilangani sababli, ularni bir-biridan farqlash oson. (23-rasm). Ketma-ketlikni "o'qish" eng pastki (eng kalta) bo'lakdan boshlanadi. Keltirilgan rasmda eng pastda 1 raqamli bo'lak, demak unda praymerdan keyingi eng birinchi birikkan nukleotid - ddATP (yani DNK zanjirida - bu Adenin). 2 raqamli bo'lakda praymerdan keyin 2chi bo'lib birikkan nukleotid - ddGTP (demak, DNK zanjirida praymer va adenindan so'ng Guanin keladi). Shu tariqa ketma-ketlik to'liq aniqlanadi.

5.11. Drosofiladagi transformatsiya.

Genetika sohasida transformatsiya deb genlarning bir organizmdan boshqasiga o'tkazilishi ataladi. Eukariotlarda tabiatda uchraydigan transformatsiya hamon aniqlanmagan. DNKni bir hujayradan boshqasiga tadqiqotda o'tkazilishni esa ko'p yillar davomida olimlar amalga oshira olishmadi. 70-yillarning oxirlari va 80-yillarning boshlarida ko'p olimlar guruhlarini bir-birlari bilan birinchi bo'lib DNK transformatsiyasini amalga oshirish uchun raqobatlashdilar. Muvaffaqiyatlar juda kam edi: DNK molekulari sutemizuvchilar, amfibiylar, dengiz tipratikanlarining ayrim turlarining erta embrionlariga mikrojarrohlik yo'li bilan kiritilib, ba'zan mezbon hujayraning xromosomalariga birlashar edi. Drosofilada sun'iy ravishda kiritilgan DNK embrionning xromosomalariga deyarli qo'shilmasdi,

ammo sun'iy ravishda idishda ko'paytirilgan hujayralarda odatda transformatsiya (yoki, transfeksiya) tez-tez sodir bo'lardi. Lekin bunday hujayradan butun organizmni o'stirish qiyin, va o'zgartirilgan DNK avlodga nasllanib o'tmaydi.

Oxir oqibat, 1982 yilda ikkita amerikalik tadqiqotchilar J. Rubin va A. Spradlingga omad kulib boqdi. Ular ko'chma P-elementni vektor sifatida ishlatishdi. P-elementda transpozitsiyani amalga oshirish uchun maxsus tuzilmalar mavjud (ular chetidagi takrorlanishlar) - har uchida 150 nj uzunlikdagi ma'lum bir ketma-ketlik. Aynan mana shu ketma-ketliklar bilan transpozaza fermenti bog'lanadi va P-elementning kiritilishi/kesib tashlanishini ta'minlaydi. P-elementni ko'chirish uchun ikkita shart bajarilishi kerak: uning uchidagi takroriy ketma-ketliklarning butunligi va transpozaza fermentining normal faolligi. Agar transpozaza fermentining sintezi jarayonida matritsa RNKdan transkripsiya va splicing paytida intronlardan biri olib tashlanmasa, yoki transpozaza genining ekzonlaridan biri buzilsa, ferment ishlamaydi va P-element ko'chirilmaydi. Biroq, bitta P-element transpozazasining yetishmasligi osonlikcha qoplanishi mumkin, buning uchun genomda boshqa P-elementni kodlaydigan hudud bo'lishi kerak.

Yuqorida aytilganlarning barchasini hisobga olgan holda, drosofiladagi transformatsiya tajribasi sxematik tarzda quyidagi ko'rinishga ega: ikkita P-elementning DNKsi tayyorlandi, ulardan bittasi (p π 25.7wc) transpozazani sintez qilishi mumkin, ammo genomga qo'shila olmaydi, chunki uchidagi ketma-ketliklardan biri buzilgan (3'-oxiri). Ikkinchi P-elementda esa - P[(ry⁺)A] - transpozaza genining muhim qismi yo'q qilinadi, ammo uning uchidagi takrorlanishlar butun bo'lgani uchun genom bo'ylab harakatlanishi mumkin.

Vektor bo'lgan va nuqsonli transpozaza geniga ega bo'lgan P[(ry⁺)A] elementga odatda drosofila genomiga ko'chirilayotgan 20 ming nj gacha bo'lgan qo'shimcha DNK parchasi kiritiladi. P[(ry⁺)A] element transpozon, p π 25,7wc esa yordamchi (helper) element deb ataladi.

Ushbu ikki turdagi DNK aralashmasi keyinchalik drosofila embrioniga kiritiladi. Ularning bir qismi hujayralarning DNKsiga qo'shiladi, keyinchalik bu hujayralar ko'payadi. Shunday qilib,

rivojlanishning dastlabki bosqichlarida embrionga kiritilgan begona DNK keyingi avlodlarga o'tadi.

Ko'pgina omillar, shu jumladan P elementiga joylashtirilgan begona DNK bo'lagining hajmi transformatsiyaning muvaffaqiyatiga ta'sir qiladi; embrionlarning atigi 14 foizi nasl qoldirish qobiliyatiga ega organizm bo'lib rivojlanadi. Shuning uchun, begona DNK genomiga qo'shilgan va qo'shilmagan drosofilalarni ajratib olish juda muhim. Buning uchun P[(ry+)A] elementiga maxsus marker genlari kiritiladi. Masalan, bu drosofila ko'z rangini boshqaradigan *rosy* (qizil rang) genlari bo'lishi mumkin, shuningdek alkoholdehidrogenaza kabi ferment sintezini kodlaydigan genlar yoki hatto meduza genomidan ajratib olingan va ma'lum sharoitlarda yashil fluoresensiyani (qorong'uda nur yoritish) aniqlaydigan GFP oqsilini kodlaydigan gen bo'lishi mumkin.

Transformatsiyani genetik tadqiqotlarda quyidagi maqsadlarda qo'llashadi.

1. Genlarni klonlash va ajratib olish jarayonida har doim bir savol tug'iladi: butun gen, ya'ni uning tartibga soluvchi va tarkibiy qismlari to'liq ajratib olinganmi? Buni aniqlashtirish uchun P[(ry+)A] transpozoni o'z tarkibiga kerakli genni kirituvchi DNK parchasi kiritiladi, u A bo'lagi deb nomlanadi. Keyin, P[(ry+)A] transpozoni ega bo'lgan xromosoma drosofilalarga chatishtirish yo'li bilan kiritiladi. Drosofilalar o'rganilayotgan gen bo'yicha gomozigot mutantlar bo'lishi kerak (yani bu gen ularda ishlamaydi). Agar A genining ishlashi uchun zarur bo'lgan barcha qismlar transpozonda bo'lsa, unda bunday drosofilalar normal fenotipga ega bo'ladi, chunki mutant A allelining kamchiliklari transpozonda joylashgan A+ allel genining faoliyati bilan to'ldiriladi. Shu tariqa mutant fenotip "qutqariladi" - normal fenotip shakllanadi.

Garchi bu ishlar drosofilada bajarilgan bo'lsa-da, mohiyatiga ko'ra, inson aralashuvi bilan genetik nuqsonlarni tuzatish imkoniyatini beradi. 1982 yildan beri drosofiladagi transformatsiya minglab marta amalga oshirilgan, va hozirgi kunda ushbu obyektga genetik nuqsonlarni to'g'irlash muammosi samarali hal etililmoqda. 2. Transformatsiyani qo'llashning yana bir maqsadi genning tuzilishini o'rganish, ya'ni uning tarkibiy va tartibga soluvchi qismlarini tahlil qilish. 3. Drosofiladagi transformatsiya boshqa turdagi organizmlardan o'tqazilgan genlar ekspressiyasini (faolligini) o'rganish uchun

qo'llaniladi, agarda usha organizmlarda transformatsiyani amalga oshirish imkoni bo'masa. Masalan, ipak qurti, chivin yoki odamning biror bir genining faollik darajasini drozofilada o'rganish mumkin. 4. Gen enxanserlarini (kuchaytiruvchi vositalarni) qidirish. 5. Ayrim genlar ekspressiyasini kuchaytirish uchun transformatsion tizimlarni yaratish. 6. DNKning ma'lum sayti (nuqtasi) rekombinatsiyasini (ko'payishini) kuchaytirish.

Nazorat uchun savollar:

- 1. Prokariotlarda genlarni operonlardan tashkil etilish printsipti.*
- 2. Genlarning kimyoviy sintezi.*
- 3. Molekulyar klonlash uchun vektorlar.*
- 4. Genom kutubxonalarini yaratish.*
- 5. Restriksion xaritalarini qurish.*
- 6. Sauzern-bloting tahlili. Bosqichlari.*
- 7. "Xromosoma bo'yicha yurish" tushunchasi.*
- 8. Nozern-bloting tahlili. Ahamiyati.*
- 9. Polimeraza zanjiri reaksiyasining bosqichlari va ahamiyati. (PCR)*
- 10. Nukleotidlar ketma-ketligini aniqlash (sikvens tahlili).*
- 11. Drosofiladagi transformatsiya. Ahamiyati.*

6-BOB. MUTAGENEZ, DNK REPARATSIYASI, KROSSINGOVER VA JINSIY KONVERSIYANING MOLEKULAR MEXANIZMLARI

Mutatsiyalarning xususiyatlari. DNKni tiklash mexanizmlari. Crossingoverning molekulyar asoslari. Gen konversiyasi.

6.1. Genetik kodning buzilishi bilan bog'liq mutatsiyalar.

Mutatsiyalar DNK nasldan naslga o'tuvchi material ekanligining muhim dalilidir. DNKdagi nukleotidlar ketma-ketligining o'zgarishi oqsildagi aminokislotalar ketma-ketligining o'zgarishiga olib kelsa, DNK nuqsonli oqsilni kodlaydi degan xulosaga kelish mumkin.

Nuqtali mutatsiyalarining ikkita asosiy turi mavjud:

- a) nukleotidlarning almashishi
- b) bir yoki bir nechta nukleotidlarning "tushib qolishi" yoki kiritilishi bilan bog'liq mutatsiyalar.

Nukleotidlarning almashishi ko'pincha bitta purinni boshqasiga yoki bitta pirimidinni boshqasiga almashishi bilan hosil bo'ladi. Ushbu almashishlar tranzitsiya deb ataladi. Tranzitsiyaning to'rtta turi mavjud: $A \rightarrow G$, $G \rightarrow A$, $T \rightarrow C$, $C \rightarrow T$. Natijada, G-C-jufti AT-juftiga almashadi yoki aksincha.

Tranzitsiyalarning klassik namunasi - nukleotidni azot kislotasi ta'siri ostida almashishi. Natijada nukleotid oksidlanib, amin guruhi ajraladi va sitosin uratsilga aylanadi. Tranzitsiyadan keyingi DNK replikatsiya tsiklida, bu urasil adenin bilan birikadi, asl sitozin guanin bilan bog'lanishi kerak bo'lsa-da. Natijada, C - G juftligi T - A ga almashtiriladi, va keyingi replikatsiya tsiklida adenin timin bilan birikadi. Azot kislotasi, shuningdek, adeninni oksidlab, undagi amin guruhini parchalaydi va AT-dan G-C-juftligiga teskari tranzitsiyani keltirib chiqaradi.

Tranzitsiya, shuningdek, g'ayrioddiy nukleotidlar bir-birlariga birikkanida ham bo'lishi mumkin. Ba'zi mutagenlar oddiy asoslarning analoglaridir. Ularning mutagenik ta'siri ularning doimiy asoslaridan birida joylashgan DNKga kiritilishining natijasidir. Masalan, bromuratsil (BrdU) - timinning analogi - metil guruhi o'rniga brom atomini o'z ichiga oladi. BrdU timin o'rniga DNKga kiritilib, adenin bilan emas, balki guanin bilan birlashishi mumkin, bu asl A-T juftligining G-C ga almashishiga olib keladi.

Tranzitsiya kabi mutatsiyalar har bir replikasiya tsiklida ma'lum darajadagi ehtimollik bilan bo'lib o'tishi mumkin.

Purinni pirimidinga yoki pirimidinni puringa almashishi kamroq uchraydi. Transversiya deb ataladigan bunday almashishlar sakkiz xil bo'lishi mumkin: $A \rightarrow T$, $T \rightarrow A$, $A \rightarrow C$, $C \rightarrow A$, $G \rightarrow C$, $C \rightarrow G$, $G \rightarrow T$, $T \rightarrow G$. Natijada A-T juftligi. TA yoki CG ga aylanadi.

Nukleotidlarni almashtirish natijasida yuzaga keladigan mutatsiyalar natijasida ko'pincha normal genning ba'zi funksiyalarini bajaradi, bunday mutatsiya «oqayotgan» deb ataladi (inglizcha *leaky mutation*). Ushbu gen kodlaydigan oqsil tarkibidagi aminokislotalar ketma-ketligining o'zgarishi uning faoliyatini to'liq yo'q qilmaydi.

Nukleotidlarni almashtirish turidagi mutatsiyalar mRNKda mutant kodonlarning ikki turi paydo bo'lishiga olib keladi - ma'nosi o'zgargan (missens) va ma'nosiz (nonsens). Kodlaydigan tripletlarning (uchliklarining) o'zgarishiga olib keladigan missens mutatsiyasining natijasi polipeptiddagi bitta aminokislotani boshqasiga almashishi bo'lishi mumkin. Ammo kod ortiqchaligi sababli, kodonda har bir mutatsiya aminokislotaning o'zgarishiga olib kelmaydi. Masalan, nukleotidlar juftlik almashtirilganda bitta kodon o'rniga, xuddi shu aminokislotani kodlaydigan boshqasi paydo bo'lishi mumkin. Bu holda oqsil asl turdagi oqsilning funksiyalarini saqlab qoladi. Bunday mutatsiyalarga "jim yuradigan" deyiladi. Bundan tashqari, har bir aminokislotani almashtirish ham oqsilning funktsional faolligiga ta'sir qilmaydi. Mutatsiya natijasida hosil bo'lgan kodon boshqa aminokislotani kodlashi mumkin, ammo u kimyoviy jihatdan teng keladigan funktsiyalarga ega bo'ladi. Masalan, oqsil molekulasida lizin o'rniga arginin bo'ldi. Oqsilning xususiyatlari o'zgarasligi mumkin. Bu neytral mutatsiyalar. Shuning uchun ikkala holatda ham mutatsiya yuzaga chiqmay qoladi. Shuning uchun ma'lum bir qendagi

6-BOB. MUTAGENEZ, DNK REPARATSIYASI, KROSSINGOVER VA JINSIY KONVERSIYANING MOLEKULAR MEXANIZMLARI

Mutatsiyalarning xususiyatlari. DNKni tiklash mexanizmlari. Crossingoverning molekulyar asoslari. Gen konversiyasi.

6.1. Genetik kodning buzilishi bilan bog'liq mutatsiyalar.

Mutatsiyalar DNK nasldan naslga o'tuvchi material ekanligining muhim dalilidir. DNKdagi nukleotidlar ketma-ketligining o'zgarishi oqsildagi aminokislotalar ketma-ketligining o'zgarishiga olib kelsa, DNK nuqsonli oqsilni kodlaydi degan xulosaga kelish mumkin.

Nuqtali mutatsiyalarining ikkita asosiy turi mavjud:

- a) nukleotidlarning almashishi
- b) bir yoki bir nechta nukleotidlarning "tushib qolishi" yoki kiritilishi bilan bog'liq mutatsiyalar.

Nukleotidlarning almashishi ko'pincha bitta purinni boshqasiga yoki bitta pirimidinni boshqasiga almashishi bilan hosil bo'ladi. Ushbu almashishlar tranzitsiya deb ataladi. Tranzitsiyaning to'rtta turi mavjud: $A \rightarrow G$, $G \rightarrow A$, $T \rightarrow C$, $C \rightarrow T$. Natijada, G-C-jufti AT-juftiga almashadi yoki aksincha.

Tranzitsiyalarning klassik namunasi - nukleotidni azot kislotasi ta'siri ostida almashishi. Natijada nukleotid oksidlanib, amin guruhi ajraladi va sitosin uratsilga aylanadi. Tranzitsiyadan keyingi DNK replikatsiya tsiklida, bu urasil adenin bilan birikadi, asl sitozin guanin bilan bog'lanishi kerak bo'lsa-da. Natijada, C - G juftligi T - A ga almashtiriladi, va keyingi replikatsiya tsiklida adenin timin bilan birikadi. Azot kislotasi, shuningdek, adeninni oksidlab, undagi amin guruhini parchalaydi va AT-dan G-C-juftligiga teskari tranzitsiyani keltirib chiqaradi.

Tranzitsiya, shuningdek, g'ayrioddiy nukleotidlar bir-birlariga birikkanida ham bo'lishi mumkin. Ba'zi mutagenlar oddiy asoslarning analoglaridir. Ularning mutagenik ta'siri ularning doimiy asoslaridan birida joylashgan DNKga kiritilishining natijasidir. Masalan, bromuratsil (BrdU) - timinning analogi - metil guruhi o'rniga brom atomini o'z ichiga oladi. BrdU timin o'rniga DNKga kiritilib, adenin bilan emas, balki guanin bilan birlashishi mumkin, bu asl A-T juftligining G-C ga almashishiga olib keladi.

Tranzitsiya kabi mutatsiyalar har bir replikasiya tsiklida ma'lum darajadagi ehtimollik bilan bo'lib o'tishi mumkin.

Purinni pirimidinga yoki pirimidinni puringa almashishi kamroq uchraydi. Transversiya deb ataladigan bunday almashishlar sakkiz xil bo'lishi mumkin: $A \rightarrow T$, $T \rightarrow A$, $A \rightarrow C$, $C \rightarrow A$, $G \rightarrow C$, $C \rightarrow G$, $G \rightarrow T$, $T \rightarrow G$. Natijada A-T juftligi. TA yoki CG ga aylanadi.

Nukleotidlarni almashtirish natijasida yuzaga keladigan mutatsiyalar natijasida ko'pincha normal genning ba'zi funksiyalarini bajaradi, bunday mutatsiya «oqayotgan» deb ataladi (inglizcha *leaky mutation*). Ushbu gen kodlaydigan oqsil tarkibidagi aminokislotalar ketma-ketligining o'zgarishi uning faoliyatini to'liq yo'q qilmaydi.

Nukleotidlarni almashtirish turidagi mutatsiyalar mRNKda mutant kodonlarning ikki turi paydo bo'lishiga olib keladi - ma'nosi o'zgargan (missens) va ma'nosiz (nonsens). Kodlaydigan tripletlarning (uchliklarining) o'zgarishiga olib keladigan missens mutatsiyasining natijasi polipeptiddagi bitta aminokislotani boshqasiga almashishi bo'lishi mumkin. Ammo kod ortiqchaligi sababli, kodonda har bir mutatsiya aminokislotaning o'zgarishiga olib kelmaydi. Masalan, nukleotidlar juftlik almashtirilganda bitta kodon o'rniga, xuddi shu aminokislotani kodlaydigan boshqasi paydo bo'lishi mumkin. Bu holda oqsil asl turdagi oqsilning funksiyalarini saqlab qoladi. Bunday mutatsiyalarga "jim yuradigan" deyiladi. Bundan tashqari, har bir aminokislotani almashtirish ham oqsilning funktsional faolligiga ta'sir qilmaydi. Mutatsiya natijasida hosil bo'lgan kodon boshqa aminokislotani kodlashi mumkin, ammo u kimyoviy jihatdan teng keladigan funktsiyalarga ega bo'ladi. Masalan, oqsil molekulasida lizin o'rniga arginin bo'ldi. Oqsilning xususiyatlari o'zgarmasligi mumkin. Bu neytral mutatsiyalar. Shuning uchun ikkala holatda ham mutatsiya yuzaga chiqmay qoladi. Shuning uchun ma'lum bir gendagi

mutatsiyalar ushbu gen bo'yicha mutantlarning paydo bo'lishidan ko'proq uchrashi mumkin.

Odamlardagi gemoglobin β -zanjirining oltinchi kodonidagi nukleotidning almashishi missens-mutatsiyaga misoldir. A shaklidagi ($Hb^A\beta$) ushbu kodon (GAPu) manfiy zaryadlangan glutamin kislotasini kodlaydi. Kodlovchi zanjirida A ni T bilan almashtirish natijasida oqsil molekulasidagi NH_2 -guruhli oltinchi aminokislota neytral valinga aylanadi va S-shaklli gemoglobin hosil bo'ladi. G'ayritabiiy S- β -gemoglobin sintezini kodlovchi mutant allelli bo'yicha gomozigot odamlar o'roqsimon hujayrali anemiya deb ataladigan gemolitik anemiyaning og'ir shakli bilan og'riydi. Kislorod yetishmovchiligi sharoitida S-gemoglobin kristalga aylanib yig'ilib qoladi, natijada qizil qon tanachalarining shakli buziladi (o'roqsimon shakl). Bunday g'ayritabiiy hujayralar mayda tomirlarni yopib qo'yishi va shu bilan kislorodning turli to'qimalarga kirishini to'xtatishi mumkin.

"Nonsens" turidagi mutatsiyalarda nukleotid juftliklarining almashishi natijasida har qanday aminokislotalarni aniqlaydigan kodonlar translyatsiyani to'xtatadigan "nonsens-kodonlarga" aylanib qoladi. Bunday kodonning i tarkibiy gen oxirida emas, balki uning ichida paydo bo'lishi translyatsiyaning muddatidan oldin to'xtatilishiga, ya'ni qisqartirilgan polipeptid zanjirining paydo bo'lishiga olib keladi. Bunday to'xtatish oqsil funksiyasining to'liq "o'chirilishiga" olib keladi.

Bir yoki bir nechta nukleotidlarning qo'shilishi yoki yo'qolishi natijasida hosil bo'lgan mutatsiyalar nonsens-mutatsiyalarga o'xshaydi.

Ko'pincha DNK zanjirining nukleotid kiritilgan yoki o'chirilgan nuqtasidan keyingi qismida kodlash tartibi o'zgarib qoladi, buning natijasida polipeptidning shu nuqtagacha sintezlangan qismiga ushbu gen aslida kodlamaydigan aminokislotalarning yangi to'plami qo'shiladi. Bazan, normal genda mavjud bo'lgan to'xtatish kodonlari ishlamay qolib, o'qilishi va uzunroq polipeptid sintez qilinishi mumkin. Qanday bo'lmasin, natija ishlamaydigan oqsil sintezlanadi. Ikkilamchi mutatsiya normal oqsil tarkibini tiklashi mumkin. S. M. Gershenzon buni hazil tarqasida bo'lsada, aniq tasvirlab bergan:

"Aniqlik uchun oqsil tarkibini uchta harfdan iborat ketma-ket so'zlar bilan ifodalash mumkin. Bir necha so'zlardan iboralar tuzilgan

bo'lib, shartli ravishda DNKning ushbu qismidaida qayd etilgan ma'lumotlarni aks ettiradi", masalan:

kim bor suv yo'q ana ko'l suv ko'p bir kun uni tut ...

Aytaylik, birlamchi mutatsiya jumlaning ikkinchi va uchinchi uchliklari (so'zlari) orasiga qo'shimcha nukleotidni (ya'ni harflarni) kiritdi.

Kiritma

↓

kim bor a suv yo'q ana ko'l suv ko'p bir kun uni tut ...

Bunday qo'shimcha paydo bo'lganidan so'ng, u quyidagicha o'qiladi:

kim bor asu vyo' qan ako' lsu vko' pbi rku nun itu t...

Birinchi ikkita uchlik (so'zlar) dan tashqari, qolganlari butunlay boshqasi bilan almashtiriladi, ya'ni ushbu gen tomonidan kodlangan oqsil tarkibidagi aminokislotalarning navbati mutatsiyadan keyin butunlay boshqacha bo'lib qoladi va gen normal funksiyasini yo'qotadi.

Endi birlamchi mutatsiya nuqtasiga yaqin nukleotid (ya'ni, xarf) ikkilamchi mutatsiya natijasida "tushib qolsin", masalan, to'rtinchi uchlikda (vyo'), "v" harfi yo'qoladi:

Tushib qolish

↓

kim bor asu yo' qan ako' lsu vko' pbi rku nun itu t...

U quyidagicha o'qiladi:

kim bor asu yo'q ana ko'l suv ko'p bir kun uni tut ...

Jumladagi ma'lumotlarning ma'nosi deyarli to'liq tiklandi - faqat bitta so'zning ("asu") ma'nosi yo'qoldi. Oqsil molekulasida gen tomonidan kodlangan aminokislotalar ketma-ketligi deyarli asl holatga keladi - faqat bitta aminokislota (chapdan uchinchi) o'zgardi. Ko'pgina hollarda, bu oqsilning biologik xususiyatlariga ta'sir qilmaydi yoki ozgina ta'sir qiladi, ya'ni gen normal yoki deyarli normal ishlaydi.

Shunga o'xshash misolda, paydo bo'lgan boshqacha birlamchi mutatsiyaning namoyon bo'lmasligini ko'rib chiqish mumkin, bunda DNKga nukleotid qo'shilishi o'rniga, u yo'qolgan. Faqat bu yerda birlamchi mutatsiya nuqtasiga yaqin bo'lgan ikkilamchimutatsiya yo'qolishdan emas, balki nukleotid qo'shilishidan iborat bo'lgan deb taxmin qilish kerak. Buni xuddi shu ibora bilan tasvirlash mumkin.

Birlamchi mutatsiya (uchinchi uchlikda "v" harfi yo'qolishi):

Tushib qolish

kim bor suv yo'q ana ko'l suv ko'p bir kun uni tut ...

↓

kim bor su yo'q ana ko'l suv ko'p bir kun uni tut ...

Uchliklar o'qilganda, iboraning ma'nosi yo'qoladi:

kim bor suy o'qa nak o'ls uvk o'pb irk unu nit ut...

Ikkilamchi mutatsiya (ikkinchi va uchinchi uchlik o'rtasida "a" harfini kiritish):

Kiritma

↓

kim bor a suy o'qa nak o'ls uvk o'pb irk unu nit ut...

Quyidagicha o'qiladi:

kim bor asu yo'q ana ko'l suv ko'p bir kun uni tut ...

Ma'lumotlarning ma'nosi deyarli to'liq tiklanadi. Oldingi misolda bo'lgani kabi, faqat bitta so'zning ma'nosi yo'qoladi. Gen normal yoki deyarli normal ishlaydi.

Missens mutatsiyalar, masalan, E. coli laktoza operonining genlarida, qo'shni genlarning faolligiga ta'sir qilmasdan, faqat ular paydo bo'lgan genlarni o'chiradi. Nonsens-mutatsiyalar bilan vaziyat boshqacha bo'lib chiqdi. Agar bunday mutatsiya lacZ genida ro'y bersa, bu nafaqat lacZ genining, balki yonmayon joylashgan ikkala genning (lacY, lacA) ham funksiyalari yo'qolishiga olib keladi. LacY genida nonsense-mutatsiyalar yuzaga kelganda, lacA geni ham o'chiriladi, ammo lacZ geni normal ishlaydi. Va nihoyat, lacA genining nonsense-mutatsiyasi faqat ushbu genning ishlashiga ta'sir qiladi. Shunday qilib, laktoza operonining turli qismlarida nonsense-mutatsiyalar boshqacha ta'sir qiladi, ya'ni ular qutbli ta'sir ko'rsatadi. Qutb effektini ko'rsatadigan nonsens-mutatsiyalar qutbli mutatsiyalar deb ataladi.

Mutatsiyalar ko'pincha "qaynoq" nuqtalarda to'planadi. Mutatsiyalar genlarni "o'chirishi" nuqtai nazaridan ko'rib chiqilganda shu namoyon bo'ladiki, ma'lum bir uzunlikdagi DNK bo'laklarida mutatsiyalar bir hil tezlikda sodir bo'ladi. Bu gen mutagenlar uchun nishon ekanligini va genning har qanday qismiga zarar yetkazilishi uning faoliyatini o'zgartirishi mumkinligini anglatadi. Ya'ni, gen hajmi qanchalik kata bo'lsa, mutatsiya ehtimoli shuncha ko'p. Biroq, savol

tug'iladi: barcha nukleotidlar mutagenlarning ta'siriga teng darajada sezgirmi? Bunga javob berish uchun odatda bir xil genning mutatsiyalarining katta to'plami tanlanadi, keyin har bir mutatsiyaning joylashishi aniqlanadi. Ularning aksariyati genning turli qismlarida joylashgan, ammo ba'zi nuqtalar takrorlanadi. Natijada, ba'zi nuqtalarda bitta emas, balki ikkita, uchta va hatto 10 va 100 ta mutatsiyalar mavjudligi aniqlandi. Genning bunday joylari "qaynoq" mutatsion nuqtalar (*hotspots*) deb nomlandi. Ular mutatsiyalarning barcha turlari uchun universal emas.

Ko'chma elementlarning qo'shilishi natijasida yuzaga kelgan mutatsiyalar. Uzoq vaqt davomida bir gen ichidagi ma'noni o'zgartiruvchi mutatsiyalar, masalan, tranzitsiya va transversiya, individual genlardagi o'zgarishlarning asosiy turi deb xisoblangan. Biroq, hozirda genomga mobil elementlarning kiritilishi juda ko'p uchrashi mumkinligini ma'lum. Insertsiya (kiritish) natijasida genlar, odatda, normal fenotipni bermay qo'yadilar. Agar ko'chma element kiritilgan joyidan olib tashlansa, u bilan birga qo'shni materiallar ham yo'qolib qilishi mumkin.

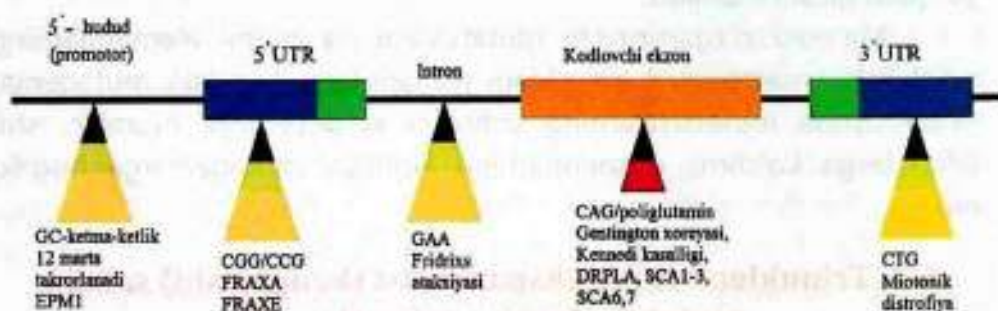
Ma'noni o'zgartiruvchi mutatsiyalar va mobil elementlarning qo'shilishi (insertsiyalar) o'rtasidagi sezilarli farq shundaki, mutagenlar ta'siri ostida mutatsiyalarning uchrashi ko'paytirilishi mumkin, shu bilan birga ko'chma elementlarning kiritilishi mutagenlarga bog'liq emas.

6.2. Trinukleotidning ekspansiyasi (kengayishi) sababli mutatsiyalarning takrorlanishi.

1991 yilda A. Ferkerk va uning hamkasblari insonning X xromosomasidagi q27 va q28 bendlari (chiziqlari) orasidagi "mo'rt" (*fragile*) joyda joylashgan FMR-1 genini (mo'rt X-xromosomasi bilan bog'liq aqliy zaiflik I) aniqladilar. Gen faoliyati miya hujayralarida namoyon bo'ladi. Gomizigot mutantlarda o'rtacha darajali aqliy zaiflik rivojlanadi (I.Q. ~ 50). Erkaklardagi barcha ruhiy kasalliklarning chorak qismi aynan ushbu kasallikdir. Gendan 657 aminokislotalardan iborat oqsilni kodlaydigan 4.8 ming nj hajmli mRNK o'qiladi. Kodlovchi hududdan yuqoriroqda CGG uchlik taxminan 30 marta takrorlanadigan bo'lak joylashgan (24-rasm). Ayrim odamlarda uchlik

nusxalari soni 50-100 gacha ko'payadi. Ularning X-xromosomasida sitologik tahlil yordamida aniqlanadigan "mo'rt joy" paydo bo'ladi. Ushbu X^F-alleli bor erkaklarda aqliy rivojlanish normal bo'ladi, ammo ular "tashuvchilar" bo'lib qoladilar. Birinchi avlodda (F₁), bu allelni olgan qizlar normal aqliy rivojlanadi. Ammo ushbu X-xromosoma keyingi avlodlarga o'tgandan keyin, CGG takrorlanishining ekspansiyasi boshlanadi. Ekspansiya erta embriogenezda sodir bo'lganligi sababli, ikkinchi (F₂) avlodlarda kasallikning mozaik shakli namoyon bo'ladi (hujayralarning faqat bir qismida uchraydi). Embrional hujayralarida uchlik 50-200 nusxada takrorlanadi, ammo ulardan hosil bo'lgan hujayralarda xatto bir necha mingta bo'lishi mumkin. Bunday holda, FMR-1 geni kodlaydigan oqsil tabiiy ravishda ishlamaydi va bemor aqliy rivojlanmay qoladi.

Inson genomining kamida 50 ta genida uchliklar besh yoki undan ko'p marta takrorlanadi. Va odamlarda kamida 12 kasallik ekspansiya (kengayish), ya'ni trinukleotid nusxalarining takrorlanishi sonining ko'payishi sababli kelib chiqadi (24-rasm).



24-rasm. Gen ichidagi takrorlanishlarning joylashishi sxemasi va ular bilan bog'liq kasalliklar.

UTR - genning translyatsiya qilinmaydigan hududlari. Uchburchaklar trinukleotidlarning takrorlanishining nisbiy darajasini ko'rsatadi: qora joylar - normal gendagi takrorlanishlar soni, yashil - mutatsiyaga (avlodda takroriy nusxalar sonining ko'payishiga) olib keluvchi ekspansiya, qizil va sariq - ekspansiyaning yanada yuqori darajasi, bu kasallikka olib keladi. Quyida trinukleotidlarning turlari va kasalliklarning nomlari keltirilgan: EPM1 - progressiv mioklonal epilepsiya; FRAXA - A xromosomasidagi mo'rt joy bilan bog'liq

bo'lgan aqliy zaiflik sindromi; FRAXE - o'rtacha aqliy zaiflik; spinobulbar mushak atrofiyasi (Kennedi kasalligi); DRPLA - dentatorubropallidoluzian atrofiyasi; SCA1-3, 6 - spinotserebral ataksiya; SCA7 - Makulyar degeneratsiya bilan kechadigan spinotserebral ataksiya.

Ushbu turdagi mutatsiyaning ba'zi xususiyatlari quyida keltirilgan.

1. Trinukleotid takroriy nusxalari sonining turg'unligi ma'lum bir chegaraga yetgandan keyin buziladi (35-50 nusxa), shundan so'ng keyingi avlodlarda trinukleotidlar soni tez ko'paya boshlaydi. 2. Ushbu turdagi mutatsiyalarning hozirgacha ma'lum bo'lgan barchasi ikki guruhga bo'lingan (24-rasm). Birinchisi, kodlamaydigan hududlardagi juda yuqori darajali ekspansiya. Ikkinchi guruhdagi mutatsiyalarda CAG-takrorlanishlar o'rta darajada ekspansiyaga uchraydi, ular kodlaydigan poliglutamin zararli oqsilga aylanadi va keyinchalik neyronlarning o'limiga olib keladi.

6.3. Teskari va supressor mutatsiyalar.

Belgining o'zgarishiga, ya'ni mutant fenotipga olib keladigan asl genlarning o'zgarishi "to'g'ridan-to'g'ri mutatsiya" deb ataladi. Ko'pgina to'g'ridan-to'g'ri mutatsiyalar reversiyaga uchrashi mumkin (ya'ni, orqaga qaytishi). Bu boshqa mutatsiyalar birinchi mutatsiya natijasida o'zgaradigan mutantning asl fenotipini tiklaydi degan ma'noni anglatadi. Bunday mutatsiyalar reversiv yoki teskari deyiladi. Reversiv mutatsiyalar nuqtali mutatsiyalarini va insertsiyalarni (qo'shimchalarni) deletsiyadan (tushib qolishdan) ajratib turadigan muhim xususiyatdir, chunki: 1) nuqtali mutatsiya reversiya orqali asl nukleotid ketma-ketligini tiklashi yoki genning boshqa qismida kompensatsion mutatsiya hosil bo'lishi bilan tiklanishi mumkin; 2) qo'shimcha materialni insertsiya qilish (kiritish) reversiyaga uchrashi mumkin, bunda kiritilgan material deletsiyaga uchraydi (tushib qoladi); 3) genning biron bir qismining deletsiyasi reversiya orqali tiklanishi mumkin emas.

Asl fenotipga qaytish to'g'ridan-to'g'ri mutatsiya sodir bo'lgan nuqtada haqiqiy teskari mutatsiya tufayli yuzaga kelishi mumkin. Bu asl nukleotidlar ketma-ketligi tiklanishiga olib keladi. Reversiyalar

paydo bo'lishining yana bir yo'li shundaki, ikkinchi mutatsiya genomning boshqa hududida joylashgan va birinchi mutatsiya natijasida yuzaga kelgan nuqsonning o'rmini qoplaydi. Ushbu turdagi mutatsiyalar suppressor (bostiruvchi) deb ataladi, chunki ular asl mutatsiyalar ta'sirini bostiradilar.

Haqiqiy teskari mutatsiyalarni supressor mutatsiyalardan ajratish uchun tahlil qiluvchi chatishtirish usuli qo'llaniladi, unda reverantlar (reversiv mutatsiyaga uchragan organizmlar) asl yovvoyi fenotipga ega bo'lgan organizmlar bilan chatishtiriladi. Agar reverantning paydo bo'lishi haqiqiy teskari mutatsiya bilan bog'liq bo'lsa, bunday chatishtirishda barcha nasllarda yovvoyi fenotip bo'lishi kerak. Agar tahlil qilingan organizmda ikkita mutatsiya mavjud bo'lsa - to'g'ridan-to'g'ri va supressor, unda rekombinatsiya natijasida yovvoyi yoki mutant fenotip avlodlari vujudga keladi. Mutant fenotip paydo bo'lishining uchrash darajasi to'g'ridan-to'g'ri va supressor mutatsiyalarning bir-biriga birikkanligiga bog'liq. Bir-biriga yaqin joylashgan taqdirda mutant fenotipli rekombinant avlodlarning paydo bo'lishi ehtimoli kamayadi. Shu bilan birga, faqat supressor mutatsiyali nasllarda dastlabki mutatsiya tomonidan boshqariladigan belgiga ko'ra asl fenotip bo'lishi mumkin, ammo supressor mutatsiyaning o'zi tomonidan boshqariladigan boshqa belgi bo'yicha mutant bo'lishi mumkin.

Haqiqiy teskari mutatsiyalarning uchrash darajasi to'g'ridan-to'g'ri mutatsiyalarning uchrash darajasiga qaraganda ancha past, chunki bu genlar turli xil joylarda paydo bo'lishi mumkin. Aksariyat teskari mutatsiyalar (reversiya) bostiruvchidir. Bostirish ikki xil bo'lishi mumkin: intragen (gen ichida) va ekstragen (gendan tashqarida). Nukleotidlarni almashtirish bilan kechadigan mutatsiyalarning intragen bostirilishi 1967 yilda Ch. Yanovskiy tomonidan namoyish etilgan. Tajribada E.coli tarkibidagi mutant triptofansintetaza fermenti faolligi tiklangan, buning uchun o'zgartirilgan uchlikda ikkinchi mutatsiya yuzaga keltirilgan, natijada mutant geni bilan kodlangan polipeptid tarkibiga tog'ri aminokislota kiritilgan. Ya'ni, missens mutatsiyasi natijasida 210 o'rindagi glitsin (CGA) o'rniga arginin (AGA) joylashishi fermentning faolligini to'xtatib qo'yadi. AGA kodonini AGU (yoki AGC) bilan almashtiradigan ikkinchi mutatsiya oqsilga arginin o'rniga serin qo'shilishiga olib keladi, va bu haqiqiy reversiya

bo'lmasa-da, ammo mutant fermentning katalitik funksiyasining tiklanishiga olib keladi.

Intragen supressiyaga nukleotidlarning almashishi bilan kechadigan mutatsiyalardan tashqari, shuningdek, o'qish chegarasining siljishiga olib keladigan mutatsiyalar ham kiradi.

Ekstragen supressiyaga ham, shuningdek, o'qish chegarasining siljishi bilan kechadigan nonsens-mutatsiya va missens mutatsiyalar kiradi. Missens mutatsiyalarning ekstragen supressiyasi – bu tRNK tarkibidagi o'zgarishlarning natijasidir, bunda kodon va antikodon, shuningdek tRNK va aminokislotalar o'rtasidagi o'zaro ta'sir o'zgaradi. Qanday bo'lmasin, mutant tRNK sintezlangan polipeptid zanjiriga missens mutatsiyasiga ega bo'lgan uchliklar kodlaydigan aminokislota o'rniga boshqasini qo'shishi mumkin. Bunday supressiyaning eng ko'p o'rganilgan namunalari biri bu E. colininig tirozin tRNK antikodonidagi nukleotidlarning 3'-UUC-5' dan 3'-AUC-5' ga o'zgarishi. Bunday supressiya faqatgina nonsens-kodonga tog'ri keladigan aminokislota oqsilining normal ishlashiga xalaqit bermasa muvaffaqiyatli bo'ladi. Shuni ta'kidlash kerakki, nonsens-supressorlar kodon uchun emas, balki gen uchun spesifikdir. Bu shuni anglatadiki, supressor mutatsiya, birlamchi mutatsiyalar qayerda bo'lishidan qat'i nazar, turli xil genlarning faoliyatini tiklashga qodir.

Mutatsiyaning sabablari. Mutatsiyalar spontan bo'ladi (o'z-o'zidan kelib chiqqan), ya'ni tabiatda biron bir sababsiz paydo bo'lgan va turli mutagenlar tomonidan qo'zg'atilgan bo'ladi.

Mutatsiyalarning barcha turlari o'z-o'zidan paydo bo'lishi mumkin. Uzoq vaqt davomida genetika mutaxassislari o'z-o'zidan paydo bo'lgan mutatsiyalar atrof-muhit mutagenlari, masalan, radiatsiya va kimyoviy mutagen birikmalari atrof-muhitni ifloslantirishi natijasida kelib chiqadi deb ishonishgan. Ammo, ma'lum bo'lishicha, o'z-o'zidan paydo bo'lgan mutatsiyalarning uchrash darajasi ancha past bo'lsa-da, faqat tashqi mutagenlarning ta'siri uchun juda yuqori. DNK shikastlanishining aksariyati hujayra ichidagi reparatsiya (ta'mirlash, tuzatish) tizimlari tomonidan ta'mirlanganligi sababli ularning ozgina qismi mutatsiyalar sifatida namoyo reparatsiya tizimidagi buzilishdir.

Spontan mutatsiyalar DNK replikatsiyasidagi xatolar yoki DNK molekulasining kimyoviy tarkibiy qismlarining o'zgarishi natijasida

yuzaga keladi. Spontan mutatsiyalarning uchinchi sababi - bu genomning mobil elementlarining harakatlanishi.

Vodorod atomlarining purin yoki pirimidin tarkibidan timin va guaninning boshqa stabil ketoformlariga, shuningdek adenin va tsitozinning aminformalariga o'tishi natijasida ular tautomerizatsiyaga uchraydi va nostabil yenol va iminofomlarga aylanadi. Bunday o'tishlarning oqibati spontan tranzitsiya va transversiyalarning paydo bo'lishiga olib keladigan A-C va G-T-juftlarning shakllanishi bo'lishi mumkin.

DNK replikatsiya mexanizmlarining o'z-o'zidan paydo bo'lgan mutatsiyalarning paydo bo'lishiga olib kelishining sababi DNK polimerazalari va tsitozinning kimyoviy modifikatsiyasi bilan bog'liq bo'lgan xatolardir. DNK polimerizatsiyasi paytidagi xatolar taxminan 10^{-5} oralig'ida sodir bo'lishi taxmin qilinadi. DNK polimerazalarining to'g'rilovchi 3'-5'-ekzonukleaz faolligi ushbu ko'rsatkichni 10^{-10} gacha pasaytiradi. Reparativ jarayonlar bunday xatolar ehtimolini yanada kamaytiradi. Shunga qaramay, ularning soni ushbu gendagi irsiy o'zgarishlarni amalga oshirish uchun yetarli, ya'ni o'z-o'zidan paydo bo'lgan mutatsiyalar yuzaga kelishi uchun.

E. coli-da spontan mutatsiyalarning ko'pi DNK tarkibidagi to'rt nukleotiddan birini kimyoviy modifikatsiyalash natijasida yuzaga keladi. Eng keng tarqalgan modifikatsiya qilingan nukleotid - 5-metiltsitozindir. Metilaza fermenti -CH guruhini DNK molekulasining ma'lum bir qismidagi (o'ziga xos hududlari) tsitozin qoldiqlariga qo'shadi. Natijada G-C dan A-T ga tranzitsiya sodir bo'ladi. Ushbu joylarda spontan mutatsiyalarning "qaynoq nuqtalari" paydo bo'ladi.

Maksus gen-mutatorlar ma'lum. Ularning ba'zilaridagi mutatsiyalar (mutS, E. coli-dagi mutL) o'z-o'zidan o'zgarishni 100 baravarga, boshqalarida (mutT, mutD, mutH) 10^3 - 10^5 martagacha oshiradi. Ushbu genlar DNK replikatsiyasi, reparatsiya va rekombinatsiya jarayonlari bilan bog'liq bo'lgan boshqa genlarga ta'sir qiladi.

Mutatsiyalarni qo'zg'atuvchi omillar qatorida ionlashtiruvchi va ionlashtirmaydigan nurlanishni, shuningdek kimyoviy vositalarni alohida ta'kidlash lozim.

Faol mutagenlarga rentgen va ultrabinafsha nurlanishlar kiradi. To'qimalarga kirib, ionlashtiruvchi nurlanish kimyoviy aloqalarni, shu

jumladan DNKni buzadi. Natijada, xromosoma tuzilishi o'zgaradi, mutatsiyalar paydo bo'ladi.

Ultrabinafsha nur ionlashtirmaydi, ammo bu juda kuchli mutagen. Buning sababi shundaku, purinlar va pirimidinlar to'liq uzunligi 254-260 nm bo'lgan ultrabinafsha nurlarni intensiv ravishda o'zlashtiradi va natijada DNK tarkibidagi fotokimyoviy o'zgarishlar yuzaga keladi. Ultrabinafsha nurlanishining oqibatlaridan biri DNKning bir zanjiriga ulashgan yoki qarama-qarshi zanjirlarda joylashgan pirimidin molekulari o'rtasida g'ayritabiiy kimyoviy aloqalar hosil bo'lishi. Ko'pincha timin dimerlari hosil bo'ladi. Kamroq boshqa pirimidinlarning dimerlari hosil bo'ladi. Dimerning paydo bo'lishi DNK zanjirida protruziya (bo'rtib chiqish, kengayish) paydo bo'lishiga olib keladi. Ushbu buzilishlarning aksariyati reparatsiyaga uchraydi, qolganlari mutatsiyaga olib keladi.

Ko'pgina kimyoviy birikmalar mutatsiyalarni qo'zg'atishi mumkin. Bular nukleotidlarning analoglari, shuningdek nukleotidlarni o'zgartiruvchi moddalar (modifikatorlar), interkalyatsiya agentlari.

Nukleotidlarning analoglari odatda DNK zanjirlarida joylashgan asoslarga molekulyar tuzilish bo'yicha juda o'xshash. Ushbu birikmalar mutatsiyalarga olib keladi, chunki ular alternativ (tautomerik) holatlarda mavjud bo'lishi mumkin. Ikki holatning har birida analoglar turli xil normal nukleotidlar bilan birikadi, natijada ularning o'rnini bosishi mumkin. Masalan, 5-bromouratsil normal holatda adenin bilan, kamroq uchraydigan tautomer holatida - guanin bilan birikadi. Natijada 5-bromouratsil DNKga bitta holatda kirganida tranzitsiyani keltirib chiqaradi, so'ngra DNK replikatsiyasining keyingi bosqichida u kam uchraydigan tautomerik shaklga aylanadi. Yana bir nukleotidning analogi - bu 2-aminopurindir.

Nukleotidlarni modifikatsiya qiluvchi agentlar. Bir qator kimyoviy moddalar mutagenlar rolini o'ynaydi, ular nukleotidlarning kimyoviy tuzilishi va xususiyatlarini bevosita o'zgartiradi. Bularga deaminatsiya qiluvchi, gidroksillovchi va alkilatlovchi moddalar kiradi.

Azot kislotasi (HNO_2) oksidlovchi deaminatsiyani amalga oshiradi, ya'ni amino-guruhni (-NH) guanin, tsitozin va adenin kabi asoslardan olib tashlaydi. Guanindan ksantin hosil bo'ladi, ammo bu purin asosi bir xil turdagi juftlashuvga ega bo'lganligi sababli mutatsiya sodir bo'lmaydi. Ammot sitozin o'zgartirilganda, uratsil

(adenin bilan birlashadi) hosil bo'ladi. Natijada, DNK replikatsiyasida C-G dan T-A ga tranzitsiya yuzaga keladi. Xuddi shu kabi azot kislotasi adeninni gipoksantinga aylantiradi, bu asos timinga emas, balki tsitozinga qo'shilib, A-T dan G-C ga tranzitsiyani keltirib chiqaradi. Azot kislotasi ta'siri ostida kelib chiqqan mutatsiyalar qayta ishlash orqali tiklanishi mumkin.

Yana bir asosni o'zgartiruvchi mutagen - bu gidroksilamindir (NH₂OH), u tsitosinga gidroksil guruhini (-OH) qo'shadi, natijada u guanin bilan emas, balki adenin bilan birlashadi. Oqibatda, gidroksilamin ta'siri ostida T-A-dan C-G-ga tranzitsiya kelib chiqadi. Bunday holda mutatsiyalarni normaga qaytarish mumkin emas.

Va nihoyat, alkilatlovchi vosita metilmetansulfonat (MMS), guaninni alkilatlaydi, ya'ni unga 6-o'rindagi kislorod o'rniga -CH yoki -CH₂CH qo'shadi, natijada O⁶-alkilguanin yoki O⁶-metilguanin hosil bo'ladi. Metillangan guanin tsitosin bilan emas, balki timin bilan qo'shilib, A-T dan G-C ga tranzitsiyani yuzaga keltiradi.

Interkalyatsiyalovchi vositalar. Ushbu mutagenlar guruhiga proflavin, akridin, etidumbromidi va ICR-170 nomli moddalar kiradi. Ular bir yoki ikkala DNK zanjiridagi qo'shni nukleotidlar orasiga joylashadilar (interkalyatsiya).

Agar DNK zanjirida qo'shni asoslar orasiga interkalatsiya agenti joylashtirilsa, yangi sintezlangan zanjirga qo'shimcha asos, bu holda G qo'shiladi va o'qish chegarasi siljishi mutatsiyasi yuzaga keladi. Interkalyatsiya agentini olib tashlaganda ham shunga o'xshash vaziyat yuzaga keladi.

6.4. Saytga xos mutagenез.

Spontan va induksiya qilingan mutatsiyalar biron bir ma'lum genda sodir bo'lmaydi, ular genom bo'ylab tasodifiy ravishda taqsimlanadi. Ammo, genetika mutaxassislarida doim ular uchun alohida qiziqish uyg'otadigan genlardagi mutatsiyalarni olish maqsadi bor edi.

Genetik muhandislik usullarining rivojlanishi bilan in vitro tizimida DNKni ajratib olish, klonlash va mutagenlar ta'sirini o'tqazib, keyinchalik hujayraga qaytarish imkoni paydo bo'ldi.

6.5. DNK reparatsiyasi mexanizmlari.

Eukariotik va prokariotik hujayralarda DNKning shikastlanishini reparatsiyalaydigan (tiklaydigan) tizimlar mavjud. Har bir mexanizm ma'lum bir ferment to'plami yordamida amalga oshiriladi. Ba'zi bir tizimlar zararni to'g'ridan-to'g'ri tuzatadi, boshqalari esa dastlab bitta zanjirdagi zararni qisqartirib, bo'shliqlarni hosil qiliadi, so'ngra yangi DNK zanjirini sintez qiladi. Agar ushbu tizimlar barcha zararni tuzatishga qodir bo'lmasa, natijada mutatsiyalar yuzaga keladi. Agar mutatsiyalar juda ko'p bo'lsa, hujayra halok bo'ladi.

Mutatsion shikastlanishni to'g'ridan-to'g'ri tuzatish. Bu turdagi reparatsiya DNK polimeraza tomonidan tekshirish yo'li bilan o'tqaziladi. Bakterial tizimlarda replikatsiya paytida xato nukleotidlarni kiritish 10^{-7} - 10^{-11} ni tashkil qiladi. Aslida DNK polimeraza yangi zanjirni sintez qilganda, taxminan 100 marta ko'proq xato qiladi. Ammo, fermentning o'zi asos joylashtirilishini tekshirishni amalga oshiradi. Aksariyat bakterial polimerazalar, 5'-3' yo'nalishidagi polimerizatsiya faolligidan tashqari, 3'-5' yo'nalishi bo'yicha ekzonukleaz faolligiga ega. Agar "noto'g'ri" nukleotid kiritilgan bo'lsa, xato ko'pincha (har doim ham emas) polimeraza tomonidan tanib olinadi, ehtimol bu yerda ikki zanjirli DNK spiralida bo'rtib chiqish paydo bo'lishi sabablidir. Yoki "noto'g'ri" nukleotid komplementar asos bilan vodorod aloqasini hosil qila olmasligi sababli, polimeraza o'sayotgan 3'-OH chetga nukleotid qo'shmaydi. Replikatsiya jarayoni "noto'g'ri" nukleotid olib tashlanib, kerakli asos o'z joyiga tushmaguncha to'xtaydi. E. colida mutator (mutD) nomiga ega gen mavjud, u mutatsiyaga uchraganda DNK polimeraza III ning ϵ (epsilon) subbirligi shikastlanadi. MutD genining mutatsiyasi 3'-5' yo'nalishi bo'yicha kiritilgan nukleotidlarning tekshiruv tizimida nuqsonni keltirib chiqaradi. Natijada, noto'g'ri kiritilgan nukleotidlarning ko'pi reparatsiya qilinmagan bo'lib qoladi va barcha genlarda mutatsiyalar paydo bo'ladi.

Eukariotik DNK polimerazalarida 3'-5'-ekzonukleaz faollik aniqlanmagan.

Fotoreaktivatsiya. DNK reparatsiyasi 1949 yilda A. Kyolner, R. Dyulbekko va I.F. Kovalyov tomonidan bir-biridan mustaqil ravishda kashf etilgan. Ular aktinomitsetalar, bakteriofaglar va parametsiyalar

ultrabinafsha nurlanishidan keyin oddiy yorug'lik ta'siri ostida tiklanishini aniqlagan. Bo'lajak Nobel mukofoti laureati M. Delbryukning maslahati bilan bu hodisa fotoreaktivatsiya deb nomlandi. Ultrabinafsha nurlari natijasida hosil bo'lgan timin dimerlari yorug'lik ta'siri ostida yo'q qilinadi va timinlar asl shakliga qaytadi.

Fotoreaktivatsiya *phr* geni bilan kodlangan fotoliaza fermenti yordamida katalizlanadi. Ushbu ferment yorug'lik fotoni tomonidan faollashtirilganda, dimerni o'ziga xos tarkibiy qismlarga ajratadi. *Phr* genining mutatsiyasiga ega organizmlar fotoreaktivatsiyaga qodir emas. Fotoliaza prokariotlarda va bazi sodda eukariotlarda uchraydi, ammo odamlarda bo'lmaydi.

Alkillanish natijasidagi shikastlanishni tiklash. Alkil yoki metil guruhlarining qo'shilishi natijasida kelib chiqqan genetik ziyon ushbu guruhlarini maxsus fermentlar tomonidan olib tashlanishi bilan tiklanishi mumkin. Shuni ta'kidlash kerakki, ushbu reparatsiya tizimida o'zgartirilgan asos DNKdan chiqarilmaydi. Bunday holda, *ada* geni tomonidan kodlangan ferment (O^6 -metilguanintransferaza) DNKdagi O^6 -metilguaninni taniydi va metil guruhini olib tashlab, asosni asl holatiga qaytaradi.

Polinukleotidligazning ta'siri. To'g'ridan-to'g'ri reparatsiya reaksiyalarining yana bir turi aniqlangan, bunda, masalan, ionlashtiruvchi nurlanish natijasida parchalangan bir zanjirli DNK tiklanadi. Bunday holda, DNK-polinukleotidligaza fermenti yordamida DNK molekulasida uzilgan uchlarni to'g'ridan-to'g'ri birlashtirish sodir bo'ladi.

Nukleotid juftlarini ekstsiziyalash (kesish) bilan bog'liq tiklash mexanizmlari. DNK reparatsiyasida jarrohlik aralashuvni eslatuvchi murakkab tiklanish reaksiyalari mavjud, shikastlangan joylar DNK zanjiridan "kesib tashlangandan" so'ng, bo'shliqlar shikastlanmagan materiallar bilan to'ldiriladi. Bu mexanizmlar 1964 yilda R. Boyce, P. Howard-Flanders, R. Setlow va W. Carrier guruhlari tomonidan kashf etilgan. Ushbu mualliflar *E. coli*-da bir nechta UB-sezgir mutantlarni aniqladilar, ularda ultrabinafsha nurlari ta'siridan so'ng qorong'ulikda mutatsiyalar ko'proq paydo bo'ldi. Ushbu mutatsiyalarga *uvrA* (UV-repair – UB reparatsiya) deb nom berildi. *UvrA* mutantlarida faqat yorug'lik iste'moli bilan dimerlar reparatsiya qilinishi mumkin, ya'ni ularda normal fotoreaktiv tizim mavjud. Bundan kelib chiqib,

yorug'likni talab qilmaydigan yana bir reparatsiya tizimi bo'lishi kerakligi tahmin qilindi. Ushbu tizim qorong'i yoki ekstsizion reparatsiya deb nomlandi. Yovvoyi tipdagi hujayralar qorong'ilikda dimerlarni reparatsiya qilishi mumkinligi sababli, ulardagi allel $uvrA^+$ deb nomlandi.

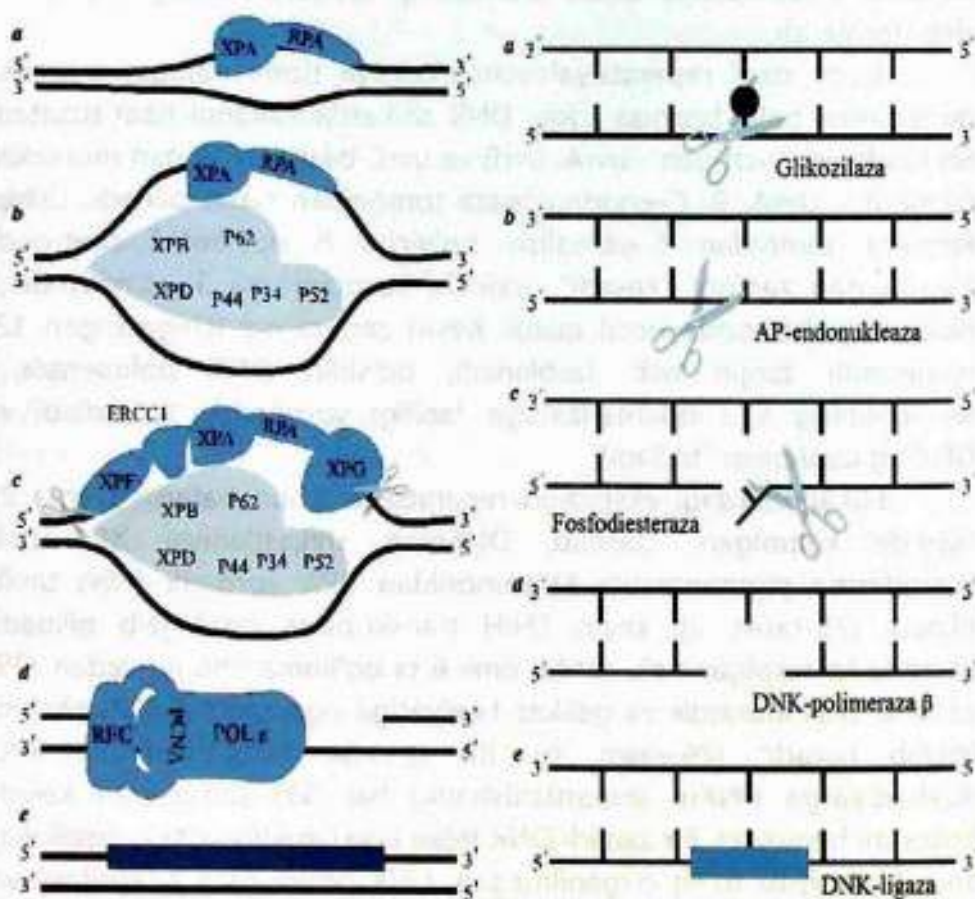
E.coli dagi reparatsiyalovchi ekstsiziya tizimi nafaqat pirimidin dimerlarini, balki boshqa jiddiy DNK shikastlanishlarini ham tuzatadi. Shikastlanish, uch gen - $uvrA$, $uvrB$ va $uvrC$ bilan kodlangan murakkab ferment - UvrA, B, C-endonukleaza tomonidan tanib olinadi. Ushbu ferment dimerdan 5'-yo'nalish bo'yicha 8 nukleotid chetroqda zararlangan zanjirni "kesadi", ikkinchi kesmani esa 3'-yo'nalishda 4 nukleotid chetroqda hosil qiladi. Keyin zararni o'z ichiga olgan 12-nukleotidli zanjiri olib tashlanadi, bo'shliq DNK polimeraza I fermentining 5'-3'-polimerizatsiya faolligi yordamida to'ldiriladi va DNK ligazasi bilan "tikiladi".

Eukariotlardagi ekstsizion reparatsiya uchun batafsil sxema 26 rasmda keltirilgan. Dastlab, DNKning shikastlanishi XPA-oqsili (Xeroderma pigmentosum-A) tomonidan RPA yordami bilan tanib olinadi (25-rasm, a), keyin TFIIH transkripsiya omili jalb qilinadi. Rasmda ko'rsatilganidek, ushbu omil 6 ta bo'linma, shu jumladan XPB va XPD dan iboratdir va gelikaz faoliyatiga ega, yani DNK tuzilishini "ochib beradi" (26-rasm, b). Bu spesifik ERCC1-XPF va XPG nukleazalarga DNKni shikastlanishning har ikki tomonidan kesish imkonini beradi (c). Bir zanjirli DNK bilan bog'lanadigan XPC oqsilining aniq funksiyasi to'liq o'rganilmagan. DNK polimeraza ϵ (epsilon) va yordamchi oqsillar RFC va PCNA bo'shliqni qoplaydi (d). Yangi zanjir eski DNK bilan ligaza yordamida ulanadi (e).

Ekstsizion reparatsiya tizimi o'rganilgan organizmlarning ko'pchiligida topilgan. Ba'zida ekstsizion reparatsiya tizimida xatolar yuzaga keladi va bu xatolar UB nurlari ta'sirida qo'shimcha mutatsiyalarga olib keladi.

O'zgartirilgan azotli asoslar boshqa yo'llar bilan ta'mirlanadi (25-rasm). Hujayralar tarkibida glikozilaza fermenti mavjud bo'lib, ular g'ayritabiiy asosni aniqlab olib, ushbu asosi va uglevod orasidagi glikozidik aloqani buzib, deoksiribozadan ajralishini katalizlaydi. Ushbu katalitik faollik bazani olib tashlangan DNKda bo'shliq qoldiradi. Bu bo'shliq AR zonasi deb ataladi (agar A yoki G bo'lmasa apurin, agar C

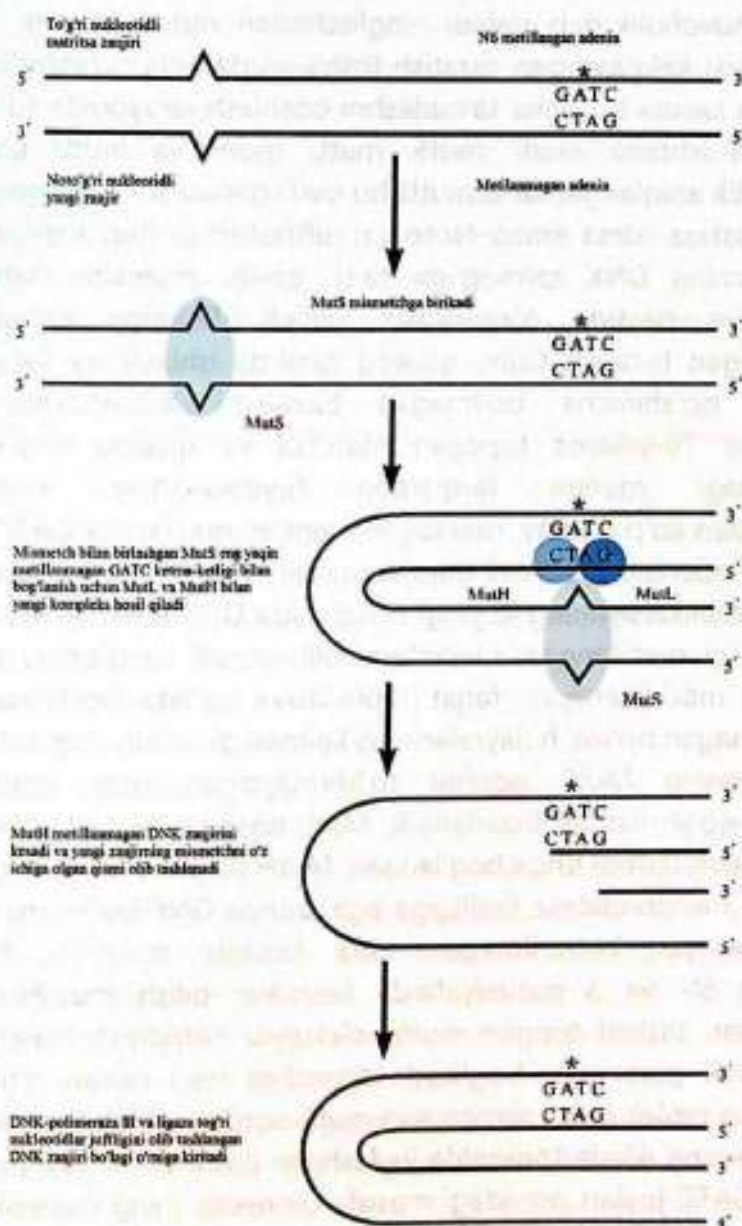
yoki T bo'lmasa apirimidin). AP-endonuklez fermenti bo'shliqlar mavjudligini aniqlaydi va shikastlangan bazaning 5' uchida DNK orqa miya qismini kesib tashlaydi.



25-rasm. Nukleotidlarning ekstsizion reparatsiyasi modeli (chapda) va glikozilazalar yordamida tiklash modeli (o'ngda).

Keyin fosfat β -DNK polimerazasining fosfodiesteraza faolligi yordamida kesilgan ipning 5' oxirida chiqariladi. Bitta nukleotiddan hosil bo'lgan bo'shliq DNK polimeraza β bilan to'ldiriladi va DNK ligazasi I yoki DNK ligaza II yordamchi oqsil XRCC1 bilan muhrlanadi. Bugungi kunga qadar glikosilaza fermentlarining ko'plab turlari tavsiflangan, ularning har biri metillangan, oksidlangan, pasaytirilgan, zararsizlantirilgan, shuningdek formamid kukunlari bilan bog'liq asoslarni tan oladi.

Ushbu tuzatish tizimidagi DNK polimerazasining faolligi, ferment yangi DNK tasmasini yaratib, o'sib boruvchi DNK tasmasi oldidagi nukleotidlarni olib tashlaganida, bu "nik tarjimai" deb nomlanadi.



26-rasm. Mismatch-tizimli reparatsiya mexanizmi.

Bog'lanmagan bazani ta'mirlash. Juda tez-tez (E.Kolida 10 TPNga bir marta, eukaryotlarda ko'proq) DNK replikasiyasi paytida juftlashuv xatolari yuzaga keladi, natijada to'ldiruvchi nukleotidlar o'rniga qo'shimcha DNK zanjiri hosil bo'ladi. ona ipidagi nukleotidlar (ular nomuvofiqlik deb ataladi - inglizchadan. mos kelmaslik). Bunday xatolar mos kelmaydigan tuzatish tizimi yordamida tuzatiladi. E. coli-da ushbu sxema bo'yicha ta'mirlashni boshlash jarayonida to'rtta gen mahsuloti ishtirok etadi: mutS, mutL, mutH va mutU (26-rasm). Keyinchalik aniqlanganidek, mutU bu uvrD genini shifrlaydigan helikaz II-dan boshqa narsa emas. Noto'g'ri juftlashtirish (replikatsiya xatosi) faqat qizning DNK tarmog'iga ta'sir qilishi mumkin: matritsa ipi replikasiya paytida o'zgarishsiz qoladi. Shuning uchun, mos kelmaydigan tuzatish tizimi qizaloq zanjirda ishlashi va faqat uning ichidagi qo'shimcha bo'lmagan bazalarni almashtirishi kerak. Hujayralar 70-yillarda topilgan matritsa va qizaloq strandlarning tuzilishidagi muhim farqlardan foydalanadilar. Replikatsiya tugagandan ko'p o'tmay, maxsus fermentlar, metilazalar GATC ketma-ketligida adeninlarga metil guruhlarini biriktirgani ma'lum bo'ldi. Shu sababli, replikasiyaning keyingi bosqichida DNK iplari ajralib chiqadi: ota-ona ipi metillangan adeninlarni olib yuradi va qizaloq strekda ularning modifikatsiyasi faqat replikasiya oxirida boshlanadi. Ular tozalanmagan bo'lsa, hujayralar mos kelmasligi uchun vaqt kerak.

Jarayon MutS oqsilini to'ldirmaydigan mos kelmaydigan juftlikka qo'shilishdan boshlanadi. MutL oqsil va ikkita MutH protein molekulari darhol unga bog'langan. MutH oqsillari GATC mintaqasini taniydi va endonukleaz faolligiga ega, bunda DNK bu ketma-ketlikda adenina yaqinlashtirilmagan ipda kesilishi mumkin. Adenina nisbatan 5'- va 3'-pozitsiyalarda kesmalar qilish mumkin. Ushbu oqsillardan tashkil topgan multimolekulyar kompleks massiv bo'lib, uzoq DNK parchasini bog'laydi. Ikkinchisi majmuadan o'tib, MutS oqsilining molekulari tomonidan mutS oqsilini ushlab turadigan mos kelmaslikning ikkala tomonida joylashgan ikkita GATC joyiga tushadi. Ba'zan GATC joylari orasidagi masofa bir necha ming nukleotidlardan oshib ketishi mumkin. Endonukleaz faoliyati tufayli MutH qizaloq ipini kesadi. Agar bunday kesma adeninning 5'tomonida amalga oshirilsa, unga yana bir protein qo'shiladi - DNK iplarini 5'-3 'tomonga

ajratadigan eksonukleaz. Ushbu protein butun qizaloq ipni noto'g'ri juftlash joyiga olib keladi va hatto bir oz ko'proq yuradi. Agar birlamchi kesma mitti tomonning 3'tomonidan qilingan bo'lsa, unda DNK bo'ylab 3'-5' 'yo'nalishi bo'yicha harakatlanadigan yana bir eksonukleaz talab qilinadi. Mos kelmaydigan sayt yo'q qilinmaguncha uning ishi davom etadi. Keyin, ikkala holatda ham, 5'-3'- va 3'-5'-eksonukleaz bilan, bo'shliqlar DNK polimeraza bilan to'ldirilishi kerak va uchlari ligazalar bilan birlashtiriladi. Albatta, dastlabki qisqartirishdan keyin iplarning uchlari bo'shatish uchun DNK molekulasini bo'shatish kerak (bir helikaz oqsili talab qilinadi), ATP shaklida energiya manbalari va bo'shliqlarni qurish uchun deoksiribonukleozid trifosfatlari ham kerak. Jarayon inson hujayralarida, xamirturushda va ba'zi boshqa organizmlarda uchraydi.

6.6. Postreplikativ yoki rekombinatsiya, ta'mirlash (PRR).

DNK yaxlitligini tiklashning bu usuli zanjirlarda hosil bo'lgan bo'shliqlarni tuzatishdan iborat, aksincha, pirimidin dimmerlarining ko'payishi paytida chiqarilmaydi. Ushbu bo'shliqlarning aksariyati ikkita singil DNK molekulalari orasidagi rekombinatsiya almashinuvi orqali ta'mirlanadi. Hujayralarda RRP jarayoni kamida 17 gen tomonidan boshqariladi.

Replikatsiya jarayoni tugallangan DNK matritsasining qo'shimcha qismidan (u nuqsonlardan xoli edi) RecA oqsilidan foydalanib, buzilish uzunligiga teng DNKning bir qismi kesilib, buzilgan joyga kiritildi. Keyin ligazalar qo'shilgan qismning uchlari qizaloq ipning normal sintezlangan qismining uchlari bilan bog'laydi. Shundan so'ng, boshqa tuzatish fermentlari dastlab shikastlangan ipdagi nuqsonni bartaraf qiladi va DNK "davolanadi". Shu bilan birga, ona ipidan kesilganidan keyin qolgan bo'shliq DNK polimeraza I bilan qurilgan va uchlari ligaz bilan bog'langan.

SOS ta'mirlash. Agar hujayra DNKni ko'paytirish kerak bo'lgan joyga kelsa, lekin yuqorida tavsiflangan tuzatish tizimlarining hech biri tiklay olmaydigan jarohatlar bo'lsa? Dastlabki tiklanmagan zarar natijasida replikatsiya to'xtaydi va agar DNKda ularning ko'pi bo'lsa, hujayra o'lishi kerak. Bunday sharoitda 1974 yilda birinchi marta M.

Radman tomonidan kashf qilingan yana bir o'ta xavfli ta'mirlash mexanizmi hujayralarda faollashadi. U bu DNK polimeraza kompleksi bilan bog'laydigan oqsillarning sintezini qo'zg'atadi va matritsa zanjirining qarama-qarshi nuqsonli bo'laklariga DNK tuzilishini ta'minlaydi, deb aniqladi. Radman ushbu mexanizmni SOS-tiklash deb nomladi. SOSni tiklash natijasida ushbu bosqichda hujayra saqlanib qoladi: xato bo'lsa ham, uning DNKi ikki baravar ko'payadi va endi hujayralar bo'linishi mumkin. Ammo agar hayotiy funksiyalar hali ham umidsiz ravishda buzilsa, bunday hujayralar keyinchalik baribir o'ladi.

Noto'g'ri tuzatish tizimlari inson tomonidan meros qilingan ba'zi kasalliklar bilan bog'liq.

1968 yilda J. Klever davolab bo'lmaydigan kasallikning sababi - kseroderma pigmenti turli xil tuzatish tizimlaridagi nuqsonlardan kelib chiqadi. Kasallikning tashuvchisida, odatda quyosh nurlari ta'sirida, doimo UB nurlari mavjud bo'lib, terida qizil dog'lar paydo bo'lib, ular asta-sekin o'smaydigan po'stlog'iga aylanib, ko'pincha saraton o'smalariga aylanadi.

Hozirgi vaqtda ma'lumki, insonning ko'plab boshqa irsiy kasalliklari turli xil ta'mirlash jarayonlarining alohida bosqichlariga zarar etkazadi.

6.7. Krossingoverning molekulyar asoslari.

Genetika rekombinatsiyasi bir-biri bilan o'zaro bog'liq bo'lgan bir necha jarayonlarni o'z ichiga oladi, natijada ular paydo bo'lgan hujayralar yoki organizmlarda elementlarning yangi birikmalari - genetik ma'lumot tashuvchilari yaratiladi. Homolog xromosomalar o'rtasidagi rekombinatsiya meiosis paytida otalar va onalar genlarining keskin aralashishiga olib keladi. Qoidaga ko'ra, DNK replikatsiyasi paytida yoki undan keyin somatik hujayralarda sodir bo'ladigan va singil xromatid almashinuvi sifatida paydo bo'ladigan rekombinatsiya hodisalari hujayra genotipi yoki fenotipining o'zgarishiga olib kelmaydi. Bunga rekombinatsiya mos keladigan tayanch juftliklar o'rtasida sodir bo'lishi, shunda rekombinant xromosomalardan hech qanday nukleotid qo'shilmaydi yoki chiqarilmaydi.

Rekombinatsiyaning uch turi mavjud: 1) umumiy yoki homologik, 2) saytga xos, 3) tasodifiy yoki homolog bo'lmagan.

Gomologik DNK ketma-ketliklari o'rtasidagi almashinishni o'z ichiga olgan rekombinatsiya umumiy yoki homologik rekombinatsiya deyiladi. Eukaryotlarda, odatda, meozisda DNK qismlari almashinadi erkaklarda (spermatogenez paytida) va ayollarda (oogenez davrida). Bu to'rtta xromatidlar bosqichida sodir bo'ladi va to'rtta xromatiddan ikkitasi almashinuvda ishtirok etadi.

Hodisaning yana bir turi aniq ketma-ketliklar orasidagi rekombinatsiya bilan bog'liq va prokaryotlar va xamirturushlarga xosdir. Saytga xos rekombinatsiya faj genomlari bakterial xromosoma tarkibiga kirganda yuzaga keladi. Rekombinatsiya natijasida homologiyaning qisqa bo'limlarini aniqlaydigan faj va bakterial DNK ketma-ketliklari almashinadi. Ushbu hodisada ishtirok etadigan fermentlar faqat ma'lum bir juft ketma-ketlikda harakat qiladi.

Gomologik bo'lmagan nukleotidlar orasidagi rekombinatsiya kamdan-kam hollarda prokaryotik va xamirturush hujayralarida va sut emizuvchilar hujayralarida uchraydi. Gomologik bo'lmagan rekombinatsiya hayvonlar hujayralarining DNKiga virusli yoki plazmid DNKni tasodifiy kiritish jarayonini o'z ichiga olishi mumkin.

Gomologik rekombinatsiya. Gomologik rekombinatsiya ikki tomonlama DNK molekulari o'rtasida sodir bo'ladi. Shuni ta'kidlash kerakki, ushbu jarayonda ishtirok etadigan fermentlar substrat sifatida har qanday homologik ketma-ketlikni ishlatishi mumkin.

Krossoverning molekulyar hodisalari mezoziyning ma'lum bosqichlari bilan chegaralanadi. Mayoz profilaktikasi boshlanishini individual xromosomalar ko'rinadigan bosqich deb hisoblash mumkin. Ushbu xromosomalarning har birida DNK allaqachon ko'paygan va ikki tomonlama DNKdan iborat ikkita singil xromatidlardan iborat. Gomologik xromosomalar bir-biriga jalb qilinadi, bir yoki bir nechta mintaqada konjugatsiyalanadi, bivalents hosil qiladi. Xromosomalarni birlashtirish jarayoni tugagach, xromosomalar sinaptonemal kompleks deb nomlangan struktura tufayli lateral ravishda birlashadi.

Xromosomalar orasidagi rekombinatsiya, "singish va birlashish" tamoyili bo'yicha sodir bo'ladigan qismlarning fizik almashinuvini anglatadi, bunda ikkita opa-singil bo'lmagan xromatidlar sindirib, keyin birlashadi. Xromosomalar tarqalishni boshlaganda, ularning bir-biri bilan aloqalari xiazma deb ataladigan shaklda qoladi.

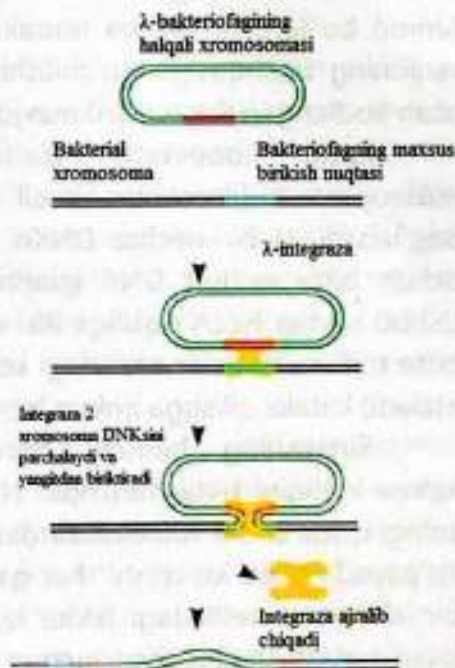
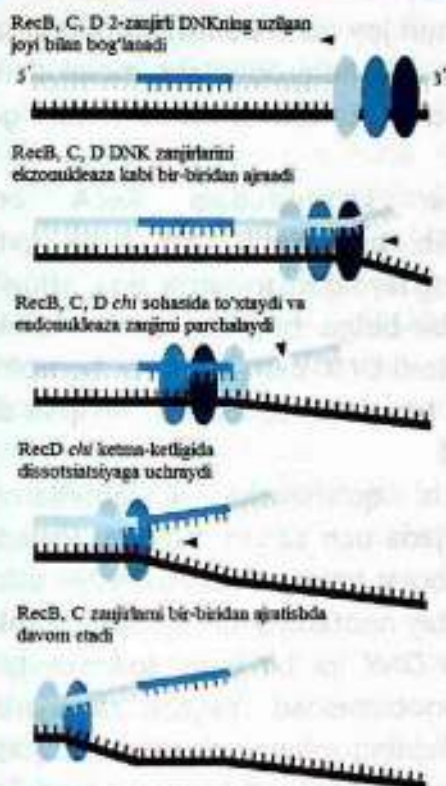
An'anaga ko'ra, xiasmas o'tish joyining mavjudligini aks ettiradi, ammo bu bog'liqlikning rasmiy dalillari hali olinmagan.

Prokaryotlarda har bir rekombinatsiya bosqichida ishtirok etadigan fermentlar va hec deb nomlanuvchi genlar ma'lum. Ushbu genlarning mutatsiyalari fenotipik ravishda rekombinatsiya qila olmaslik bilan namoyon bo'ladi. Ushbu genlarning 10-20 tasi aniqlangan.

Ko'rinishidan, DNK rekombinatsiyasining boshlanishidagi birinchi qadam bu ikki tomonlama DNK molekularining birlashishi.

DNK duplekslari orasidagi almashinuv kamida ikkita bo'shliqni - nislarni shakllantirishni talab qiladi. Umumiy rekombinatsiya mexanizmida ushbu laqablarning kelishilgan shakllanishi va bo'shliqlarning muhrlanishi faqat ikkita DNK iplari gologiyaning katta hududlarida bo'lganda mumkin bo'ladi. Bunday tuzilmani olish uchun keyingi zanjir bilan to'rt zanjirning har birida bo'shliq hosil bo'lishi kerak.

Hatto bitta DNK molekulasidagi bitta bo'shliq ham umumiy rekombinatsiyani boshlash uchun etarli ekanligiga ko'plab dalillar mavjud. Bitta simli taxalluslarga olib keladigan kimyoviy moddalar yoki nurlanish rekombinatsiyani rag'batlantiradi.



27-rasm. RecB, C, D proteinli kompleksining faoliyati (chapda), λ -bakteriyofagi DNKsining bakterial xromosomaga joylashtiriliishi (o'ngda).

Fag Mut mutantlari DNKning rekombinatsiyasini boshlaydigan maxsus bo'limlariga ega: uzunligi 8 bp nukleotid motiflari, ular o'zlari rekombinatsiyaga olib kelmaydi, lekin buning uchun zarurdir. Ular qo'shni DNKda rekombinatsiyani 10 TPNgacha bo'lgan masofada rag'batlantiradilar. Jarayon bir necha ming juft juft nukleotidlarning xiydan va ma'lum bir yo'nalishda ketma-ket uzilishi natijasida faollashadi. Xi joylari E. coli recB, C, D genlari tomonidan kodlangan fermentlar majmuasi uchun maqsaddir (27-rasm). Birinchidan, RecB, C, D oqsillari DNKdagi ikki qatorli tanaffus bilan bog'lanadi, so'ngra ular harakatlanadi.

DNKni bo'shatib, zanjirning 3'-uchini yomonlashtiradi. Kompleks chi lokusga yetganda, u ushlanib qoladi va shu zanjirning birini bog'laydi, shundan keyin u protein proteinini yo'qotadi. Shu sababli kompleks nuklazali faollikni yo'qotadi. RecB, C, D harakati natijasida DNKning erkin uchi ("antennalar") paydo bo'ladi, bu esa

heteroduplekslarning birlashishi uchun joy hosil bo'lishiga olib keladi. Ammo bu jarayon ancha murakkab. Bir heterodupleks molekuladan zanjirning boshqasiga qo'shilishi uchun E. coli tarkibida hessA geni bilan kodlangan RecA oqsil mavjud.

Katta kooperativ klasterlar ko'rinishidagi RecA oqsil nukleoprotein filamentini hosil qilib, bitta simli DNK bilan qattiq bog'lanadi. U bir nechta DNKni bog'laydigan joylarga ega, shuning uchun bitta va juft DNK iplarini bir-biriga bog'lab turish mumkin. Ushbu saytlar RecA oqsiliga ikki qatorli DNK molekulasi va homologli bitta torli mintaqalar orasidagi ko'p bosqichli reaksiyani (sinapsis deb ataladi) kataliz qilishga imkon beradi.

Sinapsning birinchi bosqichi qo'shimcha nukleotidlarning ketma-ketligini birlashtirishdir. Natijada uch zanjirli tuzilish. Shundan so'ng, qisqa shoxli molekulalardan iborat filtrlar «filial ko'chishi» tufayli ko'payadi. "Filial ko'chishi" har qanday nuqtada sodir bo'lishi mumkin, bir xil ketma-ketlikdagi ikkita bitta DNK ipi bir-birini to'ldiruvchi ip bilan birlashish qobiliyati uchun raqobatlashadi. Yagona zanjirlardan birining bo'linmagan qismi filialning harakatlanish nuqtasini harakatlantirib, ikkinchisining juftlangan mintaqasi bilan almashtiriladi. Filialning o'z-o'zidan harakatlanishi har qanday yo'nalishda bir xil darajada mumkin. RecA oqsillari filialning bir yo'nalishli harakatini katalizlashtirgani sababli, bu uzunligi bir necha ming tayanch juftliklari bo'lgan heterodupleks mintaqani yaratadi.

Shundan so'ng, o'rganilgan organizmlarning aksariyatida, Xollidid tuzilmalari o'zaro faoliyat almashinuv zanjirlari paydo bo'lishi boshlanadi. Ushbu tuzilmalarda, to'rtta zanjirning ikkitasi o'rtasida hosil bo'lgan almashinish tufayli bir-biriga bog'langan ikkita homolog DNK molekulasi: har bir DNK molekulasidan bittasi. Holliday tuzilishi ikki xususiyatga ega: 1) zanjirlar orasidagi almashish nuqtasi tezda orqaga va oldinga siljishi mumkin; 2) u ikkita juft zanjirdan iborat - bir juft kesishgan va bir juft kesmaydigan.

Izomerizatsiya yuz berishi mumkin: bir qator aylanishlardan so'ng dastlab ajraladigan molekulalar kesishadi va aksincha. Izomerizatsiya o'z-o'zidan va hujayraning nazorati ostida sodir bo'lishi mumkin.

Ikki alohida DNK ipini tiklash va shu bilan molekulalarni birlashtirish jarayonini yakunlash uchun ikkita kesishuvchi zanjirni

kesish kerak. Agar ular izomerizatsiya qilishdan oldin kesilgan bo'lsa, ikkita asl spiral bir-biridan deyarli o'zgarishsiz ajralib chiqadi. Agar kesishgan iplar izomerizatsiya qilinganidan keyin kesilgan bo'lsa, asl DNK iplarining har biri bitta molekulaning bir qismiga ulangan, boshqacha qilib aytganda, ikkita DNK ipi kesib o'tgan.

Saytga xos rekombinatsiya. Umumiy rekombinatsiyadan farqli o'laroq, bir-ikkita rekombinatsiya molekulalarida mavjud bo'lgan nukleotidlarning ketma-ketligini aniqlaydigan fermentlar nazorati ostida saytga xos rekombinatsiya sodir bo'ladi. Ushbu turdagi rekombinatsiya yordamida bakterial viruslar va mobil elementlar genom bo'ylab harakatlanadi.

Saytga xos rekombinatsiya bakteriofagning *E. coli* xromosomasi bo'ylab harakatlanish mexanizmini o'rganish natijasida aniqlandi. Integratsiyalashgan holatda, virus bakterial xromosoma ichiga kiritiladi va mezbon hujayraning DNK qismi sifatida ko'payadi. Virus hujayraga kirganda, integras fermenti virusli genning matritsasida sintezlanadi. Ushbu ferment rekombinatsiya jarayonini katalizlaydi, bu integral oqsilning bir necha molekulari faj halqasi xromosomasidagi ma'lum ketma-ketliklar bilan mahkam bog'langanida boshlanadi. Natijada paydo bo'lgan DNK-protein kompleksi endi bakterial xromosomada o'xshash, ammo bir xil bo'lmagan ketma-ketliklar bilan bog'lanadi va shu bilan bakterial va faj xromosomalarini birlashtiradi (27-rasm). Keyin integras DNK molekulalarida kesmalar hosil qilib, heterodupleksning kesishgan joyini tashkil qiladi.

Integras DNK topoizomeraziga o'xshaydi, chunki u DNK bilan sindirilgan joyda kovalent aloqani hosil qiladi. Xuddi shu saytga tegishli rekombinatsiya mexanizmi faqat qarama-qarshi yo'nalishda, integratsiya saytidan faj λ chiqarilganda kuchga kiradi.

Drosophilada eksperimental saytga xos rekombinatsiya. Xamirturush genomida rekombinatsiyani induksiya qilish uchun zarur bo'lgan hamma narsani (rekombinaza) o'z ichiga olgan FLP tizimi mavjud. FLP oqsil mahsuloti FRT (FLP rekombinatsiya maqsadlari) saytlari tomonidan qabul qilinadi, ularning uzunligi qariyb 600 bp. FLP 2km doirali mini xromosomada (plazmid) joylashgan. FRT qismlari genomning istalgan qismida joylashgan bo'lishi mumkin.

Plazmid 2 m doirada rekombinaz geni (FLP) ham, FRT mintaqasi ham mavjud. Ushbu gen elementlari to'plami rekombinatsiyadan

o'tish uchun etarli. Bundan tashqari, agar FRT ketma-ketliklari bir-biriga yo'naltirilgan bo'lsa, u holda inversiya orqali o'tish natijasida hosil bo'ladi, agar FRT to'g'ridan-to'g'ri takrorlanish shaklida bo'lsa, o'chirish va ko'paytirish olinadi.

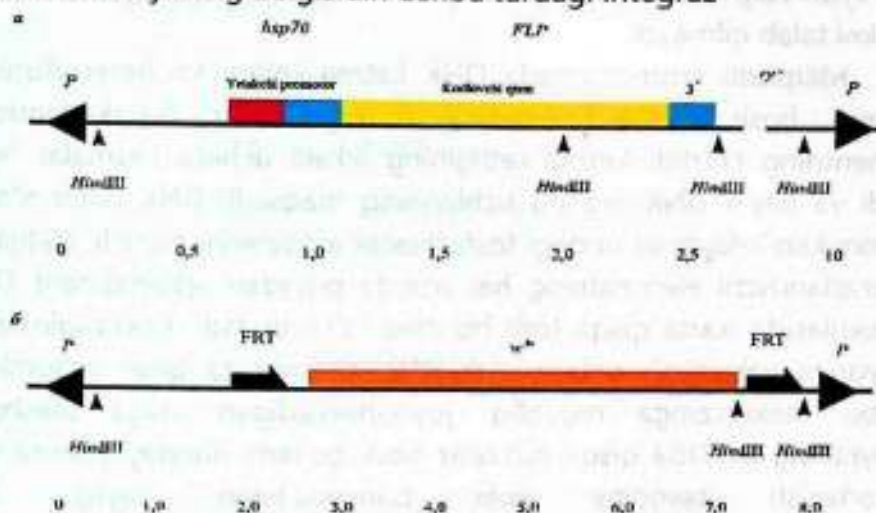
Drosophila genomiga transformatsiya orqali butun tizimni kiritish mumkin. Buning uchun ikkita konstruktsiya yaratildi: bitta FLPda ular issiqlik zarbalari genlari qo'zg'atuvchisi nazorati ostida joylashtirilgan, shunda rekombinatsiya yuzaga kelishi mumkin, boshqa konstruktsiyada oq gen FRTlar orasida joylashgan bo'lib, ularni yo'q qilish yoki ko'paytirish orqali kimdir sodir bo'lgan rekombinatsiya to'g'risida hukm chiqarishi mumkin (28-rasm).

Shubhasiz, agar siz FRT ketma-ketliklarini P-elementga joylashtirsangiz va uni genom bo'ylab harakat qilsangiz, Drosophila genomining eng xilma-xil qismlarida P-elementning yozuvlari va shuning uchun FRT bo'limlari bilan juda ko'p sonlarni olishingiz mumkin. Keyin, P-elementlarning ma'lum lokalizatsiyasiga ega bo'lgan chiziqlar juftligini tanlab, tanlangan xromosoma mintaqalari orasidagi yo'nalishni, ko'payishni va inversiyani olish mumkin (28-rasm).

Tasodifiy rekombinatsiya. Ko'pgina mobil DNK ketma-ketliklari, shu jumladan viruslar va mobil elementlar, ularning DNKlarini bakteriofagdan farqli mexanizm yordamida xromosoma ichiga kirishiga imkon beruvchi integrallarni (yoki boshqacha aytganda, transpozazalarni) kodlaydilar. Λ -integraz singari, ushbu fermentlarning har biri rekombinatsiyasi katalizatsiyalanadigan mos keladigan harakatlanuvchi elementdagi o'ziga xos DNK ketma-ketliklarini aniqlaydi. Fag λ integrazidan farqli o'laroq, ushbu integrallar o'ziga xoslikni talab qilmaydi

Maqsadli xromosomada DNK ketma-ketligi va heterodupleks birikma hosil qilmaydi. Buning o'rniga, ular harakatlanuvchi elementning chiziqli ketma-ketligining ikkala uchida kesmalar hosil qiladi va keyin DNKning bu uchlarining maqsadli DNK bilan o'zaro ta'sirini katalizlaydi va undagi fosfodiester aloqalarini buzadi. Natijada, harakatlanuvchi elementning har uchida bittadan rekombinant DNK molekulasida ikkita qisqa torli bo'shliq hosil bo'ladi. Rekombinatsiya jarayonini yakunlash uchun ular DNK polimeraza bilan to'ldiriladi. Ushbu mexanizmga muvofiq, joylashtiriladigan joyga ulashgan xujayraning DNKida qisqa nusxalar hosil bo'ladi. Bunday yonma-yon

takrorlanish tasodifiy yoki transpozitsion, saytga xos rekombinatsiyaning belgisidir. Ushbu turdagi integras



Drozofilada transformatsiyani o'qazish uchun taqribida FLP va FRT bo'c tuzilmalar



28- rasm. Drozofilada genomidagi transformatsiya orqali rekombinatsiya Tepada: Drozofilada FLP va FRT yordamida transformatsiyani amalga oshirish

Pastda: ikkita qarama-qarshi yo'naltirilgan FRT-hududlar yordamida inversiyani yuzaga keltirish

Tasodifiy rekombinatsiya. Ko'pgina mobil DNK ketma-ketliklari, shu jumladan viruslar va mobil elementlar, ularning DNKlarini bakteriofagdan farqli mexanizm yordamida xromosoma ichiga kirishiga imkon beruvchi integrallarni (yoki boshqacha aytganda, transpozazalarni) kodlaydilar. Λ -integras singari, ushbu fermentlarning har biri rekombinatsiyasi katalizatsiyalanadigan mos keladigan

harakatlanuvchi elementdagi o'ziga xos DNK ketma-ketliklarini aniqlaydi. Fag λ integrazidan farqli o'laroq, ushbu integrallar o'ziga xoslikni talab qilmaydi

Maqsadli xromosomada DNK ketma-ketligi va heterodupleks birikma hosil qilmaydi. Buning o'rninga, ular harakatlanuvchi elementning chiziqli ketma-ketligining ikkala uchida kesmalar hosil qiladi va keyin DNKning bu uchlarining maqsadli DNK bilan o'zaro ta'sirini katalizlaydi va undagi fosfodiester aloqalarini buzadi. Natijada, harakatlanuvchi elementning har uchida bittadan rekombinant DNK molekulasida ikkita qisqa torli bo'shliq hosil bo'ladi. Rekombinatsiya jarayonini yakunlash uchun ular DNK polimeraza bilan to'ldiriladi. Ushbu mexanizmga muvofiq, joylashtiriladigan joyga ulashgan xujayraning DNKida qisqa nusxalar hosil bo'ladi. Bunday yonma-yon takrorlanish tasodifiy yoki transpozitsion, saytga xos rekombinatsiyaning belgisidir. Ushbu turdagi integras fermenti avval faol bakteriya Mu bakteriyofagidan ajratilgan.

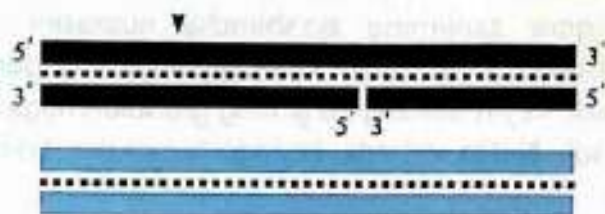
6.8. Gen konversiyasi

Ba'zida, miyozit natijasida, uchta allelning onadan va bitta otalik alleldan bitta nusxasi olinadi, bu otalik allelning bitta nusxasi onalikka o'zgartirilganligini ko'rsatadi. Ushbu hodisa gen konversiyasi deb ataladi. Bu ko'pincha umumiy rekombinatsiya va DNKning ta'mirlanishi bilan bog'liq.

Yuqorida ta'kidlab o'tilganidek, meiosis vaqtida homologik onalik va otalik xromosomalari orasidagi kesishish joylarida heterodupleksning birikmasi hosil bo'ladi. Agar xromosomalarning ushbu bo'limlari bir oz farq qilsa, qo'shilish mintaqasida nomuvofiqliklar paydo bo'lishi mumkin. Ushbu buzilishlar DNK tuzatish tizimi tomonidan tuzatiladi. Buning natijasi genlarni konvertatsiya qilish bo'ladi. Gen konversiyasi boshqa bir qator mexanizmlar tomonidan ham sodir bo'lishi mumkin, ammo ularning barchasi umumiy rekombinatsiyaning ba'zi variantlarini amalga oshirishni talab qiladi, unga ko'ra ikkita homologik DNK molekulari bir-biriga joylashadi. DNK parchalarining qo'shimcha nusxalari tayyorlanganda, konversiya jarayoni cheklangan DNK sintezi bilan birga keladi. Tajriba shuni ko'rsatadiki, odatda faqat kichik

Qora va kulrang allellarni farq qiladigan X-genidagi nuqta

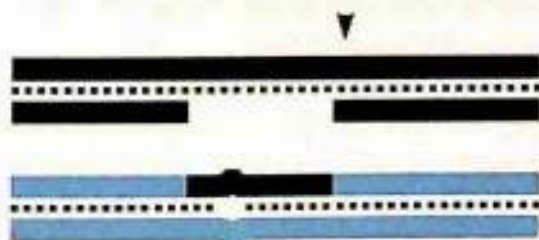
Bir zanjirning uzilishi



DNK-polimeraza qora allelning 1 zanjirini kulrang allelga ko'chirib, u bilan gibridlashtiradi



DNK-polimeraza to'xtaydi, 1-zanjirli bo'lakning ortiqchasi DNK-nukleazalar tomonidan olib tashlanadi, barcha qolgan bo'laklar ligazalar tomonidan birlashtiriladi



DNK replikasiyasi natijasida X-genining 3ta qora va bitta kulrang alleli hosil bo'ladi

Bitta kulrang allel qoraga aylantirildi

29-rasm. Genlar konversiyasi sxemasi.

Jarayon DNK zanjirlardan birida uzilish paydo bo'lishidan boshlanadi. Birinchi bosqichda DNK polimeraza asl nusxasini almashtirib, qora zanjirning qo'shimcha nusxasini sintez qilishni boshlaydi. Ushbu bittali zanjir kulrang zanjirning gomolog hududi bilan birlashadi. Keyin kulrang zanjirning gibridlanmagan qisqa hududi olib tashlanadi. Natija odatda keyingi hujayralar ko'payishi tsiklida ko'rinadi.

DNK bo'limlari gen konversiyasiga uchraydi va ko'p hollarda genning faqat bir qismi o'zgaradi.

Gen konversiyasi mitotik hujayralarda paydo bo'lishi mumkin, ammo kamroq tez-tez. Ikkala meiotik va mitotik hujayralardagi genlarni konversiyasining juda mumkin bo'lgan mexanizmlaridan biri sek. 29.

Nazorat uchun savollar:

1. Mutatsiyalarning xususiyatlari.
2. DNKni tiklash mexanizmlari.
3. Kesishning molekulyar asoslari.
4. Gen konversiyasi.

7 BOB. GENOM XROMOSOMALARINING TUZILISHI

Viruslar, prokariot va eukariot hujayralarining organoidlarini xromosomalari. Achitqilarning xromosomalari va genomi. Yuqori darajada tuzilgan eukariotlarning mitotik xromosomalari. Euxromatin va geteroxromatin. Telomeralar va telomerlarning getexromatini. Xromatin va xromosomaning diminuitsiyasi. Tsentromeraning tuzilishi. V-xromosomalari.

7.1. Virus, prokariot va eukariot hujayralari organoidlarining xromosomalari.

DNK –tutuvchi viruslar, bakteriyalar, ko'k-yashil suv o'tlari va o'z-o'zidan replikatsiyalanadigan eukariot hujayralarining organoidlarida (plastida va mitoxondriyalar) xromosoma qo'sh zanjirli DNK molekulasidan tashkil topgan. Ko'pchilik shakllarida ushbu molekula o'ralib, halqa shakliga keladi, ya'ni xromosoma o'ta spirallashgan holatda bo'ladi. Bakteriyalarning genomi maxsus "yadro" shaklida tuzilgan bo'lib, "nukleoid" deb nomlanadi (nucleus-yadro, oid - o'xshash). Bunday hujayra yadrosini shakllanmagan yadro deb ham ataladi.

Xromosomaning replikatsiyasi ma'lum bir joyidan (nuqta) boshlanadi (replikatsiyaning initsiatsiya nuqtasi) va butun xromosoma replikatsiyaga uchraguncha davom etadi. Demak, xromosoma replikatsiya jarayonini birligi hisoblanadi va replikon deb nomlanadi. Replikatsiya ko'pincha birdaniga xromosomaning har ikki tomonidan boshlanadi, bakteriyalarda esa, bu shakldagi replikatsiya doimiy tarzda kuzatiladi.

Virus va bakteriyalarda replikatsiya jarayoni juda tez o'tadi, bir minutda taxminan 30 mkm tezligida. Prokariotlarning xromosomasi hujayra membranasini ma'lum joylariga – replikatsiyaning boshlangich nuqtalari (oriC) va replikatsiyaning to'xtatuvchi nuqtalariga (oriC) kelib

birikkadi. DNK –tutuvchi viruslar, bakteriyalar, ko'k-yashil suv o'tlarida xromosomalarining DNK molekulasini uzunligi har xil.

Bakteriyalarning genomi. Ayrim bakteriyalarning genomi to'liq sekvenirlan bo'lib, ko'rinishi halqa shaklidagi DNK molekulasidan iborat bo'lganligi, o'lchami va genlarining miqdori aniqlangan. Masalan, *Bacillus subtilis*da DNK uzunligi 4214,814 tpn ga teng, genomi 4100- 4220 genlardan tashkil topgan, *E. Coli* da — 4639,221 tpn va taxminan 4290 genlardan iborat bo'ladi..

Bakteriyalarning irsiy apparati – nukleoid eukariotlar hujayrasining yadrosiga mos keladi: DNK, oqsil va RNKdan tashkil topgan, lekin yadro membranasi bo'lmaydi. Nukleoid hujayra tsitoplazmasida erkin joylashadi. Uning uzunligi, masalan ichak tayoqchasida 1 mkm ga teng. Nukleoidlar hujayra membranasi bilan birikkan bo'ladi, lekin faqat oriC va terC joylarda emas, balki "siljigan uchastkalar" deb nomlangan joylarda ham. Ushbu joylarda aynan shu vaqtda replikasiya jarayoni amalga oshgan bo'ladi. Bundan tashqari, membrana bilan boshqa "nospetsifik" kontakt hosil qilgan joylar ham mavjud ekan.

Hujayralarning bo'linishidan oldin nukleoidlarning irsiy moddasi ikki xissa ortadi, so'ng "qiz" nukleoidlar bir biridan ajralib ikkita qarama qarshi qutblarga yo'llanadi.

Nukleoidlarning ikki qutbga qanday mexanizm asosida yo'llanishini hozirgacha ham aniq emas. 1940-1950 yillarning boshlarida olimlar kuyidagi fikrga kelgan edilar, prokariotlarda ham eukariotlarnikiga o'xshash kariokinez jarayoni kuzatiladi. Keyinchalik, nukleoidlarning ajralishi oddiy passiv jarayon degan xulosaga kelishadi, hujayra aro to'siq ikki nukleoid orasiga kirib ularni ikkiga bo'ladi.

Oxirgi yillarda olimlar orasida nukleoidlarni ikki qutbga ajralishini maxsus oqsil kompleksi bajaradi degan fikr hukmronlik qiladi. Bakteriyalarning nukleoidida DNK kamida 5 xil oqsillar bilan assotsiatsiyada bo'ladi: HU, INF, HI, HLP, N. Ushbu oqsillar aminokislotalar tarkibi va boshqa xossalari bo'yicha eukariotlarning gistonlariga o'xshashdir. Ularning razmerlari katta emas – 9-28 kDa ga teng va ko'pchiligi asosli (ishqorli) oqsillardir. Yana shu narsani aytish o'tish kerak, ushbu oqsillar juda konservativ xususiyatlarga ega, chunki ichak bakteriyalar va ko'k-yashil suv o'tlarida 2-3 mlrd yil oldin HU-oqsillar antigen xususiyligi bilan boshqa oqillarga o'xshash bo'lgan.

Demak, divergentsiya tufayli oqsillarning har xil shakllari paydo bo'lgan ekan. E.coli tarkibida 30 mingga yaqin dimer oqsil HU va 120 ming monomer oqsil H bo'lishi aniqlangan.

Oqsil HU DNK molekulasini kondensatsiya qilib, nukleosomalar shakliga keltiradi va DNK replikatsiyasini kuchaytiradi. Lekin, E.coli tarkibidagi 30 mingga HU dimer oqsil faqat nukleoidning 1/6 DNKning shakllanishiga etadi xolos.

Oqsil HI DNK bilan bog'lanadi, lekin uning vazifasi aniq emas.

Oqsil R - sekvenirlangan, aminokislotalarning joylashish tartibi bo'yicha protaminlarga o'xshab DNK molekulasi bilan bog'lanadi, lekin qanday vazifa bajarishi noaniq. Oqsil INF nukleoidning domen strukturasi shakllantirishda qatnashadi, degan ma'lumotlar ilmiy adabiyotlarda keltirilgan.

Nukleoidning tarkibida DNKning miqdori 80%ni tashkil etadi. (eukariotlarning hujayra yadrosida DNKning miqdori faqat 50%). DNK molekulasi halqalar hosil qilib o'ralgan bo'ladi, har bir halqa 40ta tpm tashkil topgan. Genomda halqalar, ya'ni domenlar soni 100 atrofida bo'ladi.

Mitoxondriyalarning genomi. Mitoxondriyalar - hujayra organoidlari bo'lib, oksidlanish-fosforillanish (OF) jarayoni asosida ATF sinteziga javobgardir. Mitoxondriyalarning ichki membranasi kristalar hosil qiladi. Kristalarda 5ta fermentlar kompleksi joylashgan bo'ladi. Fermentlar kompleksi energiya hosil qilish va to'plash uchun oksidlanish-fosforillanish (OF) apparatini shakllantiradi. I—IV komplekslar ketma-ket joylashadi va elektronlar tashish zanjirini hosil qiladi, V-chi kompleks tarkibiga ATF-sintetaza fermenti kiradi va ATF sintezini amalga oshiradi. OF jarayonida ishtiroq etuvchi polipeptidlarning ko'pchiligi, ularning soni 70 dan ko'proq, yadro DNKsi tomonidan kodlanadi. Ular 80S ribosomalarda sintezlanadi va mitoxondriyalarga etqaziladi. 10taga yaqin polipeptidlar mitoxondriyalarning genomi bilan kodlanadi, lekin shu oqsillarsini OF jarayoni amalga oshmaydi. In situ oqsil sintezida qatnashuvchi t-RNKning deyarli barcha komponentlari (22-tRNK), mitoxondriyalarning o'zini mahsulotidir. Bundan tashqari, mitoxondrial DNK (mtDNK) ikki xil rRNKni ham kodlaydi.

Mitoxondriyalarning DNKsi qo'sh zanjirli, halqa shaklida o'ta o'ralgan molekula bo'lib, ko'pincha G-C juftlar hisobiga ancha og'irroq.

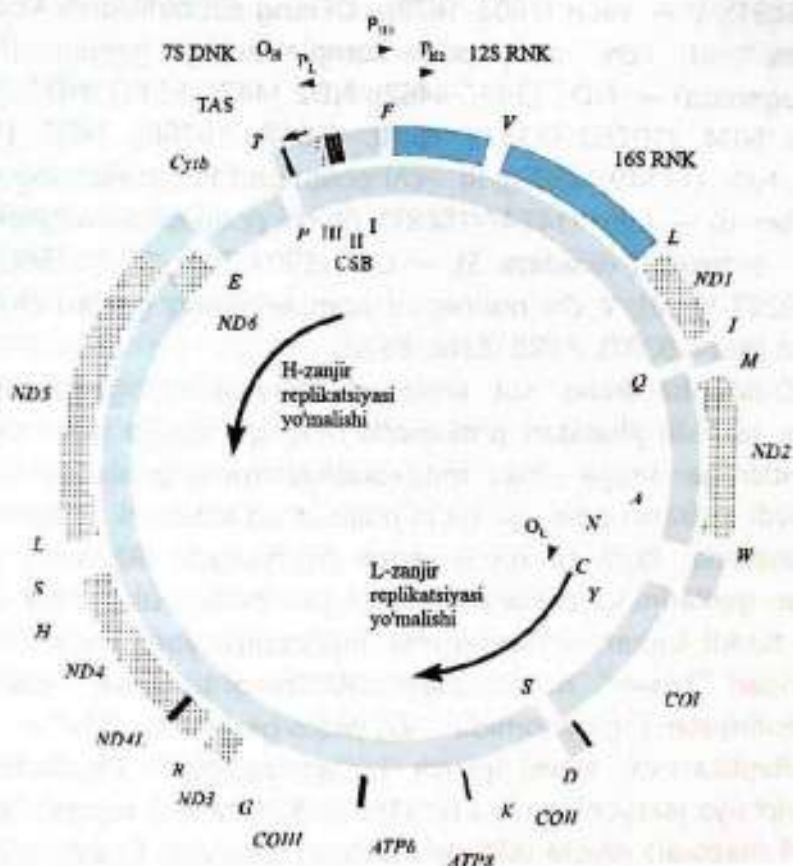
Hayvonlarda mtDNKning razmeri 20 tpn dan kamroq, odamda - 16 569 tpn, ksenopus va drozofilada - 18400 tpn, achitqilarda mDNKning o'lchami yanada kattaroq - 80tpn atrofida, o'simliklarda esa undan ham ko'proq - 100-2000 tpn.

Mitoxondriyalarning tarkibida bakteriyalarnikiga o'xshagan nukleoidlari bo'lib, ularning har biri mtDNKni bir necha kopyalarini (nushalarini) o'zida saqlaydi. Masalan, achitqilarning har bir mitoxondriyasida 10-30 ta nukleoidlar aniqlangan bo'lsa, har bir nukleoid 4-5 DNK molekulasidan tuzilgan bo'ladi. Achitqilarning bitta hujayrasida bittadan to 45 gacha mitoxondriyalar bo'lishi mumkin, demak mtDNK molekularini soni 40-6750gacha boradi yoki 3200 va 540000 tpn, ya'ni genomning DNKsidan ancha ko'p (17500 tpn).

Odamning mitoxondrial DNKsi ikki zanjirli spiral shaklidagi molekula bo'lib, 16569 pn dan (nukleotidlar ketma-ketligi) tashkil topgan (rasm 30). Zanjirlar bir biriga G va S lar nisbatan asimmetrik joylashgan bo'ladi. Guaninga boy bo'lgan og'ir zanjir (N) - rRNK, kupchilik mRNK va tRNK genlarini o'zida saqlaydi va asosiy kodlovchi zanjir hisoblanadi. TSitozinga boy bo'lgan engil zanjir (L) tarkibiga faqat bitta strukturaviy gen (ND6) va tRNKning 22 genidan 8 si kiradi. Hammasi bo'lib mitoxondrial genlarning 37 tasi (13 OF genlari, rRNKning ikkita geni va tRNKning 22 geni) I oqsil kompleksining ettita subbirligi, III kompleksning bitta subbirligi, IV kompleksini uchta subbirligi va V kompleksning ikkita subbirliglarining sintezida ishtirok etadi.

Odamning mitoxondrial genomi 16569 nj (nukleotidlar juftligi)dan iborat. Uning tarkibiga quyidagilar kiradi: D-halqa - mtDNK joylashgan rayon bo'lib, razmeri 1122 p.n. tashkil topgan (16024-576 pozitsiyalar), Ushbu rayon replikasiya va transkripsiya jarayoniga javob beradi. Tarkibiga terminatsiyaga (16157-16172) bog'liq bo'lgan TAS ketma-ketligi kiradi. ON - — replikasiyalanuvchi og'ir zanjirning initsiatsiya nuqtasi (110-141), konservativ bloklarning ketma-ketligi CSBI (213— 235), CSBII (299-215) va CSBIII (346-363), transkripsiya omilning bog'lanish saytlari mtTF (233-260, 276-303, 418-145, 523-550), mitoxondrial praymerini replikasiyasi (317-321),

PL — engil zanjirning promotori (392-445), RN1 — asosiy (545-567) va RH2, — og'ir zanjirning minor (~654 pn) promotorlari.



30- Rasm. Odam mtDNKsining funksional-genetik xaritasi.

Membranaga birikkan sayt taxminan 15925-199 rayonida joylashadi. Boshqa regulyator (boshqaruvchi) ketma-ketliklar D-halqaning tashqarisida joylaashadi va OL – engil zanjirning initsiatsiya nuqtasi (5721-5798), rRNK:mRNK nisbatini boshqaruvchi transkripsiya terminatorini o'zida saqlaydi. ribosomal RNKning 2 geni: 12S (648-1601); 16S (1671-3229). transport RNKning 22 geni (gorizonta shtrix bilan ko'rsatilgan): A — alanin (5587-5655), R — arginin (10405—10469), N — asparagin (5657-5729), D — aspartat (7518-7585), S — tsistein (5761-5826), E — gIYutamat (14674-14742), Q — gIYutamin (4329-1400), G — glitsin (9991-10058), N — gistidin (12138-12206), I — izoleytsin (4263-4331), L — leytsin (3230-3304 i 12266-12336), K — lizin (8295-8364), M — metionin (4402-1469), F — fenilalanin (577-

647), R — prolin (15955-16023), S — serin (7445-7516 i 12207-12265), T — treonin (1588-15953), W — triptofan (5512-5576), T — tirozin (5826-5891), V — valin (1602-1670). OFning subbirlklarini kodlovchi 13 gen, I -chi polipeptid kompleksining genlari (NADH-degidrogenaza) — ND1 (3307-4462), ND2 (4470-5511), ND3 (10059-10404), ND4 (10760-12137), ND4L (10470-10766), ND5 (12337-14148), ND6 (14149-14673); III -chi polipeptid kompleksining genlari (tsitoxrom b) — Cytb (14747-15887); IV -chi polipeptid kompleksining genlari tsitoxrom oksidaza 5) — COI (5904-744), SOII (7586-8262), SOIII (9207-9990); V -chi polipeptid kompleksining genlari (ATR-aza) — ATR6 (8527-9207), ATR8 (8366-8572).

Qiziqarlisi shuki, sut emizuvchi hayvonlarning mitoxondrial genomi tuzilishi jihatidan prokariotlarning genomiga juda o'xshash, eukariotlar genomiga emas: mitoxondriyalarning genlarida intronlar bo'lmaydi va transkripsiya jarayoni politsistron ahborotli (informatsion) RNK shaklida ikkita promotorlardan boshlanadi. tRNKning genlari struktur genlarining oralarida joylashgan bo'lib, ularni bir biridan ajratib turadi. Birlamchi transkriptlar nukleazalar yordamida tRNKning chetlaridan "kesilib" hosil bo'ladi. tRNKning to'plami ham kam, mitoxondriyalarning genomida - 22, yadro genomida - 32.

Replikatsiya, transkripsiya i translyatsiya. Replikatsiya va transkripsiya jarayonlar 1122 pn (16024-576) tashkil topgan bo'lib va kontrol (nazorat) rayoni (KR) deb atalgan qismidan boshlanadi (rasm 30). Ushbu rayonda boshqaruvchi nukleotidlarning ketma-ketliklarini ko'pchiligi joylashgan bo'ladi. SHu bilan birga nazorat rayoni — molekulaning asosiy kodlamaydigan qismi hisoblanadi, chunki mtDNKning faqat 87 pn boshqa tsistronlararo rayonlarida joylashgan bo'ladi. KR da uch zanjirli D- halqa joylashadi. Halqa N-zanjirning replikatsiya jarayonida ona zanjiri bilan juftlashgan bo'lib kalta segmentining - 7S DNK sintezi natijasida hosil bo'ladi.

Har xil populyatsiyalarning individual mtDNKsini tekshirishlari natijasida nazorat rayonning Yuqori darajada variabelligini aniqlandi: variabel qismlar asosan zanjirning 5'- va 3'-qismlarida joylashgan bo'ladi. Gipervariabel segmentlar GVS-1 (16000- 16400) i GVS-II (70-380) taxminan 710 pn tashkil topgan.

mtDNK ning N-zanjirning replikatsiyasi 7S DNK sintezidan boshlanadi. Replikatsiya L-zanjiri bo'ylab genomni 2/3 qismini o'tib

bo'lgach engil zanjirining replikatsiyasini initsiatsiyatsiya nuqtasiga etib boradi. L-zanjirining sintezi maxsus praymaza tomonidan initsiatsiyaga uchraydi va N-zanjirining matritsasini teskarisidan davom etadi. Replikatsiyaning har xil tomonlama va asinxron amalga oshishi faqat mitoxondrial genomiga xos.

Odam mitoxondrial genomini transkripsiyasi ham o'z xususiyatlariga ega. Har bir zanjirning transkripsiyasi nazorat rayonida joylashgan maxsus RL yoki RH1 promotorlardan boshlanadi. RNKning birlamchi matritsali transkriptalarini sintezi ikki yo'nalishda amalga oshadi. Transkripsiya jarayoninig initsiatsiyasida maxsus omil (mtTFI)-transkripsiya omili ishtiroq etadi. Omil mtDNKning transkripsiyasida katta ahamiyatga ega. Maxsuslashgan mtRNK-polimeraza zanjir bo'ylab harakatlanadi va natijada politsistron mRNKni hosil qiladi. Keyinchalik maxsuslashgan endonukleaza politsistronli mRNKni kesadi va ribosomal, tashuvchi va matritsali RNKlarni ajratadi. Yana shu jarayonga e'tibor berish kerak, chunki mRNK ning hosil bo'lishi kopiya usulida emas, poliadeninlik usuli yordamida amalga oshadi ekan.

Mitoxondrial mRNKning translyatsiyasi mitoxondriyalarning 55S ribosomalarida amalga oshadi. Har bitta ribosoma bitta katta (39S) va bitta kichkina (28S) subbirlıklardan tuzilgan bo'ladi. Bunday ribosomalarda rRNKning miqdori bakteriyalar yoki eukariotlarning ribosomalariga nisbatan kam, lekin ribosomal oqsillarning ulushi ko'proq bo'ladi. Mitoxondriyalarning ribosomalari bakteriyalarning ribosomalarini ingibitori - xloramfenikolga sezuvchan bo'ladi. Lekin, tsitoplazmatik 80S ribosomalardan farqli ravishda, mitoxondriyalarning ribosomalari tsiklogeksimid va emetinga chidamli bo'ladi. Mitoxondrial tRNKning tuzilishida ham bir qator o'ziga xos xususiyatlar mavjud. Mitoxondrial mRNKda SHayn-Dalgarno deb ataladigan nukleotidlar ketma-ketligi bo'lmaydi. Translyatsiya jarayonining initsiatsiyasi ribosomalarning kichik subbirligini mRNKni 40 pn dan tashkil topgan maxsus rayoni bilan bog'lanishi bilan boshlansa kerak, degan fikrlar bor. mRNK ribosomani o'rab oladi va shu bilan polisomalarning hosil bo'lishini chetlatadi degan olimlarning taxminlari ilmiy adabiyotlarda keltirilgan.

Sut emizuvchilarning mitoxondrial DNKsi yadroning kodidan farqli ravishda o'ziga xos unikal genetik kodga ega: masalan, UGA tripleti triptofanni kodlasa, AUA — metionin, AGA va AGG stop-

ATR-sintetaza; five — temir-oltingugurt oqsillar; ndh — NAD(P)H oksidoreduktaza), qizil rang bilan — RNK-polimerazalarning subbirliklarining genlari, sariq ranglilar — permeazalar.

Bitta hujayrada DNK molekulasini nusxalarining soni har xil. Masalan, lavlagining barglarida bitta nukleoidga 4-8 DNK molekulasi to'g'ri keladi, agarda bitta xloroplastda 4-18 nukleoid bo'lsa, hujayrada taxminan 40 xloroplast aniqlansa, demak har bir hujayrada 6000 gacha xpDNK molekulasi bo'lishi mumkin. Xlamidomonada suv o'tining bitta xloroplastida 500-1500 xpDNK molekulasi aniqlangan.

Yuksak o'simliklarning xloroplastlarini genom uzunligi bo'yicha har xil, lekin o'ziga xos xususiyatlariga ega. Genomda invertlashgan taqrorlanishlar deb ataladigan (IRa i IRb) taqrorlanishlar mavjud. Ushbu taqronishlarning ichida joylashgan genlar genomda ikkita nusxada bo'ladi. IR taqrorlanishlarning orasida SSC (short single copy sequence) va LSC (long single copy sequence) deb nomlangan uchastkalar joylashadi. Xloroplastlarning genomi barcha rRNK genlarini, ya'ni 16S, 23S, 4,5S i 5S (har qaysi 2 ta nusxadan), tRNK ning 32 geni va xloroplastlarning genetik apparatiga yoki fotosintezi uchun zarur bo'ladi. Ayrim oqsillarni kodlovchi genlar (masalan, ribosomalarning oqsillarini, RNK-polimerazaning subbirliklarini, translyatsiya omillarini va h.k.) o'zida saqlaydi.

Oqsillar va tRNKni kodlovchi ayrim genlarida intronlar aniqlangan. Xloroplastlarning genomida kodlanadigan barcha mRNK, o'zining ribosomalarida, ya'ni xloroplastlarning ribosomalarida translyatsiyaga uchraydi.

Achitqilarning genomi va xromosomalari. Tuban eukariotlarning xromosomalarni mikroskop ostida ko'rib bo'lmaydi, lekin genetik tuzilishi bo'yicha 16 birikish xromosomalari guruhlarini ajratiladi. *Saccharomyces cerevisiae* achitqining genomi to'liq sekvenirlangan va quyidagi ma'lumotlar aniqlangan: DNKsini umumiy uzunligi 13390 tpn dan tashkil topgan, xromosomalarning uzunligi 229 tadan to 1530 tpn gacha borishi mumkin. Albatta bunday kichik xromosomalarni oddiy yorug'lik mikroskop ostida ko'rib bo'lmaydi. *Drozofila pashshasini* eng kichik xromosomasi — to'rtinchi jufti, xuddi nuqta bo'lib ko'rinadi va genomining DNKsini 1-4% ni tashkil etadi. Agarda drozofilaning DNK genomi 185 mln pn dan tashkil topgan bo'lsa, to'rtinchi xromosomasida 1850 tadan boshlab, to 7400 tpn joylashadi bo'ladi. Bu raqam

achitqilarning eng uzun xromosomasining uzunligidan ancha Yuqori. Achitqilarning genomida 6085 genlar aniqlangan.

7.2. Yuksak eukariotlarning mitotik xromosomalari.

Navashin tasnifi bo'yicha xromosomalarning tuzilishi, ya'ni tsentromerasining joylashishi, elkalarining uzunligi va h.k., belgilari bo'yicha xromosomalar 4ta tipga bo'linadi. Olimlarning ko'pchiligini fikri bo'yicha har bir xromosomaning albatta ikkita elkasi bo'ladi, ya'ni telotsentrik xromosomalar bo'lmaydi. Telotsentrik xromosomalarning kichkina bo'lsa ham kalta elkasi bor. Zamonaviy ma'lumotlarga ko'ra xromosomaning ikkala uchida maxsus tuzilma-telomera bo'lishi kerak. Demak, tsentromera xromosomaning uchida joylashmaydi, shu sababdan tabiatda telotsentrik xromosomalar bo'lmaydi.

Kariotip va idiogramma. Kariotip tushunchasi 1924 yilda G.A. Levitskiy tomonidan fanga kiritilgan. "Irsiyotning material asoslari" deb nomlangan kitobida (1924) olim yozadi: "Agarda organizmning tashqi belgilarini yig'indisi "fenotip" deb nomlansa, yadro xususiyatlarini yig'indisiga "kariotip" degan atama mos keladi." "Kariotip" tushunchasi, bir tomondan fenotip ma'nosini to'ldirgan bo'lsa, ikkinchi tomondan – "genotip" tushunchasiga zich bog'langan bo'ladi, ya'ni organizmning irsiy omillarini yoki genlarini yig'indisiga. G.A. Levitskiy bo'yicha kariotip – bu organizmning barcha individual xromosomalarni yig'indisi – soni, razmeri, morfologiyasi, eu- va geteroxromatinini joylashishi, ya'ni barcha xususiyatlarini yig'indisi.

Kariotipning asosiy belgisi – xromosomalarning juftligi, ya'ni organizmda xromosomalar juft bo'ladi: tuzilishi, genlar tarkibi va ularning joylashish tartibi bilan o'xshash. Bunday juft xromosomalar gomologik xromosomalar deb nomlanadi. Har bir juft xromosomalar tuzilishi bilan boshqa juft xromosomalardan farq qiladi. Har xil juftlarning xromosomalari nogomologik, ya'ni gomologik bo'lmagan xromosomalar deyiladi.

Xromosomalarni jufti, katta-kichikligi, tsentromerasi va eu-va geteroxromatinini joylashishiga qarab idiogramma tuziladi.

Xromosomalarning differentsial bo'yash. 1968 yilda T. Kaspersson va uning kasbdoshlari xromosomalarni akrixin-iptit bilan bo'yash usulini taqlif etishadi. Bo'yalgandan so'ng preparatlar ultrabinafsha nurlar bilan

nurlanadi va flouresentsiyasi induksiyanadi. Bunday bo'yash usuli yordamida aniqlangan bo'ldi: xromosomalarning har xil joylari har xil intensivlikda bo'yalishi, bo'yalgan qismlarning razmerlarini farqlanishi, ya'ni xromosomalar bo'yoq bilan bog'lanish saytlari miqdori bilan farq qiladi. Natijada, har bir juft xromosoma boshqa juft xromosomadan farq qilishi, ya'ni individual tuzilishga ega, hatto xromosomalarning elkali ham individual ekanligi aniqlandi. SHunday qilib, har bir xromosomani aniqlab, boshqalardan ajratish mumkin bo'ladi. Ushbu usul Q-bo'yash, yoki Q-banding (quinacrine so'zidan).

1971 yilda. K. SHo (S. Shaw), E. Samner (A. Sumner) i U. SHnedl (W. Schnedl) G – bo'yash usulini taqlif qiladilar. Preparatlar dastlabki ishqor modda bilan ishlov berilgandan so'ng standart tuz eritmasida (2 x SSC) inkubatsiyalanadi va Gimza-Romanovskiy bo'yog'i bilan bo'yalanadi. Natijada xromosomada to'q bo'yalgan yo'l-yo'l chiziqlar hosil bo'ladi.

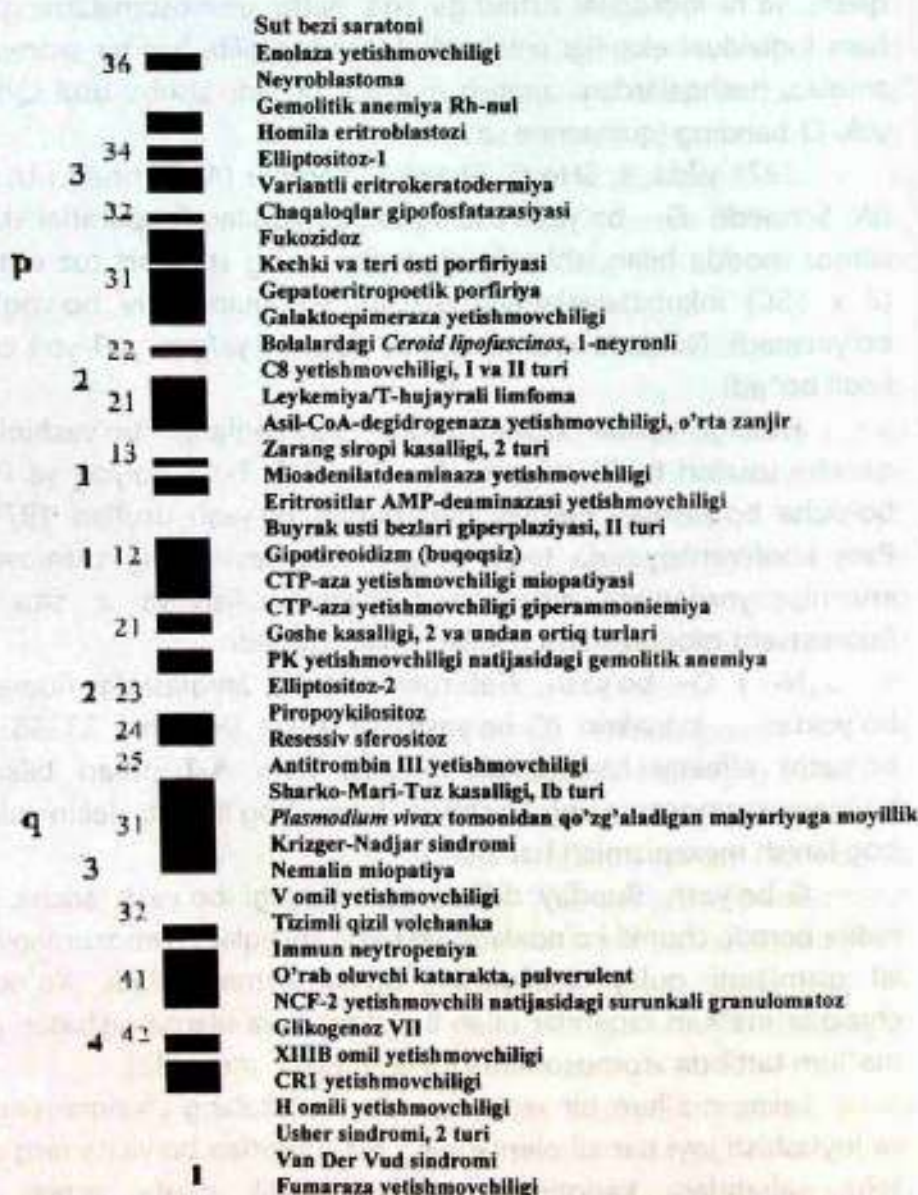
Hozirgi kunda xromosomalar segmenlarga bo'yashining bir qancha usullari taqlif etilgan: Q-, G1-, R-5, T-, S-bo'yoq va Fyolgen bo'yicha bo'yashlar. Bunday differentsial bo'yash usullari 1971 yilda Parij konferentsiyasida taqlif etilgan edi. Keyinchalik xromosomalar enzimlar yordamida differentsial "hazm" qilish va in situ (FISH) fluoretsent gibridizatsiya usullari ishlab chiqildi.

N- i Q- bo'yash. Geteroxromatinni aniqlashda fluoretsent bo'yoklar - kvinakrin (Q-bo'yash) va Xekst (Hoechst 33258 — N-bo'yash) effektiv hisoblanadi. Ikkalasi ham A-T-juftlari bilan boy bo'lgan xromosomaning qismlari bilan bog'lanadi, lekin ularning bog'lanish mexanizmlari har xil.

G-bo'yash. Bunday differentsial tipdagi bo'yash ancha yaxshi natija beradi, chunki ko'ndalang yo'l-yo'l chiziqlar xromosomaning hvr xil qismlarini qulay markyorlari bo'lib xizmat qiladi. Ko'ndalang chiziqlar ma'lum raqamlar bilan belgilanadi va ularga nisbatan genlar ma'lum tartibda xromosomada joylashtiriladi (rasm 32).

Lekin, ma'lum bir xromosomada ko'ndalang chiziqlarning soni va joylashish joyi har xil olimlarining ma'lumotlari bo'yicha farq qiladi. SHu sababdan kariotipni standart taxlil qilish uchun Parij nomenklaturasi odam xromosomasi uchun normada G-chiziqlar soni, joylashish joyini aniqlangan bo'ladi (rasm 33).

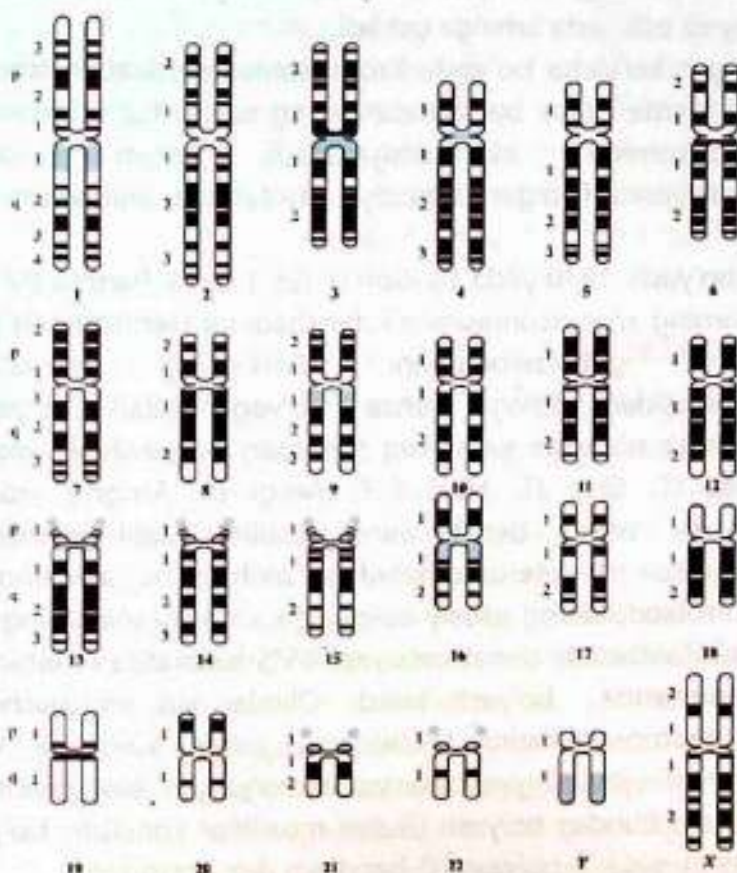
Nomenklatura bo'yicha odam genomining xromosomalarini ko'ndalang chiziqlari mikroskop ostida har xil kattaligida ko'rinishini 3 xil tipi belgilangan: 400, 550 i 850ta chiziq. Bundan tashqari, Yuqori darajada kattalashtirib ko'rsatadigan usul yordamida taxminan 1350 ko'ndalang chiziqlarni aniqlash mumkin.



32- Rasm. Birinchi xromosomada kasalliklar genlarining joylashishi. Ramka bilan chegarangan allel holatlar; r — kalta, q — uzun yelka; 1-3, 1-4 — xromosomaning hududlari.

Xromosomalarning G-usuli yordamida markirovka qilish har bir individual xromosomani va uning fragmentlarini indentifikatsiya qilish va bundan tashqari, ularning evolYutsiya jarayonida mutatsiyalar va har xil ekologik omillar ta"sirida joyini o'zgarishini nazorat qilish imqoniyatini yaratadi.

Bundan tashqari, to'q bo'yalgan chiziqlarning xromosomada joylashgan qismlari ma"lum holatda bo'lishi to'g'risida dalolat beradi. Masalan, G-chiziqlar joylashgan xromosoma qismlarida genlarning miqdori kam, A, T nukleotidlar va LINE-elementlar soni ko'p bo'lishi aniqlangan. G-chiziqlardagi joylashgan DNK interfazaning S-davrida kech reduplikatsiyaga uchraydi [Craig, Bickmore, 1993].



33-Rasm. Parij konferentsiyasida (1971) qabul qilingan odam xromosomalarning G-segmentlarini sxematmk ko'rinishi. Raqamlar bilan xromosomalarning nomarlari belgilangan: X va Y —jinsiy xromosomalar; r —kalta, q — xromosomaning uzun yelkasi.

R-bo'yash. Bufer eritmasida Yuqori haroratda xromosoma preparatlarini inkubatsiya qilish yoki ma'lum pH muhitida Gimza bo'yog'i bilan bo'yalishi natijasida xromosomaning segmentatsiyasi G-segmentatsiyaning teskarisi kuzatiladi. R-chiziqalarda genlarning Yuqori kontsentratsiyasi joylashgan, ular G, S nukleotidlar va SINE-elementlar bilan boyitilgan bo'ladi, bundan tashqari, ushbu fragmenlarning DNKsi S-davrida erta replikatsiyaga uchrashi aniqlangan.

T- bo'yash. Ushbu bo'yash R - bo'yashning bir varianti hisoblanadi, lekin bo'yalgan fragmentlar asosan xromosomaning uchlarida, ya'ni teloier rayonlarida joylashgan bo'ladi. SHu chiziqalarda genlar Yuqori darajadagi zichlikda joylashadi, G, S nukleotidlar va SINE-elementlarning Yuqori kontsentratsiyasi aniqlanadi. DNK replikatsiyasi esa, erta amalga oshadi.

Felgen bo'yicha bo'yash. Xromosoma preparatlari ishqor bilan Yumshoq tarzda ishlov berilgandan so'ng sovuq tuz eritmasida uzoq vaqt davomida ekspozitsiyalanadi, keyin xromosoma segmentatsiyasini Fyolgen reaksiya yordamida aniqlanish mumkin bo'ladi.

S-bo'yash. 1970 yilda Dj. Goll (J. Gall) va M. PardYu (M. Pardue) sichqonlarning xromosomasini tekshirishadi va tsentromerasiga yaqin joylashgan geteroxromatinni DNKsining denaturatsiya-renaturatsiyasidan so'ng Gimza bo'yog'i bilan bo'yashganda euxromatinga nisbatan yaxshiroq (intensiv) bo'yalishini aniqlashgan. 1971 yilda T. SHu (T. Hsu) i F. Arrigi (F. Arrighi) xromosoma preparatlarini ishlov berish yangi usulini taqlif etishadi. Usul yordamida eu- va geteroxromatnlarni alohida bo'yash imqoniyatini beradi. Protseduraning asosiy etaplariga xromosomalarning DNKsini 0,7 N NaOH eritmada denaturatsiyasi, 65°S haroratda renaturatsiya va Gimza eritmasida bo'yash kiradi. Olimlar sut emizuvchilarni 20 turining xromosomalarini tekshirib kuyidagi xulosaga kelishadi: geteroxromatin joylashgan joylar yaxshi bo'yalgan, euxromatin qismlar esa, rangsiz. Bunday bo'yash usulini mualliflar konstutiv bo'yash (S - constitutive) yoki S-bo'yash (C-banding) deb atashgan.

Bo'yalish mexanizmi aniq emas. Ko'pincha xromosomalarning S-chiziqalari satellit DNK joydashgan rayonlarda aniqlansa ham, istisno tariqasida misol keltirish mumkin: Y-

xromosomaning D. hydei satellit DNK yo'q, ammo S-bo'yalish ravshanlik bilan aniqlanadi.

Bundan tashqari, embrional taraqqiyotning ilq boshlarida ushbu usul bilan geteroxromatin bo'yalmaydi, lekin keyinchalik, ayniqsa homila rivojlanishining oxirgi davrlarida shu rayonlarning bo'yalishi kuzatiladi, ammo DNKning birlamchi strukturasi o'zgarmagan sababli xulosa qilish mumkin: S-bo'yalish yordamida geteroxromatinga xos bo'lgan oqsillar aniqlanadi.

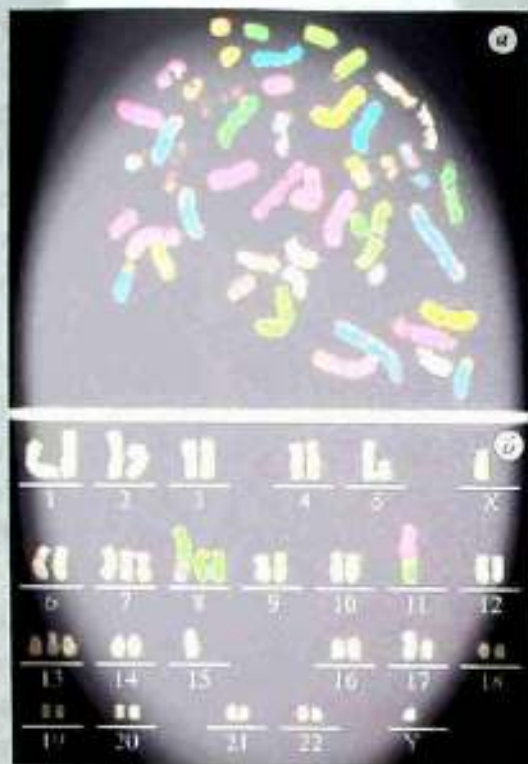
«Odam genomi» loyhasini natijalari (2001 yilda ilmiy maqola shaklida bildirilgan) bo'yicha Homo sapiens ning 20% atrofida DNK genomi xromosomalarning S-chiziqlarida joylashgan ekan.

Enzimlar yordamida xromosomalarning differentsial "hazm" qilish usuli. Mitotik xromosomalarda nukleotid juftlarini geterogen joylashini restriksiya enzimlari yordamida "hazm" qilish usuli bilan aniqlash mumkin. Nukleotidlarning taqrorlari bilan boyitilgan va ushbu fermentga nisbatan saytlari bo'lmagan xromosoma qismlari shikastlanmaydi va har xil DNKni aniqlovchi bo'yoqlar bilan bo'yaladi, masalan, etidiy brom bilan. Bunday qismlar ko'pincha tsentromeraga yaqin geteroxromatin joylashgan rayonlarda aniqlanadi.

7.3. Ko'p rangli fluorestsent gibrizatsiya in situ.

1990 yillarda tsitogenetika fanida yangi usullar paydo bo'ladi, ularning asosida nuklein kislotalarning fluorestsent gibrizatsiya in situ (fluorescent in situ hybridization — FISH) yotadi. Bunday kashfiyatlar mikroskopik tasvirlarni tahlil qilish uchun yangi effektiv fluoroxrom va yangi apparaturalarni qo'llashlar bilan bog'liq. Asosiy usullardan biri ko'p rangli gibrizatsiya in situ hisoblanadi.

Har xil rangli tasvirlar olish uchun har xil DNK zondlari bilan nishonlangan fluoroxromlar qo'llaniladi. Xar bir fluoroxromning nurlanishni intensivlik darajasi va rangi kompyuterga alohida yozilib boriladi. Bir necha xil fluoroxromlarni qo'llash har xil ranglarda ko'rish imqoniyatini beradi. Masalan, agarda xromosomaning bir qismi a fluoroxrom bilan bo'yalgan bo'lsa, b –fluoroxrom xromosomaning boshqa fragmentini bo'yasa, unda ikkala fluoroxrom a va b bilan bo'yalgan xromosomaning qismi yana boshqa rangda bo'yaladi.



34- Rasm. Odam xromosomalarinngi 24-rangli FISH- bo'yalishi. a- metafaza plastinkasi, har bitta xromosoma o'z rangiga bo'yalgan; b - yashil va qizil ranglar 8 va 11-chi xromosomalar orsida translokatsiya kuzatilishini ifodalangan.

Agarda ikkala fluoroxromlardan tashqari p miqdori qo'llansa, unda DNK fragmenlarning 2ⁿ- 1 joyi aniqlangan bo'ladi. Demak, 5ta fluoroxrom qo'llansa gibridizatsiya in situ usuli yordamida DNKning 31 fragmentini aniqlash mumkin bo'ladi.

Har bitta xromosomani o'zini rangi bilan nishonlash uchun xromosomaning DNKsini preparatdan mikromanipulyator yordamida to'planadi, polimeraza zanjirli reaksiya yordamida amplifikatsiya qilinadi va 3ta fluoroxrom kombinatsiyasi bilan nishonlanadi. Natijada xromosoma o'z rangiga ega bo'ladi. Xuddi shu operatsiyani boshqa xromosomalar bilan o'tkazilishi natijasida har bir xromosoma o'ziga xos rangiga ega bo'ladi (rasi 34, a). Agarda xromosoma bir necha xil rangli bo'lsa, demak translokatsiya bo'lganligi aniqlanadi (rasm. 34, b).

Ayrim diagnostik markazlarda odam xromosomalaridagi o'zgarishlarni tahlil qilish uchun ko'p rangli FISH usullarining

variantlari qo'llaniladi. Usulning mohiyati shundan iboratki, oddiy in situ gibrizatsiyasida kuzatilgan kuchsiz signalni preparatda "kuchaytirish" mumkin, keyin kompYuterning CCD-kamerasi yordamida undan ham yirikroq qo'rinadigan qilinadi, natijada hattoki mitotik xromosomalarda ham ko'rinadigan bo'ladi. SHu sababdan FISH tsitogenetik ishlarda keng qo'llanilmoqda.

«Myoller qoidasi» va sinteniya hodisasi. 1911 yilda U. Robertson (W. Robertson) to'g'ri qanotli hasharotlarning bitta turini xromosomalarini tekshiradi va bir narsaga e'tibor beradi: shu hasharotning metatsentrik xromosomasi boshqa turdagi hasharotning ikkita akrotsentrik xromosomalariga to'g'ri, ya'ni mos kelishiga. SHunga asoslanib olim shunday xulosa keladi, demak, evolYutsiya jarayonida metatsentrik xromosomalar akrotsentrik xromosomalarning qo'shilishi natijasida hosil bo'lishi mumkin. Xromosomalarning butun elkalarini qo'shilishiga robertson translokatsiyalar deb ataladi. Uzun elkalarining soni o'zgaraydi yoki doimiyga raqamga yaqin bo'ladi.

1934 yilda N. P. Dubinin drozofila pashshasining karitipidagi xromosomalar sonini tajriba yo'li bilan o'zgartirishga muvaffaq bo'ladi. Avvalambor olim translokatsiya yo'li bilan to'rtinchi xromosomani Y-xromosomaga o'tkazadi. So'ng gibriz xromosoma 4 - Y va X-xromosoma bilan krossingover usuli yordamida to'rtinchi xromosomani X-xromosomaga o'tkazadi. Bundan keyin urg'ochi pashshalarda 4-X xromosomani gomezigota holatiga o'tkaziladi. Natijada kariotipdagi xromosomalar soni 3 juft bo'ladi. Erkak drozofila kariotipida 2 juft autosoma, 4-X va 4 - Y xromosoma bo'ladi, ya'ni oltita xromosoma. SHunday qilib, drozofilaning yana bir shakli - 6ta xromosomaga ega bo'lga shakli hosil bo'ladi. YAna ikki yildan keyin 5ta xromosomaga ega bo'lgan pashshaning yana bir shakli hosil bo'lgan. Demak, tajriba usullar yordamida organizm karitipini o'zgartirish (ko'paytirish yoki kamaytirish) mumkin ekanligi aniqlangan.

Robertson translokatsiyalar populyatsiyalarning evolYutsiya jarayonida (odam populyatsiyasida ham) kuzatilishi mumkin. 1960 yilda P. Polani (R. Rolani) kasbdoshlari bilan Daun sindromi robertson translokatsiya tufayli rivojlanish mumkinligini isbotlashadi.

Kariologlar tomonidan aniqlangan: odam turida 23 juft xromosoma bo'ladi, odamsimon maymunlarda esa, 24 juft. Kariologik

tahlil shuni ko'rsatdiki odamning ikkinchi yirik xromosomasini ikkala elkasi maymunlarning ikkita har xil xromosomalariga to'g'ri keladi (shimpanzening 12 va 13 va gorilla va orangutaning 13 va 14 xromosomalariga).

V 1940 yilda G. Myoller taxmini bo'yicha turli xil drozofilalarning kariotipidagi xromosomalarini 6ta elkasi evolYutsiya jarayonida o'zgarmsdan saqlangan. Drozofila avlodining kariotipi 5ta tayoqchasimon xromosomalardan va bitta nuqtali oltinchi xromosomadan tashkil topgan. EvolYutsiya jarayonida faqat paratsentrik inversiya va tsentrik qo'shilishlar kuzatilgan bo'lishi natijasida bir biriga yaqin bo'lgan turlarda genlarning birikish guruhlari o'zgarmsdan saqlanadi. Bir yildan keyin A. Stertevant va YU. Novitskiy drozofilalarning har xil turlarini genetik xaritalarini tuzib, kuyidagi xulosaga kelishadi: xromosomalar to'plamining elementlari aniq va doimiy genlar to'plamiga ega bo'lishi. Xar bir birikish guruhidagi farqlar faqat genlarning joylashish tartibiga bog'liq xolos. Masalan, *D. melanogaster* ning u, w, sn va v genlar X-xromosomada joylashgan bo'ladi, boshqa tur drozofilalarda ham ushbu genlar X-xromosomada joylashadi, lekin juda ko'p inversiyalar tufayli ularning joylashish tartibida katta farqlar kuzatiladi. Turli xil xromosoma elementlarning orasidagi gomologlar 26 drozofila turlarida aniqlangan. 80-90-yillarda drozofilaning birikish guruhlari bilan boshqa qo'shqanotlilar (Diptera) turkumining vakillari (*Musca domestica*, *Lucilia cuprina*, *Ceratitis capitata*, gavay drozofilalari) o'rtasida gomologiya aniqlanadi.

Myoller koidasi in situ gibrizatsiya usulini qo'llaganda yaxshi amaliy natijalar beradi. Masalan, *D. melanogaster* ni 4ta xromosomasida joylashgan genlarining bittadan DNK klonini olib boshqa turdagi drozofilaning politen xromosomasiga o'tkazilganda *D. melanogaster* ning birikish guruhlari va individual xromosomalar va, bundan tashqari, boshqa turning birikish guruhlari bilan mosligi aniqlandi.

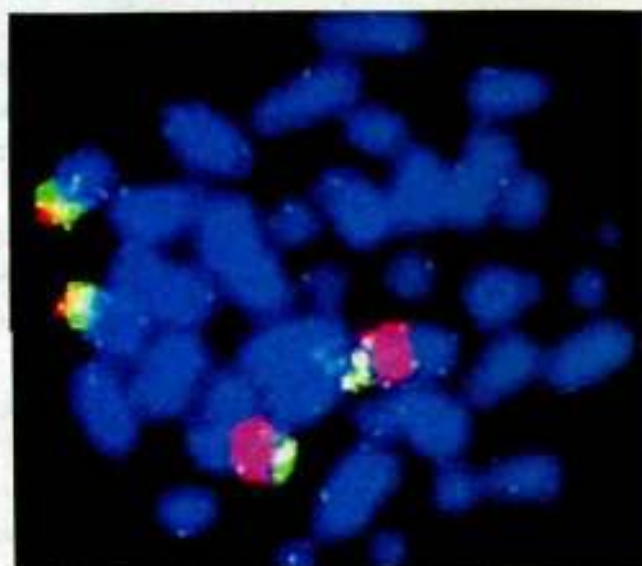
Har xil turlarning xromosomalarini gomologik elementlarida joylashgan bir xil genlar sinten genlar deb ataladi. Demak, kelib chiqishi jihatidan uzoq turlardagi xromosoma qismlarning gomologiyasiga — sinteniya deyiladi.

Chironomus avlodining vakillarida ham xromosomalarining elkalarini katta qismining gomologiyasi aniqlangan. Gomologik qismlarni politen xromosomalarda yaqqol ko'rish mumkin. Ushbu ma'lumotlarni avlodning turlari orasidagi evolutsion bog'lanishlarni sxema shaklida tuzish uchun qo'llaniladi. Hozirgi kunda xironomusning taksonomik ma'lumotlari aniqlanmoqda.

Oxirgi yillarda bitta turning DNKsi boshqa kariotip bilan duragay chatishtirilib, gomologik qismlari aniqlanadi. SHu maqsadda 1990 yilda taqlif etilgan usul Zoo-FISH usuli qo'llaniladi. Oldin maxsus sorting deb atalgan yoki mikroklonlash usuli yordamida organizmning kariotipidan bitta xromosoma ajratiladi, rang bilan nishonlanadi va DNK klonlarining xromosomalar "kutubxonasi" tuziladi. Keyinchalik ushbu xromosomalar kutubxonasi zondlar shaklida qo'llaniladi va in situ boshqa turdagi (avlod, oila, sinf) kariotiplarda gibrizatsiya o'tkaziladi, natijada gomologiya zonalar aniqlagan bo'ladi (rasm 35).

1998 yilga kelib dunyo miqyosida 200 tadan ortiq sut emizuvchilar turlarida o'xshash tajribalar o'tkazilgan. Xromosomalarda genlarning konservativ joylashini bir necha tiplari aniqlanadi: 1) konservativ sinteniya – ikkita yoki undan ham ko'proq gomologik genlar ikki tur organizmlarda bitta xromosomada joylashgan bo'ladi. Ularning joylashish tartibini ahamiyati yo'q; 2) konservativ segment - ikkita yoki undan ham ortiq gomologik genlar ikki tur organizmlarda gomologik bo'lmagan segmentlar bilan ajralmagan; 3) konservativ tartib - uchta yoki undan ham ko'proq gomologik genlar ikki tur organizmlarda bitta xromosomada joylashgan bo'ladi, ikkala tur organizmlarida bir xil tartibda

Ba'zi konservatizmga keltirilgan misollar ajoyib. Masalan, odamning 17-chi xromosomasi cho'chqa, xo'kkiz, ot, mushuklarning shu xromosomasi bilan to'liq gomologik ekan yoki norka va tYulenning butun elkali bilan, bug'u, qo'y, shimpanze makaka va kitsimonlar oilasini vakili – finvalning xromosomalarini ayrim segmentlari bilan gomologik. Agarda butun kariotip tahlil qilinsa, odamning DNK molekulasini tYulenni metafazali xromosomalari bilan duragaylashi natijasida 30tadan Yuqori gomologik segmenlar aniqlanadi. Demak, har xil turlarga mansub bo'lgan organizmlarda xromosomalarining ayrim qismlari gomologik ekan.



■ H22

■ H12

35- Rasm. Zoo-FISH usuli yordamida odam va sug'ur hayvonning xromosomasida gomologik qismlarining aniqlanishi. Odamning 12-chi (qizil rang bilan belgilangan) va 22-chi (yashil rang bilan) xromosomalarining DNKsi sut sug'ur xromosomasi bilan (ko'k rangli) duragaylanadi. Natijada, odamning ikkita har xil xromosomalarining markerlari hayvonning belgilangan ikki juft xromosomasini egallaydi.

Yana bir ajoyib misol: Yapon dengizida yashaydiga baliq - *Fugu rubripes* genomi va odam xromosomalarini solishtirilganda bir xil genlar bo'lishidan tashqari, ular bir xil tartibda joylashganligi aniqlandi. Odamda 14-chi xromosomaning AD3 lokusida Altsgeymer kasalligining geni joylashgan bo'ladi, xuddi shu lokusda yana 3ta boshqa genlar: S31UH25, S20H5, FOS geniga birikkan xolda joylashadi. Birinchi uchchala genlar baliq genomida ham uchraydi va bir xil tartibda joylashgan bo'ladi, lekin ularning uzunligi 12,4 tpn teng bo'lsa, odamda esa, 600 tpn ni tashkil etadi. Demak, baliqning genomi odam genomidan 7,5 barobar kichik, shu sababdan baliq genlarini joylashish zichligi ham Yuqoriroq bo'ladi.

Euxromatin va geteroxromatin. XX asrning boshlariga kelganda ayrim xromosomalar yoki ularning fragmentlari hujayraning bo'linish davrida ko'proq kondesatsiyalangan va intensiv bo'yalgan bo'lib

ko'rinadi. Bunday farqlar geteropiknoz (Yunon. getero — boshqa, piknozis — zichlik) deb nomlangan. Geteropiknoz bo'lishi mumkin salbiy - kuchsiz va ijobiy - kuchli bo'alganda. Interfazada turgan yadrolarda tsitologlar intensiv bo'yalgan va quYuqlashgan moddalarni ko'rib xromomarkazlar (xromotsentrlar) deb nomlaydi.

E. Xayts (E. Heitz) xromosomalarning geteropiknotik uchastkalar va interfaza davridagi xromomarkazlarning mitoz bo'linishidagi xolatlarini tahlil qilib kuyidagi xulosaga keladi: zich joylashgan, kuchli bo'yalgan xromosoma rayonlari telofazada dekonpensatsiyalanmaydi va o'zining zichligini yo'qotmaydi. Mana shu joylar xromomarkazlarni hosil qiladi. Mitotik tsiklning barcha davrlarida xromosomalarni musbat geteropiknoz hosil qilgan joylarini E. Xayts 1928 y. «geteroxromatin» degan atama bilan nomlanishini taqlif etadi. "Euxromatin" deb nomlangan mitotik xromosomaning asosiy qismidan farq qiladi, chunki mitoz jarayonida bunday qismi kompakt va dekompakt holatlarga o'tadi, geteroxromatin esa, doimo kompakt holatda bo'ladi.

Eukariot turlarining xromosomalarda eu- va geteroxromatin rayonlar bo'ladi, lekin ko'p xollarda geteroxromatin genomning ko'p qismini tashkil etadi. Masalan, *D. melanogaster* pashshasida erkagining Y-xromosoma to'lik geteropiknotik tuzilishga ega, X-xromosomasida geteroxromatinning ulushi 40% atrofida, 2-chi xromosomada - 29%, v 3-chi sida— 25% xromosomaning uzunligini tashkil etadi. 4-chi xromosomaning ko'p qismini geteroxromatin egallaydi. *Drozofila karitipini* 33%ni geteroxromatin tashkil etadi.

Geteroxromatin ko'pincha tsentromera va ba"zan telomeralarga yaqin joylashgan bo'ladi. Xromosomalarning euxromatinli elkalarida geteroxromatin uchastkalar ham aniqlanadi. Ular euxromatin orasida guyo xol-xol (interkalyatsiyalar) bo'lib joylashgan bo'ladi. SHu sababdan bunday geteroxromatin interkalyar geteroxromatin deb ataladi. Tabiiyki interkalyar geteroxromatinni o'ta dekompaktlangan xromosomalarda, masalan, politen xromosomalarda yoki meyozi bo'lishining profazasini paxitena davrida turgan xromosomalarda osongina kuzatish mumkin. Geteroxromatin rayonlar o'ziga xos bo'lgan xususiyatlarga ega bo'ladi va shu bilan euxromatindan farq qiladi.

Xromatinning kompaktizatsiyasi. Xayts ma"lumotlari bo'yicha profazaning ilk davridan boshlab xromosomalarning geteroxromatin rayonlari aniq ko'rinadigan bo'ladi va euxromatindan intensiv bo'yalishi bilan farqlanadi. Metafazaning oxirida bunday farqlar yo'qoladi. Telofazada euxromatin rayonlar dekompaktlashadi, geteroxromatin rayonlar esa, o'zgarmaydi va tsitologik usuli yordamida yana ko'rinadigan bo'ladi. Mitotik tsiklining keyingi davri - interfazada geteroxromatin yaxshi bo'yalgan donachalar yoki yirik bloklar shaklida (geteropiknotik qism) ko'rinadi va qadimdan xromomarkazlar deb ataladi.

Sentromeraga yaqin joylashgan geteroxromatin to'qroq bo'yaladi.

SHunday qilib, euxromatin hujayraning bo'linish davrlarida o'zining kompaktlik darajasini o'zgartiradi, geteroxromatinning kompaktligi o'zgarmaydi. Lekin, uning kompaktligi nisbiy hisoblanadi, chunki quyidagi dalillar bilan isbotlanadi:

1. Drozofilaning autosomalari to' hujayra bo'linishigacha, ya'ni profaza davrigacha yaxshi bo'yalmaydi.

2. Embrional taraqqiyotining maydalanish davrida embrionlarning xromosomalarda geteroxromatin rayonlar aniqlanmaydi.

3. Drozofilaning interfaza davridagi hujayra yadrolarida xromomarkazlarning miqdori 0 dan to 5 gacha bo'ladi. Ularning bo'lmasligi geteroxromatinning dekompakt holatda bo'lishi to'g'risida dalil bo'ladi. Olimlarning taxmini bo'yicha bunday holat interfazaning S-davrida geteroxromatinni DNKsini replikasiyasida kuzatilishi mumkin.

4. Mitotik tsikl jarayonida geteroxromatin euxromatinga o'xshab, kompakt holatga o'tadi. Drozofilaning har xil kompaktizatsiya stadiyasidagi bo'lgan mitotik xromosomalarni uzunligini o'lchaganda aniqlangan bo'lib, xromosomaning tarkibida geteroxromatinni miqdori qancha ko'p bo'lsa, shuncha uning uzunligi kam qisqaradi. Drozofilani barcha xromosomalarning geteroxromatinni umumiy uzunligi 4,1-7,2 mkm chegarasida bo'lsa, gaploid sondagi xromosomalarning uzunligini chegarasi 13,4-67,0 mkm ga teng. Ushbu ma"lumotlar birinchidan, geteroxromatin mitozning birinchi stadiyalaridayoq anchagina kompakt bo'lishi, ikkinchidan, hujayra

tsiklida kompaktilik darajasini o'zgarishi to'g'risida dalil bo'lib xizmat qiladi. Geteroxromatinni kompakt bo'lishi asosan mitozning profazasida kuzatiladi.

5. Kompaktizatsiya jarayoniga har xil omillar ta'sir etadi: kimyoviy va fizikaviy.

Hujayra tsiklida xromosomaning qismini kompakt holatga o'tish xossasi ushbu rayonda geteroxromatin joylashishi to'g'risida dalil hisoblanadi.

Differentsial bo'yalish. Odatda barcha tekshirilgan turlarda geteroxromatinning joylashishi S-bo'yalish va allotsiklik kompaktizatsiya usullari bilan aniqlanganda bir xil natija beradi.

Geteroxromatin qismlari har xil bo'yoqlar bilan bo'yaladi, shuni hisobga olgan holda olimlar drozofilaning geteroxromatini tsitogenetik xartasini tuzishadi va rayonlariga 1dan to 61 gacha raqam qo'yadi.

Geteroxromatin rayonlarini konYugatsiyasi. Geteroxromatin rayonlarni maxsus xossalardan biri ular bir biri bilan kontakt hosil qilish ekan. Interfazadagi yadrolar tarkibida albatta bitta yoki bir nechta xromosentrlar (xromomarkazlar) aniqlangan. Ilmiy adabiyotlarning ma'umotlari bo'yicha ular kariotipdagi xromosomalarning geteroxromatin rayonlarini qo'shilishi natijasida hosil bo'lar ekan.

Profaza davrining boshlarida geteroxromatin rayonlar xromomarkazlar hosil qilgan bo'ladi. Mitozning profaza davrida kongatsiyalangan opa-singil xromatidalarining euxromatin qismlari metafaza davriga o'tganda bir biridan ajraladi, lekin geteroxromatin rayonlari kontakt holatini anafazaning boshlanishigacha saqlaydi. Ko'p geteroxromatinga ega bo'lgan xromosomalarning xromatidallari, masalan U-xromosoma yoki drozofilaning 4-chi xromosomasini xromatidallari anafaza davri boshlangandan keyin bir biridan ajraladi.

Xromatidallarning geteroxromatin rayonlarini konYugatsiyasi o'zini geteroxromatin xossasiga bog'liq, tsentromeraga emas.

Gomologik xromosomalarning geteroxromatin rayonlari mitotik tsiklning S-davridan boshlab to metafazagacha bir biri bilan zich birikkan bo'lishi kuyidagi tajriba bilan isbotlanadi. Krossingover jarayonini kuchaytirish uchun sun'iy usulda o'stirilayotgan hujayralarga maxsus induktor bilan ta'sir etiladi va gaysi

xromosomada geteroxromatin rayonlar ko'p bo'lsa, o'sha xromosoma bo'yicha mozaiklarning miqdori ko'p bo'lar ekan. Masalan, drozofilaning X-xromosomasini genlari bo'yicha mozaiklarning soni geteroxromatinga boy bo'lgan turida ko'p bo'ladi.

Drozofila pashshasida meyozi bo'lishining I -chi profazasida tsentromeraga yaqin bo'lib joylashgan geteroxromatin to'q bo'yalgan zich tuzilgan tanacha shaklida ko'rinadi va xromomarkaz deb ham ataladi. Bunday xromomarkazlar ko'pchilik turlarda aniqlangan. Taxminlar bo'yicha xromomarkaz meyozi profazasida xromosomalarning yo'nalishini aniqlashi mumkin ekan. Gomologik bo'lmagan erkak drozofilalarda X - i Y-xromosomalarning birinchi meyotik bo'linishidagi konYugatsiyasi geteroxromatinda joylashgan maxsus saytlar tufayli amalga oshadi.

Geteroxromatinni yadro qobig'i bilan kontaktlari. Interfaza davrida turgan xromosomalarning geteroxromatinidan tashkil topgan xromomarkazlar yadro qobig'ida joylashgan bo'ladi. Mitotik bo'linish jarayonida geteroxromatin rayonlarning yadro ichki membranasi bilan bog'lanishi prometafaza davrigacha saqlanadi.

7.4. Geteroxromatin va xromosomalarning qayta qurilishlari.

Geteroxromatin kariotipning evolYutsiya jarayonida muhim rol bajarishi to'g'risida ko'plab ma'lumotlar keltirilgan. Geteroxromatin joylashgan joylarda xromosoma elkalarning bir biriga qo'shilishi, ajralishi kuzatiladi, natijada xromosomalarning soni va morfologiyasi o'zgaradi.

Xromosomalarning to'plamining evolYutsiya jarayonidagi asosiy mexanizmi bo'lib, robertson o'zgarishlar hisoblanadi. Bunday o'zgarishlar natijasida ikki elkali xromosoma ikkita akrotsentrik xromosomalarga ajraladi yoki ular bir biri bilan qo'shib, bitta xromosomani hosil qiladi.

Ko'p vaqtlar davomida xromosomalardagi o'zgarishlarda tsentromeraning ishtiroq etishi noaniq edi. Lekin, ikkita xromosomaning tsentromeralari orqali birikishidan odamning 2-chi xromosomasi hosil bo'lgani to'g'risida ma'lumotlar ilmiy adabiyotlarda keltirilgan.

Turlar orasidagi kariotipning polimorfizmi ham xromosomalarning qayta qurilishlariga va geteroxromatindagi o'zgarishlariga bog'liq.

Drozofila pashshasida sun'iy o'stirilayotgan hujayralarini ultrabinafsha nurlari ta'siridagi xromosomalarning qayta qurilishlari asosan X- i Y-xromosoma va autosomalarning geteroxromatinida aniqlanadi. Masalan, mus geni bo'yicha mutatsiyalar miqdori 109 gacha borgan, ya'ni bunday o'zgarishlar xromosomalarning 80% geteroxromatinda kuzatilgan.

Kechki replikatsiya. N-timidin bilan nishonlangan chigirtkalarining spermatotsitlari radioavtografalarda nishonlarning joylashishini A. Lima-de-Faria 1959 yilda 4 xilni aniqlagan. Bir guruh hujayralarda nishonlar mutlaqo aniqlanmagan, boshqa guruh hujayralarda nishonlar faqat autosomalarning euxromatinida joylashgan, uchinchi xil hujayralarining yadrolari nishonlarga to'lgan edi, yana bir guruh hujayralarda nishonlar faqat jinsiy xromosomalarning geteroxromatinida joylashgan bo'ladi. Olimlarning tekshiruvlari bo'yicha nishonlarning joylashishini to'rtinchi tipi mitotik tsiklining S-davrini ohirgi vaqtlariga to'g'ri keladi.

Keyingi yillarda bir qancha tajribalar yordamida geteroxromatin joylashgan xromosoma qismlarida DNK replikatsiyasi kechikib borishi tasdiqlanadi.

Ayrim mualliflarning taxmini bo'yicha geteroxromatinni hosil bo'lishi DNKning kechikib sintezlanishiga bog'liq. Lekin istisno tariqasida misol keltirish mumkin: moxlarning ayrim turlarini E. Xayts 1928 yilda geteroxromatini tasvirlaganda kuyidagi xulosaga keladi: geteroxromatin rayonlarning replikatsiyasini erta tugashiga. DNK replikatsiyasining vaqti interfaza davridagi dekompat holatiga kelishiga bog'liq. Masalan, moxlarning ayrim turlari geteroxromatini G1-davrida kompakt holatda bo'ladi, keyin S-davri boshlanishi bilan diffuz holatiga o'tadi. S-davri o'rtalariga kelib replikatsiya tugashi bilan yana kompaktlashadi.

Ontogenez davrida xromosomalarning geteroxromatin rayonlarini shakllanishi. 1960 yillarning boshlarida A. A. Prokofeva-Belgovskaya bir qator hayvonlar (baliqlar, amfibiyalar, sut emizuvchilar) ustida tajribalar o'tkazadi va kuyidagi xulosaga keladi: embriogenezning ilq davrillardagi metafaza xromosomalari embrion

rivojlanishining oxiridagi metafaza xromosomalaridan morfologiya jihatidan farq qiladi: ular ancha ingichka kuchli dekomptlashgan va geteroxromatin bloklari ko'rinmaydi. Olim bunday xromosomalarni Yuvenil xromosomalar deb nomlaydi.

Emriogenezning boshlangich davrlarida barcha tekshirilgan hayvonlarning - tsiklop, losos, forel, bir qator amfibiyalar, sichqon — dastlabki maydalanish davridagi blastomerlarning interfazada turgan yadrolari o'ziga xos xususiyatlarga ega. Miqdori ikki-to'rt davrlardagi blastomerlar noto'g'ri shaklidagi pufakchalar ko'rinishida bo'ladi, karioplazmasi tiniq, geteroxromatin rayonlari aniqlanmaydi. Bunday yadrolardagi xromosomalar despiral holada bo'ladi, yadrochalar aniqlanmaydi. Metafaza davrdagi xromosomalar ingichka ipchalar shaklida ko'rinadi. Blastomerlarning keyingi bo'linish davrlarida yadrolari asta-sekin shakllanadi, yadrochalar rivojlanadi, natijada xromosomalar tur uchun metafazaga xos bo'lgan morfologik tuzilishi va shakliga ega bo'ladi. Ushbu davrdagi rivojlanish stadiyalarida geteroxromatin tarkibida asosan giston oqsillar aniqlanadi, lekin gistsiz oqsillar bo'lmaydi.

Drozofilaning blastula davrgacha bo'lgan emriogenezi to'liq o'rganilgan. Otalanishdan so'ng zigotaning yadrosi tez birin-ketin 8 marta bo'linadi, blastomerlar tuxumning Yuzasiga qarab migratsiyalanadi, lekin bo'linish jarayoni davom etaveradi. Tuxumning Yuzasida blastomerlar yana 4 marta (10-13 tsikllar) bo'linadi va bir qavatli embrion hosil qiladi (sintsitiy). YAdrolar atrofida qobig'i hosil bo'lganidan keyin 14-chi tsiklning interfazasida embrionning blastoderma qavati shakllanadi.

Hujayra bo'linishlar, maydalanishlar juda tez vaqtda davomida amalga oshadi. Masalan, bitta mitotik tsikl o'rtacha 10 minut davom etadi. Lekin, 12-chi bo'linishidan keyin har bir tsiklning davom etishi uzayadi: 12,4 min gacha-12-chi; 21,1min-13-chi. Birinchi 11-12 bo'linishlarda blastomerlarning yadrolaridagi yadrochalar va xromomarkazlar aniqlanmaydi, xromatin esa, Yupqa dispers ko'rinishida aniqlanadi, mitotik xromosomalarda eu- va geteroxromatinga differentsiatsiyasi kuzatilmaydi.

YAdrochalar va xromomarkazlar embrional rivojlanishning blastoderma davrida paydo bo'ladi. Agarda blastoderma hujayralarini yadrosini otalanmagan tuxumga o'tkazilsa, yadrochalar va

xromomarkazlar yo'qoladi, xromatin Yupqa dispers to'r shakliga aylanadi va 15 minutdan so'ng yana maydalanish davri boshlanadi.

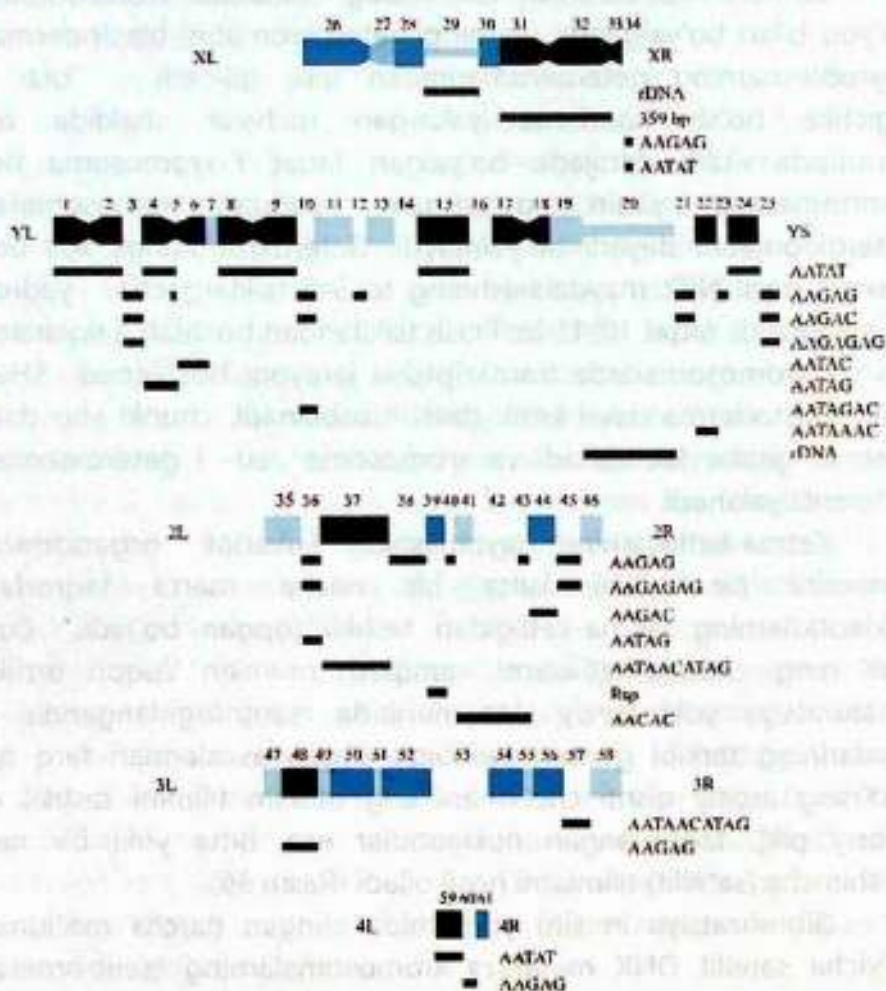
Birinchi 4-5 bo'linish tsikllaridagi metafaza xromosomalar S-bo'yoq bilan bo'yalganda ularning geteroxromatini blastoderma yoki neyroblastlarning geteroxromatinidan farq qilinadi. Ular uzun ingichka bo'sh kondensatsiyalangan ipchalar shaklida bo'ladi. Kariotipda etarli darajada bo'yalgan faqat F-xromosoma bo'ladi, tsentromeraga yaqin joylashgan boshqa xromosomalarning geteroxromatini deyarli bo'yalmaydi. Geteroxromatinga xos bo'lgan maxsus oqsil NR1 maydalanishning to 5-6 tsiklarga yadrolarda aniqlanmaydi, faqat 10-11 bo'linish tsikllaridan boshlab aniqlanadi. Bu davrda xromosomalarda transkripsiya jarayoni boshlanadi. SHunday qilib, blastoderma davri kritik davri hisoblanadi, chunki shu davrdan boshlab genlar faollashadi va xromosoma eu- i geteroxromatinga differentsiyalanadi.

Ketma-ketliklarning qaytarilishlari. Eukariot organizmlarning genomini bir qismi kalta bir necha marta taqrorlangan nukleotidlarning ketma-ketligidan tashkil topgan bo'ladi. Bunday DNK ning ketma-ketliklarni aniqlash mumkin Yuqori tezlikdagi renaturatsiya yoki tseziy xlor muhitida tsentrifugirlanganda. Azot asoslarining tarkibi genom tarkibiga kirgan asoslaridan farq qiladi. DNKning asosiy qismi cho'kmani eng muhim tilimini tashkil etadi (asosiy pik), taqrorlangan nukleotidlar esa, bitta yoki bir necha qo'shimcha (satellit) tilimlarni hosil qiladi (Rasm 36).

Gibridizatsiya in situ yordamida olingan barcha ma'lumotlar bo'yicha satellit DNK metafaza xromosomalarning tsentromerasiga yaqin joylashgan geteroxromatinda va interfaza davrida turgan yadrolarning xromoma markazlarida joylashgan bo'ladi Kamdan kam satellit ketma-ketliklar euxromatinda joylashadi.

Tsentromeraga yaqin joylashgan geteroxromatinda satellitlardan tashqari DNKning ribosoma genlarini mo'tadil ketma-ketliklari joylashgan bo'ladi. Drozofilaning juda ko'p marta takrorlangan ketma-ketliklarini taxlil qilinganda nukleotidlarning tarkibi va takrorlanish darajasiga asoslangan holda ularni uchta guruhga ajratish mumkin: 1) 1,679 g/sm³ zonada cho'kadigan fraktsiya bo'lib, ribosomal DNKning ketma-ketligidan tashkil topgan; 2) 5-10 pn taqrorlanganlardan

tuzilgan satellitlar; 3) 1,688 g/sm zonada cho'kma hosil qiladigan satellit— tandem taqrorlanishini uzunligi 359 pn ga teng.



36- Rasm. *D. Melanogaster* mitotik xromosomalarining geteroxromatinida har xil satellitlarning joylashishi. Bo'yalgan bloklar geteroxromatin joylashgan hududlar. Xromosomalar ustidagi raqamlar turli differentsial bo'yoqlar bilan bo'yalgan qismlari. Xromosomalar tagidagi gorizontaal chiziqlar ma'lum satellitning joylashgan joyi. Nukleotidlarning ketma-ketligi o'ng tomonda ko'rsatilgan.

Drozofilani satellit DNKsidan ajratib olingan kalta (300-600 pn) fragmentlari klonlashtirilib va ularning nukleotidlar ketma-ketligi tekshirilishi natijasida aniqlagan: 1. Satellit DNKning tarkibiga 11 tip taqrorlanishlar kiradi, ularning to'rtasi major va ettitasi — minorlar. 2,

Taqrorlanishlarning ko'p tipi har bir xromosomada bo'ladi, lekin ma'lum bir xromosomaning o'ziga xos maxsus taqrorlanishlari ham bor, masalan, satellit 359 pn (rasm 36). 3.Odatda taqrorlanishlarning nukleotid tarkibi gomogen, ayrim almashinishlar ming juft nukleotidlarga nisbatan bitta-yarimta uchraydi, lekin ayrim holatlarda almashinishlarning miqdori 100 martaga oshib ketishi mumkin.

4. Satellitlarning ketma-ketliklari orasida ko'plab o'rta meyordagi takrorlanishlar uchraydi (mobil elementlar).

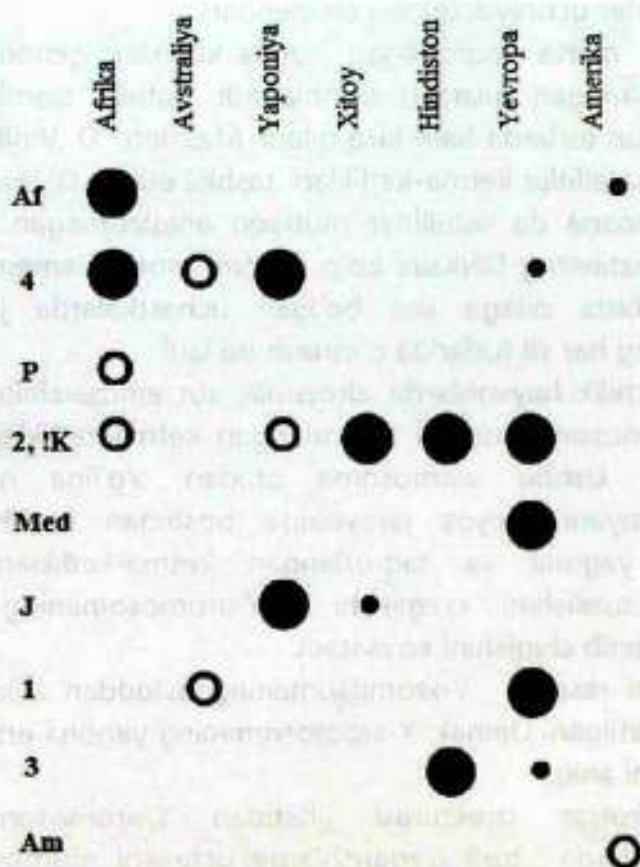
Ko'p marta taqrorlagan ketma-ketliklar genomning asosan doimiy bo'lmagan qismlari hisoblanadi. Satellit qismlari bir biriga yaqin bo'lgan turlarda ham farq qiladi. Masalan, *D. Virilis* turida DNK ning 40% satellitlar ketma-ketliklari tashkil etadi, *D. texana* turida — 35%, *D. ezoana* da satellitlar mutlaqo aniqlanmagan. Drozofilada geteroxromatinning DNKsini ko'p qismini mobil elementlar egallaydi. Ular har bitta oilaga xos bo'lgan uchastkalarda joylashadi va drozofilaning har xil turlarida o'xshash bo'ladi

Ko'pchilik hayvonlarda, drozofila, sut emizuvchilar va odamda ham Y-xromosoma asosan taqrorlangan ketma-ketliklardan tuzilgan (rasm 36). Ushbu xromosoma otadan o'g'liga nasllanadi va rekombinatsiyani meyozi jarayonida boshidan kechirmaydi. SHu sababdan yagona va taqrorlangan ketma-ketliklarning barcha individual tuzilishini o'zgarishi Y-xromosomaning evolyutsiya jarayonida kelib chiqishini ko'rsatadi.

38-chi rasmda Y-xromosomaning avloddan avlodga qanday o'tishi ko'rsatilgan. Demak, Y-xromosomaning yagona erkak ajdoddan kelib chiqishi aniq.

Molekulyar strukturasi jihatidan Y-xromosoma har xil populyatsiyalarda turli o'zgarishlarga uchrashi mumkin: insertsiya, deletsiya, duplikatsiya, inversiya, yirik va mayda satellitlarning ketma-ketligi, mikrosatellitlarni va restriksiya fragmentlarning uzunligini o'zgarishi. Mikrosatellitlarni har xil genetik tahlillarda qo'llash muhim ahamiyatga ega. Odatda bular juda kalta (2-5 pn) tandem taqrorlanishlar bo'lib, eukariot organizmlarning genomi bo'yicha tarqalgan. Bunday taqrorlanishlarning nusxalarini soni har bir joylashgan joyida o'zgargan bo'ladi. Masalan, odam π -globinini psevdogenining intronida beshta ATGT ketma-ketligini taqrorlanishlari aniqlangan, shimpanze yoki qorillada xuddi shu joyda — 4ta,

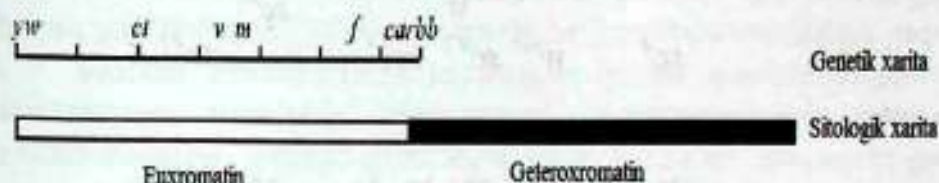
orangutan, gibbon va boshqa tur maymonlarda bunday ketma-ketlik faqat bir marta uchraydi. Aniqlangan barcha xususiyatlar yig'indisining kombinatsiyasi (polimorfizm) gaplotipni hosil qiladi. O'ta variabel polimorfizmlar Y-xromosomani aniqlashga, unchalik variabel bo'lmagan belgilar esa, xromosomalarni guruhlarga ajratishga imqoniyat yaratadi xromosom.



Rasm 37. Odam Y-xromosomasining ayrim gaplotiplarining har xil populyatsiyalarda kuzatilishi.

Vertikalda — gaplotiplar: Af — afrikalik, R — pigmey tipi, IK — !Kung, Med — o'rtadengiz, J — yapon, At — ameriko-indey. Katta qora doira — bunday gaplotipni populyatsiyada keng tarqalishi, kichik qora doira — gaplotipni populyatsiyada kamdan-kam uchrashi, oq rangli doira — alohida individlarda kuzatilishi.

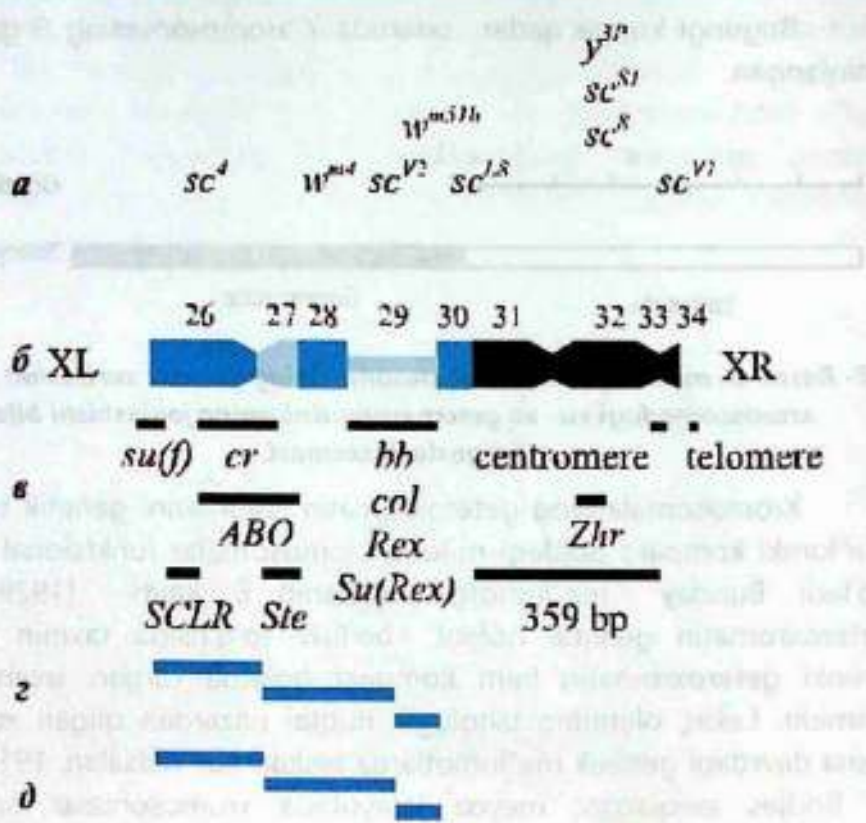
Bugungi kunga qadar odamda Y-xromosomaning 9 gplotipi aniqlangan.



38- Rasm. *D. melanogaster* A-xromosomasining genetik xaritasida mitotik xromosomadagi eu- va geteroxromatinlarning joylashishi bilan taqqoslash sxemasi.

Xromosomalarning geteroxromatin rayonlarini genetik tuzilishi. Ma'lumki kompakt holdagi mitotik xromosomalar funksional nafaol bo'ladi. Bunday ma'lumotga asoslanib E. Xayts (1929-1933), geteroxromatin genetik nafaol bo'lishi to'g'risida taxmin qilgan, chunki geteroxromatin ham kompakt holatda turgan xromosoma qismidir. Lekin, olimning tsitologik nuqtai nazardan qilgan xulosasi, o'sha davrdagi genetik ma'lumotlarga teskari edi. Masalan, 1916 yilda K. Bridges aniqlagan: meyoz jarayonida xromosomalar noto'g'ri taqsimlanishi natijasida erkak organizmlarning kariotipida Y-xromosomasi bo'lmasa (XO), organizm hayotchang, ammo bepusht bo'lar ekan. Demak, Y-xromosomadagi geteroxromatin tarkibida avlod hosil bo'lish xususiyatga javob beradigan omillar bo'lishi kerak.

30 yillarning boshlarida X-xromosomaning genetik xaritasi tuzilgan edi (rasm 38). Xarita shuni ko'rsatdiki, xromosomaning barcha genlari (bobbed lokusdan istisno) zuxromatinda joylashgan, ya'ni geteroxromatin anchagina genetik inert ekan. Ammo, drozofilaning geteroxromatin bloklarini olib tashlansa, pashsha haloq bo'ladi, demak uning geteroxromatinida genlar ham bo'ladi (Dj. SHults, 1941). Bunday teskariliklar 80 yillarda xromosomalarning har xil qayta quruluşlarini differentsial bo'yashlar bilan aniqlash va gibridizatsii in situ usullarini qo'llashi natijasida hal bo'ladi.



39- Rasm. D. Melanogaster A-xromosomasi geteroxromatinining funksional saytlari

a —inversiyaning uzilgan nuqtalari; b — geteroxromatin bloklarining (26-34) tsitologik xaritasi; v —funksional saytlarining xaritasi; g — joylashish effektini modifikatsiya qiluvchi rayonlar, d — lichinkalar so‘lak bezlarini hujayralaridagi rDNK endoreplikatsiyasiga taʼsir etuvchi rayonlar.

Hozirgi vaqtga kelib, drozofilaning har xil turlarini, ayniqsa D. Melanogasterni geteroxromatini, X-, Y-xromosomalari va autosomalarning genetik tuzilishi yaxshi o‘rganilgan.

Drozofila pashshasini ikkinchi xromosomani tsentromerasiga yaqin joylashgan geteroxromatinida 13ta lokusda joylashgan va 113 mutatsiyalar xili aniqlangan. Ushbu xromosomada ilgari ham bir nechta genlar aniqlangan edi, hammasi bo‘lib 18 ta gen joylashgan bo‘ladi.

Demak, bunday maʼlumotlar shuni ko‘rsatdiki qanchalik geteroxromatin genlarga kambag‘al ekan, eukariotlarga nisbatan: 2-

chi xromosomasining geteroxromatinida genlarning miqdori euxromatinga nisbatan 1%ni tashkil etadi xolos.

Pashshaning uchinchi xromosomasida 12ta gen aniqlangan, demak genlarning joylashish zichligi ikkinchi xromosomadagiga yaqin.

Ikkinchi xromosomada joylashgan genlar klonlashtirilgan va ta"riflangan: masalan, rolled geni proteinkinazani mitogen faollashtiradigan oqsilga gomologik bo'lgan oqsilni, concertina geni embrional taraqqiyotda hujayra aro kommunikatsiyalarda muhim rol bajaradigan G-proteinning alfa-subbirligini kodlaydi.

39 rasmda X- i Y-xromosomalarning tsitogenetik xaritasi keltirilgan.

X- i Y-xromosomalarning geteroxromatinida joylashgan ayrim genlarning qisqa ta"rifi kuyidagicha: bb (bobbed) — 150-250 marta taqrorlangan genlarning joylashgan rayonlari va ribosomal RNK 18S va 28S kodlaydi; cr (compensation response) — gomologlarning bittasi yo'qolganda rDNK genlarining politenizatsiyasini kuchaytiradi; abo/ABO-tizim (cistema) (abnormal oocyte) — balki hujayrada ribosomal RNKning miqdorini nazorat qilsa kerak; Rex (ribosomal exchange) — ikkita rDNKning klasterlarini orasidagi mitotik almashinuvini induksiya qiladigan lokus; cry (crystal) / Ste (Stellate) — genlar o'zaro ta"sirini amalga oshiruvchi tizim; Ste X-xromosomaning euxromatin qismini o'rtalarida joylashgan; cry (yoki boshqacha — Su(Ste)) — Y-xromosomaning h11 blokida joylashadi. Erkaklari cry, Ste steril (bepusht) bo'ladi. Molekulyar darajada cry — bu 80-marta taqrorlangan, restriksiya saytlari Cfol bilan chegaralangan va uzunligi 800 pn atrofida bo'lgan DNK elementlari. Ste qism cry bilan qisman gomolog bo'lib, bir necha marta taqrorlanadi: 200 kopiya (nusha) Ste da va ~20 kopiya Ste+da. Uchinchi sayt Ste taqrorlanishning joylashishi X-xromosomaning geteroxromatinida aniqlanadi. Pristutstvie Normal allelning cry bo'lishi RNK Ste+ to'planishini ingibitsiya qiladi. Y-xromosomani chetlatishi RNK Ste+ mahsulotini o'ta sinteziga olib keladi.

cry Ste+ faolligini nazorat qilsa kerak, degan taxminlar bor.

G. Meyer, O. Xess i V. Beermann 1960 yillarning boshlarida D. melanogaster ning spermatotsitlarini yadrolarida alohida maxsus ipsimon tuzilmalarni ("halqalar") ta"riflashgan. Keyinchalik ushbu "halqalar"- Y-xromosomaning kompakt bo'lmagan qismlari ekanligi

aniqlangan bo'ladi. SHu joylarda RNK sintezlanadi va oqsillar yig'iladi. Har bir halqa ma'lum kattalikda va o'z tuzilishiga ega bo'ladi. Erkak organizmlarda X0 bunday halqalar bo'lmaydi, lekin XYY erkaklarda, halqalar soni ikki marta ko'p bo'lishi aniqlangan. Agarda Y-xromosomani qaysi bir qismii duplikatsiyasi kuzatilsu, shu joyda joylashgan halqa duplitsirlangan bo'ladi. Olimlarning fikrilar bo'yicha erkak organizmning serpushtligi halqalarga bog'liq ekan, chunki qaysi birining yo'qolishi bepushtlikka olib keladi. Y-xromosomada 7-ta halqa aniqlangan, ya'ni fertil genlarning miqdoriga yaqin (7-16). SHu genlarning bittasini funktsiyasi aniqlangan: kl-5 geni spermatozoidning dumidagi tashqi mikronaychlarini shakllanishini nazorat qiladi.

D. hydei turidagi drozofilaning halqalarni umumiy uzunligi 1000 mkm, yoki Y-xromosomadagi DNKning 1/12 qismini tashkil etadi. Qolgan halqalarning 11/12 funktsiyasi hali noma'lum. Fertil genlarining uzunligi juda katta: 4000 tpn gacha etadi. Ularning tarkibida polipeptidlarni kodlamaydigan ko'p miqdorda satellit DNK lar kiradi.

D. hydei ning Y-xromosomasi 2 tipagi DNKdan tuzilgan: 1) Y – maxsus, satellitlarga o'xshash, faqat shu xromosomada uchraydigan va oilalar hosil qilib joylashgan 200-2000 nusxalar tandem shaklidagi ketma-ketliklar; 2) Y-xromosomaga bog'langan taqrorlanishlar. Bunday taqrorlanishlar odatda genomning mobil elementlari bo'lib, shu xromosoma va boshqa xromosomalarda ham uchraydi. Halqa gigant transkript hisoblanadi. Uning tarkibida asosan DNKning taqrorlangan ketma-ketliklar – satellitlar, defekt va normal mobil elementlar bo'ladi.

D. melanogaster ning uzunligi 1300 tpn atrofida bo'lgan halqasida kl-5 geni joylashgan. Genning ekzonlarini uzunligi taxminan 14 tpn ga teng bo'lib, satellitlar AAGAG va AAGAC va mobil elementlar orasida joylashadi.

D. hydei ning boshqa bir halqasida thread fertil A geni joylashgan., Halqaning chegarasida gomogen taqrorlanishlarning bloki YLI uzunligi 1,5 mln pn ga teng bo'lib, rally deb nomlangan (umumiy uzunligi 400 tpn) taqrorlanishlarning bloklari bilan uzilib tuzilgan. Transkriptning qolgan qismi micropia oilasiga kiruvchi taqrorlangan retrotranspozonlardan va YLII taqrorlanishlardan tuzilgan bo'ladi.

Halqalar transkriptsiya jarayonida faol ishtiroq etadi: masalan, 3N-uridin bilan hujayra yadrosi nishonlanganda 50% atrofidagi nishonlanishning miqdori Y-xromosomada, qolgan 50% - boshqa xromosomalarda aniqlangadi.

Genlar bilan kodlangan ko'p miqdordagi oqsillar har xil xromosomalarning (Y- xromosomada emas) halqalarida to'planadi.

Zamonaviy ma'lumotlar asoslangan xolda, halqalar: 1) spermatidlarning rivojlanishini boshqaradi; 2) spermatotsitlarning shakllanishiga kerak bo'lgan katta hajmdagi oqsillarni bog'laydi; 3) spermatozoidlarning o'ta uzun dumcha hosil bo'lishini ta'milaydi.

Barcha ma'lumotlarni tahlili natijasida xulosa qilish mumkin: euxromati va geteroxromatin DNK sining molekulyar va genetik tuzilishi bo'yicha katta farq qiladi.

Savol tug'iladi: euxromatin va geteroxromatin qanday vazifalar bajarishi mumkin. Euxromatinda organizmning rivojlanishi va hujayralarining hayoti uchun zarur bo'lgan genlarning asosiy qismi joylashgan bo'lsa, geteroxromatin unda qanday vazifa bajarishi hozirgi kungacha noaniq, faqat ayrim mulohazalarni keltirish mumkin:

1. Geteroxromatindiyarli barcha turlarning genomida bo'ladi, demak kerak ekan. 2. Geteroxromatinni hosil qilgan DNKning nukleotidlarini ketma-ketliklari ontogenez jarayonida somatik hujayralarning yadrolaridan osongina yo'qolishi mumkin, masalan, drozofilaning xromosomalarni politen shakllariga o'tishida (politenizatsiya), askarida va tsikloplarning xromatinlarini diminutsiyalarida, infuzoriyaning makronukleusining etilishida va h.k. Lekin, xomilaning rivojlanishini barcha davrlarida hujayralarida DNK ning shu ketma-ketliklarini miqdori turga xos bo'lgan miqdorda doimo saqlangan bo'ladi. 3. Geteroxromatinda joylashgan miqdori kam bo'lgan genlar ko'pincha embrionning hujayralarida ma'lum bir funktsiya bilan bog'langan bo'ladi, masalan, gametalarning etilishida ishtiroq etadi. Geteroxromatinda joylashgan ayrim DNKning ketma-ketliklari meyozi jarayonida jinsiy xromosomalarni profaza davrining kongatsiyasida ishtiroq etadi.

Demak, geteroxromatin embrionning taraqqiyotida muhim rol bajaradi.

Telomeralar va telomeraning geteroxromatini. 1980 yillarning boshlarida xromosomalarning uchlarida ma"lum tuzilmalarning bo'lishi to'g'risida faktlar yig'iladi. SHu jumlasida:

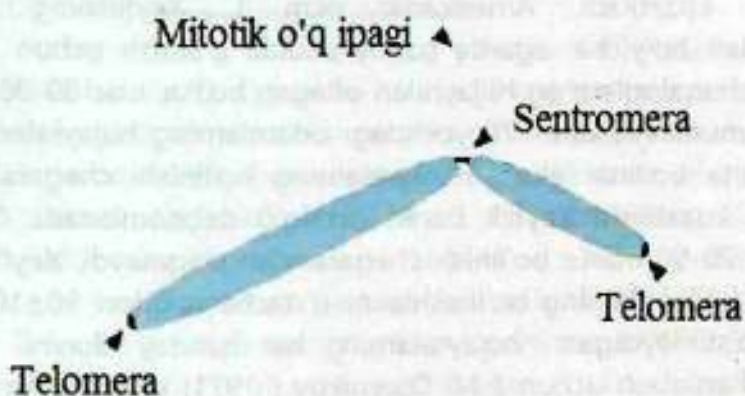
1. TSitologlar o'simliklar va hayvonlar kariotipini tekshirishib aniqlashadi: ayrim xromosomalarning morfologiya va umumiy to'plami o'zgarmas ekan. Agarda xromosomalar bir biriga yaqin kelganda uchlari bilan yopishish xususiyatga ega bo'lganda, bunday doimiylik kuzatilmay edi. Demak, xromosomalar tarkibida qandaydir tuzilmalar bo'lib, ularning uchlari bilan yopishishga to'sqinlik qiladi.

2. 1927 yilda G. Myoller drozofila pashshaning hujayralariga rentgen nurlarini ta"sir etib, sun"iy usulda mutatsiyalarni hosil qiladi. Mutatsiyalar har xil bo'lishi mumkin: nuqtali yoki xromosomalarning tuzilishini o'zgarishi (inversiya, translokatsiya, deletsiya va duplikatsiyalar). Xromosomalarning qayta qurilishlari turli joylaridagi uzulishlar va so'ng yana bir biriga yangi tartibda qo'shilishlari natijasida hosil bo'ladi.

1932 yilda G. Myoller xromosomalarning qayta qurishlarning hosil bo'lish qonuniyatlarini tekshiradi va 2ta xulosa qiladi: 1) sun"iy usulda hosil bo'lgan xromosomalarning uchlari xuddi shunday sun"iy hosil bo'lgan qismlari bilan birlashadi, ya"ni normal xromosomalarning uchlari bilan emas; 2) nurlanishning ta"sirida normal xromosomalarning uchlari hech qachon xromosomaning ichkarisiga o'tmaydi. Olingan natijalarni izohlash uchun olim taxmin qiladi, xromosomalarning o'rta qismlarida joylashgan fragmentlar "genlar" (Myollerning ta"rifi bo'yicha) bipolyar xususiyatga ega, ya"ni xromosomalarning boshqa qismlari bilan ikkala tomoni bilan birikishi mumkin. Normal xromosomaning uchlarida joylashgan "genlar", Myollerning fikri bo'yicha, unipolyar bo'ladi, ya"ni birikishi mumkin faqat xromosomaning ichki tomoniga qaragan qismi bilan. SHu sababdan, olim taxmin qiladi, shu xromosoma uchida joylashgan unipolyar "gen" xromosoma uchini "bekitish" uchun qo'llaniladi. Bunday «gen» maxsus atama bilan nomlanadiga bo'ldi - «telomera» (yunon. «telos» — uchi, «meros» — qism) (rasm. 40).

1941 yilda B. MakKlintok makkajo'xorini xromosoma qaytaqurilishlarini induktsiyalab, xuddi Myollerning xulosalariga o'xshagan natijalar oladi. Bundan tashqari, telomeraning passiv holati xromosomalarning boshqa qismlari va boshqa xromosomalar

bilan uchma-uch birlashishga, ya'ni yopishishga to'sqinlik qilishda muhim vazifa bajaradi, natijada xromosomalarning va butun kariotipni individualligi va doimiyligini saqlashda katta ahamiyatga ega.



40- Rasm. Mitotik xromosomalarning uchlariidagi telomerlar

3. DNK strukturasi va replikasiyasini mexanizmlari aniqlangandan so'ng rus olimi A.M. Olovnikov DNK molekulasini uchida replikasiya qanday amalga oshish jarayonini mexanizmi bilan qiziqadi. Chunki har bitta xromosoma bitta uzuluksiz DNK molekulasidan tashkil topgan va molekulaning uchlari xromosoma uchlari bilan bir biriga to'g'ri keladi. DNK molekulasini standart replikasiyasining modeliga ko'ra DNK zanjirinin ikki xissa ortishi kalta RNK-praymerlaridan boshlanadi va 3'-uchlaridan boshlanib, to molekulaning oxirigacha davom etadi, natijada DNK qismlari sintezlanadi – Okazaki fragmentlari. So'ngra RNK-praymer olib tashlanadi, hosil bo'lgan bo'sh joylar (geplar) DNK fragmentlari bilan to'ldiriladi. DNK fragmentlari praymer shaklida Okazaki fragmentlarining 3'-uchlaridan foydalanib sintezlanadi. DNKning oxirgi fragmenti uchun praymeri bo'lmagan sababli hosil bo'lgan zanjir asos qilib olingan zanjirdan 8-12 nukleotidlarga kam bo'ladi. (RNK-praymerning uzunligi). Natijada DNK replikasiyasini har bir tsiklini oxirida to'rtta zanjirining bittasi 8-12 pn ga kalta bo'ladi, ya'ni DNKning har bir zanjirlar 2-3 nukleotidlarga kaltaroq bo'ladi. SHu

sababdan A.M. Olovnikov kuyidagi xulosaga keladi: agarda hujayrada nukleotidlar kamayishini oldini olish maxsus mexanizmlar bo'lmaganda edi, xromosomalar borgan sari kaltalashib pirovardiga kelib yo'qolar edi, ya'ni hujayrani o'limiga olib keladi.

Haqiqatdan ham sun'iy usulda (in vitro) o'stirilayotgan hujayralar, masalan, odam hujayralarining bo'linishi chegaranlangan miqdorda kuzatiladi. Amerikadik olim L. Xeyflikning (1965) ma'lumotlari bo'yicha, agarda sun'iy usulda o'stirish uchun yangi tug'ilgan chaqaloqlarning hujayralari olingan bo'lsa, ular 80-90 marta bo'linishi mumkin ekan, 70 yoshdagi odamlarning hujayralari faqat 20-30 marta bo'linar ekan. Hujayralarning bo'linishi chegaralangan miqdorda kuzatilishi Xeyflik bareri (to'sig'i) deb nomlanadi. Odatda hujayralar 20-90 marta bo'linish chegarasidan chiqmaydi, Xeyflik fikri bo'yicha hujayralarning bo'linishlarini o'rtacha miqdori 50 ± 10 teng. In vitro o'stirilayotgan hujayralarning har qanday klonini hayot muddatini aniqlash uchun A.M. Olovnikov (1971) kuyidagi formulani taqlif etadi:

T — hujayralarning hayot muddati; k — hujayralar klonining yashash muddati bilan DNK replikatsiyalar miqdori o'rtasidagi korelyatsiya koeffitsienti; lt — telomer qismining uzunligi; lm — har bir replikatsiya tsikli natijasida yo'qolgan DNK fragmentining uzunligi; n — o'tilgan replikatsiyalarning miqdori.

SHunday qilib, Olovnikov hujayra klonlarining hayot muddatini telomer qismlaridagi DNKsini uzunligi bilan bog'laydi. Xromosomalarning uchlarida joylashgan replikonlarni vaqtincha himoya qilish uchun hujayra majbur bo'ladi telomeralarda joylashgan telogenlari bilan foydalanishish. «Telogen»larning funksiyasi uzoq vaqtlar davomida noaniq edi, xozirgi kunga kelib, noinformatsion gen deb nomlanadi va o'zida "bufer" funksiyasini saqlaydi, hamisha bir xil nukleotidlar ketma-ketliklaridan tuzilgan bo'ladi. Mitoz jarayonida telogenlar kaltalashadi va shu bilan informatsion genlarni replikatsiya vaqtida kesilishidan saqlaydi.

Haqiqatda ham, DNK ning uchini kaltalashishi to'g'risida kuyidagi tajribalarning natijalari dalil bo'lib xizmat qiladi. Drozofilaning X-xromosomasining telomer qismida DNK molekulasining ko'proq distal joylashgan nukleotidlar ketma-ketligini olib tashlaydigan (chetlatadigan) terminal deletsiyalar aniqlangan.

Keyingi avlodlarda shunday deletsiyalarga ega bo'lgan liniyalarda DNKning uchida joylashgan fragmentlarining yo'qolish tezligi har bir avlodda 50-100 (o'rtacha 75) juft nukleotidlarga teng. DNK replikasiyasida yo'qolgan fragmentning uzunligi Ogazaki fragmentlarni sintezini initsiatsiyalovchi RNK-praymer uzunligiga teng bo'ladi. Lekin, telomeralari bor bo'lgan xromosomalarning DNK molekulasining uzunligi o'zgarmas ekan.

Telomerlarning tuzilishi. Oxirgi yillar turli xil biokimyoviy usullar yordamida bir necha organizmlarning DNKsidan telomerlarlar ajratib olingan. Hayvon va o'simliklarning ko'pchilik turlarida telomerlarning tuzilishi umuman olganda o'xshash ekan. Odatda telomer rayoni tarkibiga ikki tipdagi fragmentlar kiradi: xromosomaning xususiy oxirgi qismi (yoki telomerning uchini taqrori — TR) va telomer bilan bog'langan proksimalroq joylashgan ketma-ketligi (TAS).

Tetraximena deb nomlangan infuzoriyada DNKning eng oxirgi qismi tarkibiga ko'p marta taqrorlangan geksanukleotidning 5'-CCCCAA-375'-TTGGGG-3' ketma-ketligi kiradi. Ketma-ketliklarning joylashishi kuyidagicha: TTGGGG-taqrorlar DNK bitta zanjirining 3'-uchida joylashgan bo'lsa, SSSSAA- taqrorlar ikkinchi zanjirining 5'-uchini hosil qiladi. Qulaylik uchun birinchi zanjirni G-zanjir, ikkinchisini S-zanjir bilan nomlanadigan bo'ldi.

Hozirgi vaqtga kelib aniqlangan: ko'pchilik tirik organizmlarning telomer fragmentlarining tuzilishi o'xshash, ular G i S nukleotidlari bilan boyitilgan bo'lib, o'xshash tartibda joylashadi. Bir necha belgilari bilan TR tuzilmasi ayrim zamburug'larda va ayniqsa drozofilada farq qiladi.

Tetraximena infuzoriyadan tashqari, telomer taqrorlar boshqa sodda hayvonlarda o'rganilgan, shu jumladan stilonixiya va oksitrixiyada, ularda taqrorlangan birlik bo'lib oktamer 5'-SSSSAAAA-ZU 3'-GGGGTTTT-5' xizmat qiladi. Ushbu oktanukleotid xromosomaning uchlarida shunday joylashar ekan-ki, DNKning G-zanjirini bir qismi bo'sh bo'lib qoladi, chunki ikkinchi zanjiri bo'lmaydi.

DNK zanjirining 3'-uchi xromosomaning uchi bo'lib xizmat qilayotgan bo'lsa, asosiy taqrorlangan birligi oktanukleotid 5'-T4G4-3 bo'lishi aniq. DNK zanjirlarini chiqib turgan uchlari barcha organizmlarning telomeralarida aniqlangan. Uotson-krik qo'sh zanjiri o'rnini egallagan oktanukleotid bir zanjirli va erkin G-uchli deb

nomlanadi. Qiziqarlisi shuki, barcha organizmlarda, har xil taksonomik guruhlarga mansub bo'lsa ham, telomeralarining bir zanjirli va erkin G-uchli qismlari deyarli bir xil ekan, achitqilardan tashqari. Tahlil qilinganda aniqlandi, DNKning chiqib turgan uchlarida joylashgan guaninning to'rtta molekulasini, tsitozin molekulasini bilan kontakt qilaolmagan bo'lsa ham DNK molekulasidagiga o'xshab, baribir o'zaro bog'lanar ekan. Ular bir tekislikda joylashib o'zaro vodород bog'larini hosil qilib bog'lanadi.

Bunday tuzilmaning shakllanishini o'ziga xos xususiyati shundan iboratki, nukleotidlarning bog'lanishi komplementarlik printsiplida emas, bir xil azotli asosning molekulasini orasida – guaninni orasida hosil bo'ladi.

Yuqorida aytilganidek, telomeraning qayta taqrorlanishi yaqinida DNKning subtelomer taqrorlanishlari deb nomlangan (TAS) qo'lami katta bo'lgan (uzoq masofali) DNK qismlari joylashgadi.

Achitqilarda ikkita subtelomer taqrorlar ta'riflangan X i Y'. X ning razmeri 0,3-3,75 tpn ga teng, unchalik konservativ bo'lmagan Y' (5,2-6,7 tpn) ga nisbatan. drojjei opisano dva subtelomernyx povtora, X i Y'. i menea konservativen, chem). Ular navbatma navbat joylashadi yoki taqrorlanishlar X-elementlardan tuzilgan bo'ladi.

Subtelomer taqrorlanishlar ko'pchilik turlarda aniqlangan. Umumiy uzunligi juda katta bo'lishi mumkin — xironomusning har bir telomerasida to 300 tpn gacha bo'ladi.

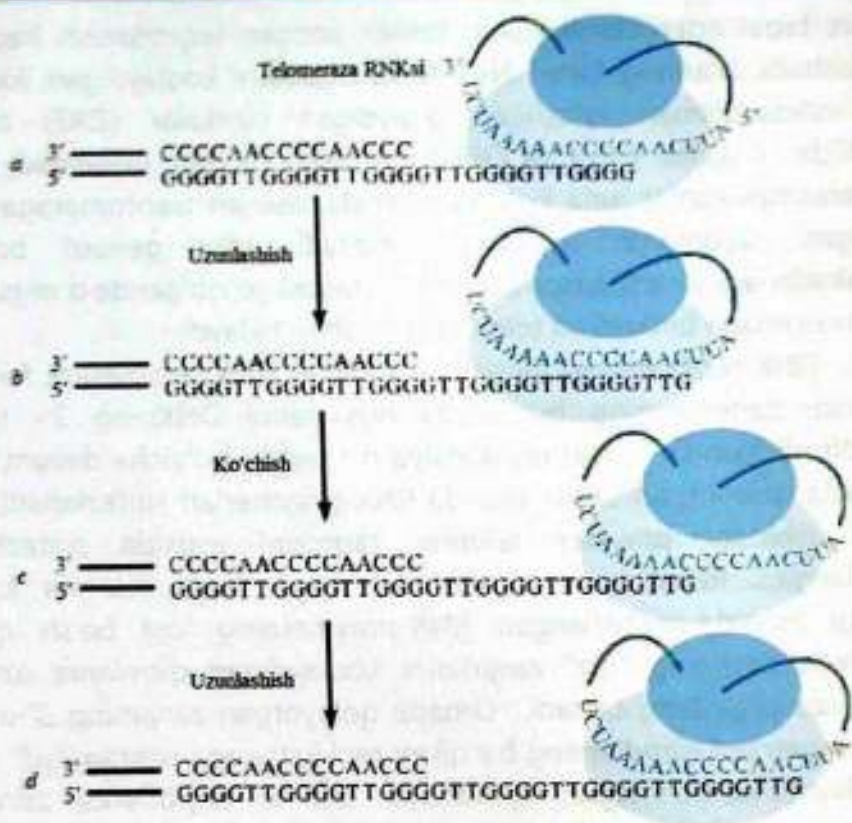
Telomeralarining ketma-ketliklari bilan ikkita oqsil bog'langan bo'ladi. Odamda TRF1 va TRF2 (TTAGGG repeat factors 1 and 2). Ular achitqilarning oqsillariga Tbf1p (TTAGGG-binding protein) gomologik bo'ladi. Har ikkala polipeptidning S-terminal ketma-ketligi telo- boks deb nomlanadi. Ushbu oqsillar DNKning chiqib turgan uchlari va subtelomer ning ikki zanjirli qismini "yopib", ya'ni qoplab turadi.

"Telomera" atamasi drozofila pashshaning ustida olib borilgan tajribalarning natijalari asosida taqlif etilgan, lekin drozofila genomida kalta telomer G-boyitilgan, boshqa ko'pchilik turlarga xos bo'lgan ketma-ketliklar aniqlanmagan.

Drozofilada xromosomalarining uchlarida telomer-xususiy retrotranspozonlar - NeT-A va TART joylashadi. Umumiy olganda ularning tuzilishi o'xshash bo'ladi. Ikkalasini 5'-uchida uncha katta bo'lmagan taqrorlangan ketma-ketliklar, 3'-uchida — ancha cho'zilgan

uzun, faqat adeninlardan (A)_n tashkil topgan taqrorlanish fragmenti joylashadi. Ularning farqi NeT-A da oqsillarni kodlaydigan ikkita bir biri ustida qisman joylashgan "o'qiydigan" ramkalar (ORF) bo'ladi, TARTda — ikkita, ORF1 va ORF2 ramkalar tandem joylashadi. Ikkala retrotranspozonlar juda ko'p nusxalarda, asosan tsentomeraga yaqin bo'lgan rayonlarda joylashgan bo'ladi. Ular genom bo'yicha harakatlanadi va xromosomaning telomerasi yo'qolganda o'rniga kelib xromosomaga birikadi va telomer tuzilishini tiklaydi.

DNK replikasiyasi jarayonini oldidan DNK telomeraza fermenti telomer taqrorlarning bir necha nusxalarini DNKning 3'- uchiga birlashtiradi. Bundan keyin replikasiya o'z tartibi bo'yicha davom etadi. Orqada qolayotgan zanjir asosida RNK-praymerlari sintezlanadi, lekin eng uchidagi praymer telomer taqrorini asosida sintezlanishi aniqlangan. Replikatsiya tugaganidan keyin faqat telomer ketma-ketligi asosida sintezlangan RNK-praymerning joyi bo'sh qoladi. Natijada DNKning "qiz" zanjirlarini kodlaydigan qismlarini uzunligi "ona" zanjirga teng bo'ladi. Orqada qolayotgan zanjirning 3'-uchida joylashgan nukleotidlarning bir qismi replikasiyaga uchramaydi. Lekin bunday to'liq bo'lmagan replikasiya telomer taqrorlanish zonasida joylashgan sababli xech qanday yonida joylashgan genlarga salbiy ta'sir ko'rsatmaydi. Ammo replikasiyalarning bir necha tsikllaridan so'ng telomer taqrorlanishning kamayishi tufayli to'liq bo'lmagan replikasiya asta-sekin yonida joylashgan genlarga salbiy ta'sir ko'rsata boshlaydi. SHu sababdan, telomerazaning ikkinchi vazifasi G- ipini doimo to'ldirib turishdan iborat. Telomerazaning o'zini matritsa qismi bo'lgan RNK-molekulasi bo'ladi. Ferment shu matritsasi orqali telomer taqrorini aniqlaydi (rasm 41). 5'-SAASSSSAA-3' ketma-ketligi telomeraza molekulasini tarkibida bo'lib, telomerning taqrorlanishini ketma-ketligi 5'-TTGGGG-3' bilan juftlashadi (rasm 41, a). Telomerazaning RNKsidagi AAS nukleotidlar juftlanmay qoladi, lekin ularning asosida TTG nukleotidlar sintezlanadi (41,b). Ferment telomerning ketma-ketligini eng uchiga o'tadi, ya'ni TTGGGGTTG ning butun uzunligi bo'yicha, telomerazaning RNKsidagi AAS nukleotidlar telomeraning DNKsidagi TTG nukleotidlari (41, v) bilan juftlashadi.



41-Rasm. Telomeraza fermenti yordamida telomera takrorlanishlarining uzaytirilishi.

SHundan keyin ketma-ketliklarning barcha taqrorlari hosil bo'ladi. Drozofilaning DNK molekulasini uzayishi mana shu printsiptda, boshqa turlarnikiga o'xshab amalga oshadi.

SHunday qilib, xromosomaning uchi maxsus DNK-oqsil tuzilma (struktura) bilan guyo "pechatlangan" bo'lib, butun xromosomaning DNKsini normal replikatsiyalanishiga imqoniyat yaratadi. Xozirgi vaqtda telomer taqrorlanishning uzayish mexanizmini buzulishi xavfli o'smalarning rivojlanishiga olib kelishi va qarilik jarayonida muhim rol bajarishi to'g'risida ma'lumotlar to'planmoqda.

Embriogenez hujayralarining telomeralari telomerazaning yuqori faoliyati tufayli o'zining uzunligini saqlab turadi. Lekin, somatik hujayralarini sun'iy usulda in vitro, o'stirilganda, telomeraza nofol bo'lar ekan, shu sababdan telomerlar borgan sari kaltalashadi.

SHu bilan Xeyflik barerini mavjudligini tushuntirish mumkin. Rak hujayralarida bo'linishlar to'xtamaydi, lekin telomeralar kaltalashmaydi.

Ma'lum bo'ldiki, barcha o'smalarning hujayralarida, sun'iy o'stirganda yoki butun organizmdan olingan namunalarda, telomerazaning faolligi yuqori darajada kuzatilgan. Bu holda olimlar kuyidagi fikr yuritishadi: agarda o'sma hujayralarining telomerazasini biror modda bilan inaktivatsiya qilish mumkin bo'lsa, unda o'sma hujayralari tezda Xeyflik bareriga etib, haloq bo'lishar edi, atrofidagi somatik hujayralarga ta'sir etilmaydi, chunki ularda telomerazasi bo'lmaydi.

Demak, xromosomalarning uchlarida joylashgan telomeralar organizmning hayotida muhim ahamiyatga ega ekan.

Telomerlar ayrim xossalari bilan geteroxromatinga yaqinlashadi:

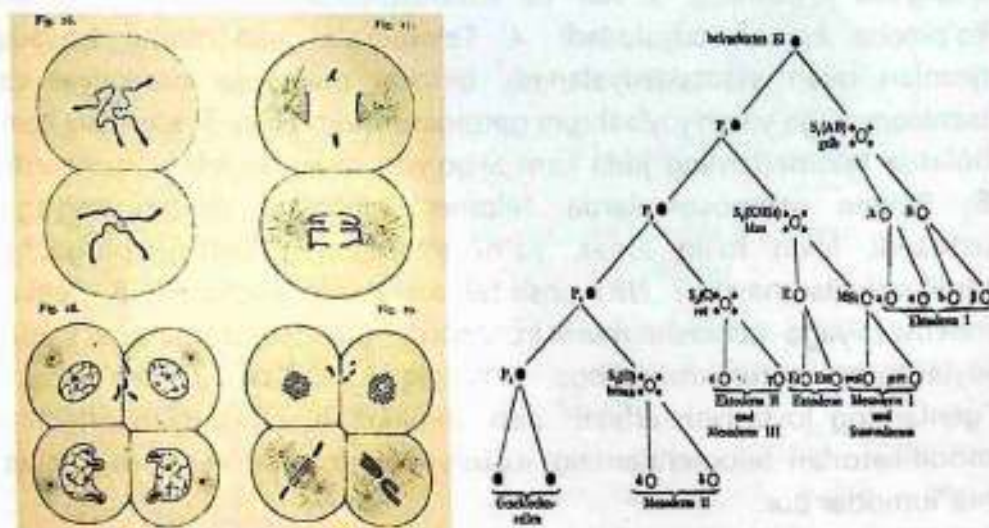
1. Telomeraning tarkibiga taqrorlangan ketma-keliklar kiradi, nusxalarning miqdori o'zgaruvchan bo'ladi. Arpaning xromosomalardagi geteroxromatinning o'ta yirik bloklari telomalarda joylashgan bo'ladi. 2. Telomeralar odatda yadro qobig'ida joylashadi. 3. Xar xil xromosomalarning telomer uchlari ko'pincha konyugatsiyalanadi. 4. Telomeralar genomning boshqa qismlari bilan assotsiatsiyalanadi, birinchi navbatda interkalyar va tsentromeraga yaqin joylashgan geteroxromatin bilan. 5. Kamdan kam holatda telomerlarning juda kam S-bo'yoq bilan bo'yalishi kuzatiladi. 6. Politen xromosomalarda telomer rayonlari politenizatsiyaga uchraydi, lekin to'liq emas, ya'ni telomerning DNKsi oxirigacha replikatsiyalanmaydi. 7. NR1 oqsil telomalarda aniqlanadi. 8. Genlar inaktivatsiyaga uchrashi mumkin, agarda ular tsentromeraga yaqin joylashgan geteroxromatinga o'tkazilgan bo'lsa (ushbu xossa "genlarning joylashish effekti" deb nomlanadi). Joylashish effektini modifikatorlari telomalarning xususiyatlariga ta'sir etishi to'g'risida ma'lumotlar bor.

Xromatin va xromosomalarning diminutsiyasi. Murtak yo'lini hujayralari va xromosomalarning differentsiyalanishi embrional taraqqiyotining boshlangich davrlarida genetik materialning bir qismini yo'qolishi bilan amalga oshadi (xromatin diminutsiyasi, xromosomalarning eliminatsiyasi), tabiatda keng tarqalgan. Masalan, askaridaning ayrim turlarida, toqko'z (tsiklop), infuzoriyalar, kanalar, qo'ng'izlar, kapalaklar, pashsha va baliqlarda xromatinning diminutsiyasi kuzatiladi

Askaridaning Parascaris univalens turining zigotasida ikkita xromosoma bo'ladi, har ikkalasida ham tsentromerasiga yaqin

joylashgan yupqa va eng chetida qalinroq rayonlarni ko'rish mumkin. Boshqa turida *R. equorum* xromosomalar soni $2p = 4$ teng. Xromosomalar tarkibida uncha katta bo'lmagan va kam bo'yalgan materialdan tashkil topgan uchastkalari bo'lib, ular katta hajmdagi S-geteroxromatinga ora-sira joylashadi.

1887 yilda T. Boveri ma'lumotlari bo'yicha, zigotaning ikkinchi maydalanish davridayoq *R. univalens* hujayralarini bittasida xromosomalarining qalin uchlari o'rta qismidan ajraladi va tsentromerasi bo'lmagan sababli ekvator rayonida qolib ketadi va degeneratsiyaga uchraydi. Natijada xromosomaning katta qismi yo'qoladi va Boveri ning tushunchasi bo'yicha xromatin diminuitsiyaga uchraydi. Diminuitsiyani o'tgan hujayradan bo'linish yo'li bilan hosil bo'lgan hujayralarining xromosomalari ancha kalta bo'ladi (rasm 42).



42- Rasm. *Ascaris megalocephala univalens* turi embriogenezining boshlang'ich davridagi xromatini diminuitsiyasining sxematik ko'rinishi (2-4 hujayra bosqichi).

Qora doiralar bilan to'liq genomga ega bo'lgan hujayralar ko'rsatilgan; oq doiralar ichidagi qora nuqtalar bilan – diminuitsiyani boshdan kechirgan hujayralar; oq doiralar – genomi reduksiyaga uchragan hujayralar ko'rsatilgan.

Ikkinchi qiz hujayrada diminutsiya kuzatilmaydi, uning bo'linishi natijasida yana ikkita qiz hujayra hosil bo'ladi. Bittasida diminutsiya kuzatiladi, ikkinchisida – kuzatilmaydi. Natijada, agarda embrion 32ta hujayradan tashkil topgan bo'lsa, faqat ikkitasida DNK ning ketma-ketligini to'liq to'plami aniqlanadi. Keyinchalik ulardan murtak yo'lining hujayralari hosil bo'ladi, qolgan 30sidan somatik hujayralar rivojlanadi. Xuddi shunga o'xshash diminutsiya boshqa turdagi askaridada - *A. Lumbricoides* kuzatiladi.

Parascaris equorum turida diminutsiya jarayonida xromosomaning ichki qismida joylashgan qalin uchastkalar yo'qoladi, qolgan segmentlar esa qo'shilishib bitta yahlit xromosomani hosil qiladi. Askaridada tsentromerasi golotsentrik bo'ladi, bo'linish dukning iplari butun xromosoma bo'ylab bir necha joyiga kelib birikadi. Diminutsiya jarayonini oldidan hujayralarining mikronaychalari diminutsiyada yo'qolmaydigan xromosoma qismlariga birikadi.

R. univalens turida diminutsiya jarayonida xromosomadan ajralgan uchki qismi (xromosoma materialini 80% tashkil qiladi) geteroxromatinga xos bo'lgan xususiyatlarga ega, masalan, N- va S-bo'yicha bo'yalishi, satellit DNK bilan in situ duragaylar hosil qilishi. *R. univalens* diminutsiyada xromosomaning ajralmagan markaziy qismi, N- va S- bo'yicha bo'yalmaydi va satellit DNK bilan duragaylar hosil qilmaydi. *R. equorum* ning xromosomaning barcha kalinlashgan qismlari S- va N bilan bo'yaladi va diminutsiyada ajralib ketadi.

Diminutsiyaga muhtalo bo'lgan DNK taqrorlar bilan boyitilgan bo'ladi. Masalan, *R. equorum* da embrion yo'llarining hujayralari ikkita engil satellitlar saqlaydi, ular birgalikda zigotadagi DNKning 85% tashkil etadi. SHu satellitlar somatik hujayralarda eliminatsiyaga uchraydi.

Ascaris lumbricoides turida eliminatsiyaga uchraydi o'ta yuqori darajada taqrorlangan DNK, taqrorlangan birliklarning uzunligi 125 va 131 pn (nukleotidlar ketma-ketligi)

Murtak yo'lining hujayralaridagi joylashgan satellit DNKning 99%-i diminutsiyada eliminatsiyaga uchraydi. O'rta meyorda taqrorlangan rDNK ning bloklari chetlanmaydi. Eliminatsiyaga uchraydi harakatchang elementlar va noyob ketma-ketliklarning bir qismi. Natijada hosil bo'lgan somatik yadrolarning genomida faqat 10% taqrorlangan bo'ladi va faqat 0,01-0,05 % yuqori darajada.

Xromosomaning uchlarida joylashgan geteroxromatin fragmentlari chetlatilgandan so'ng yangi telomerlar hosil bo'ladi (taqror TTAGGC).

Xromatin va xromosomalar diminutsiyasining fiziologik ahamiyati. Ilmiy ma'lumotlarga ko'ra jinsiy yo'llarning hujayralarida saqlangan DNKdagi genlar embriogenez, lichinkali davri va etuk organizmning funksiyalarining genetik nazoratida ishtiroq etmas ekan. Demak, ushbu genlar oogenez va spermatogenez jarayonlarida qatnashadi degan fikrlar bor.

V. Xennig (W. Hennig) tushunchasi bo'yicha geteroxromatin murtak yo'lini hujayralarining maxsus funksiyalari bilan bog'liq bo'ladi. A. Prokofeva-Belgovskaya fikri bo'yicha askarida xromosomalarining geteroxromatin rayonlari meyozi jarayonini amalga oshirish uchun zarur ekan.

Lekin, teskari nuqtai nazarlar ham bor. Masalan, A.P. Akifev va A.K. Grishanin yozishadi: tsiklopning genomini 94%, stilonixiyaning genomini 98% faqat jinsiy hujayralarning xususiy vazifalarini bajarishsa, qolgan qismi – boshqa funksiyalarni, ishonish qiyin.

Ortiqcha DNKning biologik ahamiyati to'g'risida taqlif etilgan gipotezalar noto'g'ri bo'lib chiqdi, chunki birinchidan ular somatik funksiyalariga asoslangan edi va ko'pincha genetik boshqarilishiga. Xromatinning diminutsiya hodisasi ortiqcha DNKning asl ahamiyati murtak hujayralari bilan chegaralangan bo'lishini aniq ko'rsatadi

A.P. Akifeva va uning kasbdoshlarini fikrlari bo'yicha, bu teskari fikr emas, murtak hujayralaridagi ortiqcha DNKning bajaradigan vazifasi bu turlarning alohidalanishida omil vazifasini bajaradi. Ortiqcha DNKning eng yaxshi o'rganilgan qismi geteroxromatindir. Xromatinning diminutsiyasi to'g'risida va yuqorida aytib o'tilgan ma'lumotlar asosida olimlar geteroxromatinning asosiy vazifasi murtak yo'lining hujayralari bilan chegaralangan degan xulosaga kelishadi. Kodlamaydigan qismlarning molekulyar tuzilishida qancha ko'p farqlar bo'lsa, shuncha duragaylarning gomologlarida konyugatsiya jarayonini buzilish xavfi yuqori bo'ladi. Toq ko'zning ayrim turlarini ajratish qiyin, chunki ularning noyob genlari bir biriga juda o'xshash. Lekin, egoistik DNK orasidagi farqlar yaqin turlar orasida duragaylarning hosil bo'lishiga to'sqinlik qiladi. Ushbu ma'lumotlar ortiqcha DNKning evolyutsion ahamiyatini tasdiqlaydi.

Xromatinning diminutsiyasi genetik nazoratda bo'lishi aniq. Nazoratning har bir etapi tahlilni qilgan olimlar, infuzoriyalarda uchun Dj. SHapiro, tsikloplar uchun - S. Beerman i A. Akifev va ularning kasbdoshlari, shuni ko'rsatdiki diminutsiya jarayonini amalga oshirish uchun bir qancha genlar ishtiroq etishi kerak.

TSikloplarning har xil turlari orasidagi morfologik tuzilish farqlari juda kam bo'lishi sababli ularni ajratishi xromatinining diminutsiyasiga asoslanish qulayroq bo'ladi.

Poliploidizatsiyadagi genomning reorganizatsiyasi. O'simliklarning mitotik xromosomalarini poliploidizatsiya jarayonida razmerlarini kichrayish holati allaqachon aniqlangan, masalan, L.N. Delone 1926 yilda piyozdoshlar oilasiga mansub bo'lgan vakillarida, YA.SHarmoy - ayrim bir pallali o'simliklarda, A.Bebkon o'simliklarning Crepis avlodida Xromosomalarning razmerini kamayishi geksaploid davridan boshlanishi Poa avlodiga kiruvchi ayrim turlarida.

Ayniqsa ko'zga tashlanadigan farqlar tut o'simligining kariotipida S.I. Radjabli olim tomonidan aniqlangan. Diploid va tetraploid xromosomalar to'plamiga ega bo'lgan o'simliklarda xromosomalarning katta-kichikligi o'zgarmagan edi, miqdori ko'paysa ham. Xromosomalar miqdori yanada ko'payganda xromosomalarning razmeri kichiklashib boradi. Masalan, 308-xromosomal shaklida Morus nigra ning xromosomalarini razmerlari keskin kichiklashadi. Faqat razmerlari o'zgarib qolmasdan balki shakllari ham o'zgarar ekan. Xromosomalar yumaloqlashib boradi, xatto ko'pchiligi dumaloq shakliga keladi. SHu sababdan A-guruhiga kirgan ikki elkali xromosoma ko'rinmay qoladi. Tut o'simligida ham xromosomalarning kichrayishi geksaploid to'plamiga ega bo'lgan shaklidan boshlanadi.

Tsitofotometrik usuli yordamida tutning genom va har bitta alohida poliploid shakllaridagi xromosomalarning DNK miqdori aniqlanishi natijasida xromosomalar diploid to'plamidan tetraploid to'plamigacha ko'payganda DNK miqdori ham xromosomalar soniga karra oshib boradi. Lekin 308-xromosomal shaklida Morus nigra ning xromosomalarning miqdori 11 marta oshganiga qaramay, DNK miqdori faqat 4 marta ko'paygan. Har bitta xromosomadagi DNK miqdori tekshirilgan tutning di-, uch- va tetraploidlarida bir xil bo'lsa,

22-ploidli shaklida esa ($2p = 308$) bunday ko'rsatgichlar uch barobar kam bo'ladi, kam ploidli turlarga nisbatan

12- va 13-ploidli gibridlarda bitta xromosomadagi DNK miqdori faqat 2 marta kamaygan xolos, kam ploidli turlarga nisbatan.

Ushbu ma'lumotlar asosida xulosa qilish mumkin: evolyutsiya jarayonida *Morus* avlodida genom tuzilishini keskin o'zgarishi natijasida xromosomalar soni oshsa ham, DNK miqdori keskin kamayadi.

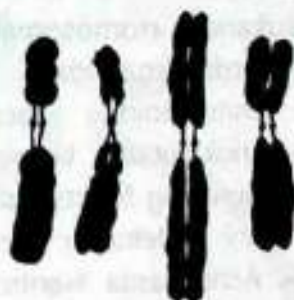
TSentromeraning tuzilishi. TSentromera — eukariotik xromosomaning maxsus joyi bo'lib, hujayraning mitoz va meyoza bo'linishlarida fundamental vazifa bajaradi: hosil bo'lgan qiz xromatidalarni (bo'lajak qiz hujayralarining xromosomalari) ikkita qarama-qarshi qutblarga yo'nalishini va joylashishini ta'minlaydi. Bu jarayonda xatoliklar kam kuzatiladi. Masalan, achitqilarda xromosomalarning ajralmaydigan holati 10-5 yoki undan ham kam uchraydi. Odamda bu ko'rsatgich yuqoriroq bo'ladi, lekin ajralmagan xromosomalari bo'lgan zigotalar ko'pincha haloq bo'ladi

Xromosomalar ajrashmasligi mumkin agarda tsentromera o'z vazifasini bajarmagan holda.

TSentromeraning aniq ko'rish mumkin xromosomalar mitoz bo'linishiga tayyorlanishini boshlangich davrlarida. TSentromera ikkita tsilindrik shakldagi tanachalar – tsentriolalarga ajraladi. TSentriolalar asta sekin ikkala qarama-qarshi qutblarga qarab harakatlanadi. TSentriolalar orasida maxsus asosli bo'yoqlar bilan bo'yalmaydigan ipchalar – axromatin ipchalar deb nomlangan bo'linish dukning iplari paydo bo'ladi. Ular ikkala tsentriolalarni o'zaro bog'laydi. Bo'linishning profaza davrida, xromosomalar shakllanib borishi bilan tsentromera ham shakllanib boradi, ya'ni bo'linish dukni hosil qiladi. Xujayra metafaza davriga kelganda xromosomalar to'liq shakllanadi va bo'linish dukning shakllanishi ham tugaydi: ikkita tsentriolalarni birlashtirib turgan axromatin ipchalardan tashqari, yana bir guruh ipchalar paydo bo'ladi va har bitta xromosomaning tsentromerasiga kelib birikadi. Hujayra anafaza davriga kelganda ikkinchi guruh ipchalar qisqarib boradi va xromatidalarni ikkala qutbga, tsentriolalar joylashgan joyga olib boradi. Ona xromosomalarning xromatidalarini bir biridan ajralishi ularning orasida itarish kuchlarini paydo bo'lishidan boshlanadi, so'ng bo'linish dukning ipchalari qutblarga

tortib ketadi. Bu jarayon mitoz va meyozning 2-anafazasida kuzatiladi. Meyozning 1-chi bo'linishining anafazasida bivalent hosil qilgan gomologik xromosomalarning tsentromeralari birinchi bo'lib bir biridan ajraladi, natijada ikki qarma-qarshi qutblarga xromatidalar emas, balki butun xromosomalar tortiladi. Tsentromera metafazada turgan xromosomada bo'yalmagan qism bo'lib ko'rinadi. Tsentromera joylashgan joyda xromosomaning ikkala xromatidalarini birikkan qismi bo'lib, xromosomani ikki elkaga bo'ladi va birlamchi belbog' deb nomlanadi (rasm 42).

Ayrim o'simliklar va hayvonlar turida politsentrik va diffuz joylashgan tsentromaralarga ega bo'lgan xromosomalar uchraydi. Bunday tuzilishga ega bo'lgan xromosomalar *Luzula purpurea* turida, chayon, hasharotlilarning yarim qattiq qanotlar turkimining ayrim vakillarida va askarida *A. Megalocephala* murtak yo'lini hujayralarida.



43- Rasm. *Acrididae* spermatogoniyalaridagi xromosomalarning tsentromera hududlari

Bo'linish o'qining iplari bunday xromosomalarning yuzasiga butun uzunligi bo'ylab joylashgan bo'ladi. Anafaza davrida qiz xromosomalar qutblarga bir biriga parallel xolda to'g'ri tayoqchalar shaklida tarqaladi. Rentgen nurlari ta'sirida bunday xromosomalar fragmentlarga ajralib ketadi va har biri tsentromera hosil qilib, normal xromosoma vazifasini bajaradi.

Tsentromerada kinetoxor deb nomlangan tsentromera rayoni bilan kontakt hosil qilgan tuzilma bo'lib, unga bo'linish dukining iplari-mikronaychalar birikadi. SHakllangan kinetoxor metafaza davrida turgan xromosomalarda uch qavatli plastinka shaklida bo'ladi. Ichki qavatining qalinligi 40-60 nm, och bo'yalgan o'rta qavati taxminan 25-30 nm va tashqi qavati-40-60 nm dan tashkil topgan bo'ladi.

Kinetoxorning ichki qavati xromatin iplarini yonida joylashadi va tsentromeraning xromatini bilan o'zaro bog'lanadi.

Ingichka xromatin ipchalari kinetoxorning o'rta qavatidan o'tgan bo'lishi tufayli tashqi va ichki qavatlari bilan bog'lanadi. Kinetoxor bilan bog'langan mikronaychalar tashqi qavatida tugaydi va kamdan kam o'rta va tashqi qavatigacha cho'ziladi. Mikronaychalardan tashqari kinetoxorning tashqi qavatida "tivitli sirt" yoki fibrillalardan (ipchalar) tuzilgan halqalar shaklidagi toj joylashadi. Mitozning ohirida kinetoxor maxsus tuzilma shaklida yo'qoladi.

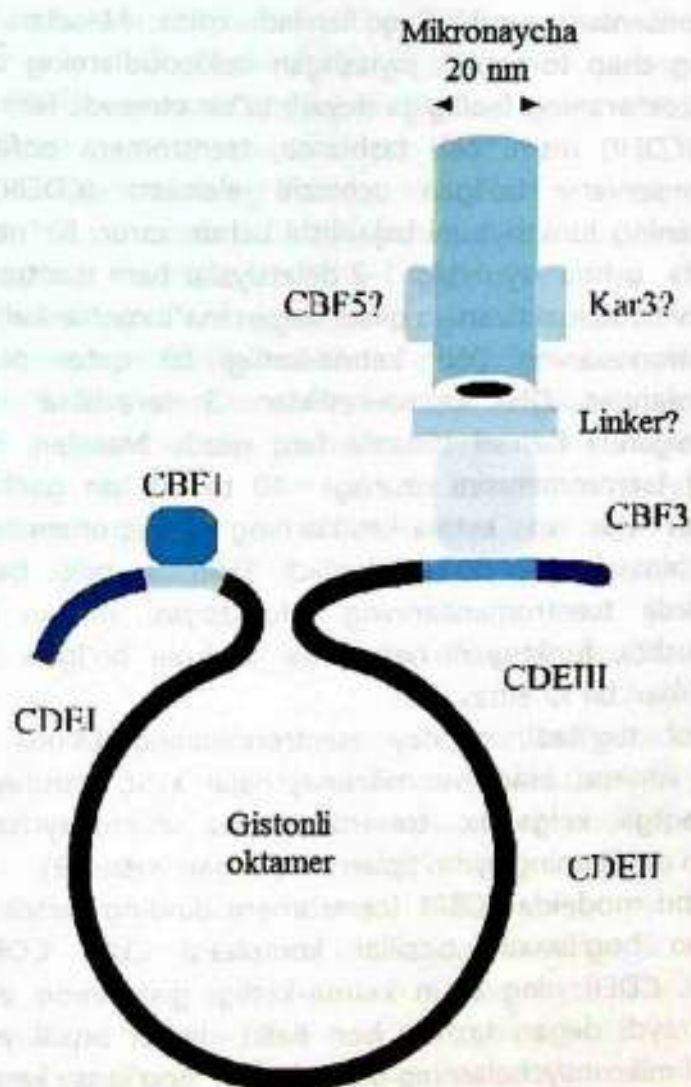
Molekulyar-biologik nuqtai nazardan kinetoxorning tuzilishi yaxshi o'rganilmagan. Lekin, kinetoxor tarkibida DNK, DNK-bog'lovchi oqsillar, balki RNK va tubulin bo'ladi. Sut emizuvchilarning xromosomasini DNK-aza fermenti bilan ishlov berilganda, kinetoxor plastinkasi o'ziga xos kondensatsiyalanadi, lekin RNK-aza ning ta'sirida kinetoxor o'zgarmaydi.

Xozirgi vaqtda eukariot xromosomalarning tsentromerasini tuzilishi faqat ayrim ob'ektlarda o'rganilgan.

1980 yillarda achitqilarning *Saccharomyces cerevisiae* tsentromeralarida shunday nukleotidlar ketma-ketliklari aniqlangan-ki, ularning delesiya tsentromeraning funksiyasini yo'qolishiga olib kelar ekan, natijada tsentromerani molekulyar darajasida joylashgan joyini aniqlash mumkin bo'ladi. Achitqilarda tsentromera rayonlari CEN (centromere so'zidan olingan) rayonlari deb nomlanadi, yoniga xromosomaning raqami qo'yiladi. Har xil xromosomalarning tsentromeralarini tuzilishi tahlil qilinganda kuyidagi qonuniyatlar aniqlandi: barcha xromosomalarning tsentromeralari shu turdagi achitqilarda duragaylar hosil qilar ekan, demak ular gomologlar bo'ladi. Achitqilarning genomi to'liq sekvenirlangan bo'lib aniqlandi, barcha 16ta xromosomaning tsentromera rayonlarida konservativ domenlarning CDEI (centromere DNA element I), CDEII va CDEIII mavjudligi (borligi). Hamma tsentromeralar o'xshash tuzilishga ega va bir xil vazifa bajarsa ham, ularning nukleotidlar ketma-ketliklari to'liq identik emas.

CDEI deb nomlangan element tarkibida ko'pincha 7ta konservativ nukleotidlar TCACATG bo'ladi. Keyin 76-86 pn (nukleotidlar soni har xil xromosomalarda har xil) nukleotidlar ketma-ketliklardan tashkil topgan CDEII — fragment joylashadi.

Nukleotidlarning ketma-ketliklari xromosomalarda farq qilsa ham, A-T-juftlar miqdori hammasida 90 % oshmaydi (93-94 %).



Rasm 44. Achitqilarning kinetoxor tuzilishini gipotetik iodeli

CDEIII element 25 pn nukleotidlar ketma-ketliklaridan tashkil topgan bo'ladi, lekin, G-----G-----CCGAA-----ketma-ketliklar barcha 16 ta xromosomalarda ham bo'ladi.

Achitqilarning tsentromeralarini o'zida saqlagan plazmidalarda olimlar deletsiyalar hosil qilib aniqlashadi, CDEI—III rayonlar mitoz

jarayonini avtonom replikatsiyalanuvchi plazmidaning (ARS) ketma-ketligini stabil holatda saqlash uchun zarur. Tsentromeralarning funksiyasi bajarilish uchun butun elementlar kerak emas, faqat ularning konsensus guruhlari qo'llaniladi xolos. Masalan, beshta I elementning chap tomonida joylashgan nukleotidlarning deletsiyasi CENII tsentromeraning faolligiga deyarli ta'sir etmaydi, lekin A-T boy bo'lgan (CDEII) qismi olib tashlansa, tsentromera nafaollashadi. YUqori konservativ bo'lgan uchinchi element (CDEIII) ham tsentromeraning funksiyasini bajarilishi uchun zarur. Bir necha ilmiy maqolalarda ushbu rayondagi 1-2 deletsiyalar ham tsentromeraning funksiyasini to'liq inaktivatsiya qiladi degan ma'lumotlar keltirilgan.

Tsentromeraning DNK ketma-ketligi bir qator organizmlar uchun aniqlangan. DNK ketma-ketliklar *S. cerevisiae* turida va umuman olganda har xil turlarda farq qiladi. Masalan, *S. pombe* achitqining tsentromerasini uzunligi 40 to 80 tpn gacha boradi, nukleotidlari har xil ketma-ketliklarning taqrorlanishlar bilan murakkab almashingan bo'ladi. SHunday qilib, barcha tirik organizmlarda tsentromeralarning funksiyasi bir xil bo'lishiga qaramay, ushbu funktsiyani bajarishga javobgar bo'lgan DNKning ketma-ketliklari bir xil emas.

Savol tug'iladi, qanday tsentromeraning DNKsi xromatin tuzilishida ishtiroq etadi va mikronaychalar kelib qanday birikadi. Xozirgi vaqtga kelganda, tsentromera va mikronaychalar bilan bog'langan oqsillarning ayrim tiplari aniqlangan (rasm 43).

Ushbu modelda CBF1 (centromere binding factor 1) motiv CDEI bilan bog'lanadi; oqsillar kompleksi CBF3 CDEIII bilan bog'lanadi. CDEII ning uzun ketma-ketligi gistonning oktamerini atrofini o'raydi degan taxmin bor. Balki linker oqsili yordamida CBF3 omili mikronaychalarning uchlari bilan bog'lansa kerak, degan ma'lumotlar keltirilgan.

7.5. V-xromosomalar yoki qo'shimcha xromosomalar.

V-xromosomalar yoki qo'shimcha xromosomalar deb struktura va funksiyalari jihatidan boshqa yadro xromosomalardan fark qiladigan xromosomalar bo'lib, xromosomalarning asosiy to'plamidan (A) tashqari kuzatilgan guruh xromosomalardir. V-xromosomalar

barcha tirik organizmning tana hujayralarida – somatik va jinsiy hujayralarda uchraydi.

V-xromosomalar ikki pallali o'simliklarning 510 turida (kariotiplari aniqlangan turlar ichida 2,6% tashkil qiladi) va bir pallali o'simliklarning 1007 turida (3,6%) aniqlangan. V-xromosomalar 263 tur hayvonlarda ham aniqlangan, shularning ichida 40%dan oshiqroq hasharotlardir.

V-xromosomalarning soni har xil individlarda o'ta o'zgarvchan, ko'pincha 1-2 xromosoma bo'ladi, kamdan-kam 6ta, xatto 12ga ham borish mumkin.

Olimlarning ko'pchiligi V-xromosomalar asosan geteroxromatindan tuzilgan deb ta'qidlaydi. Politen xromosomalari bo'lgan turlarda V-xromosomalar ham politeniyaga uchraydi. Tuzilishi jihatidan V-xromosomalar xilma-xil: ma'lum strukturaga ega bo'lmagan xromatinning . govak yoki kompakt palaxsalari shaklida bo'lishi mumkin. Ayrim hollarda uncha katta bo'lmagan yumaloq yoki cho'zilgan o'ta geteropiknotik tanachalar ko'rinishida bo'ladi. Ba'zan V-xromosomalar politen xromosomalarga oid bo'lgan disk (gardishsimon), puflar ko'rinishida bo'ladi va ko'pincha yadrochalar aniqlanadi.

Disk shaklidagi V-xromosomalar geteroxromatinni eslatadigan kompakt moddaning 1-2 yirik bloklari ko'rinishida bo'ladi.

V-xromosomalar geteroxromatinga boy bo'lishini kuyidagi faqtlar isbotlaydi: hujayra yadrosida yadro qobig'ining ichki membranasida joylashadi, ektopik kontaktlarda ishtiroq etadi, ko'pincha politeniyaga uchramaydi (geteroxromatinga xos bo'lgan xususiyat), S-xromatin bo'yoqlari bilan bo'yaladi va V-xromosomalarning fragmentlari kech replikatsiyalanadi.

V-xromosomalar ko'pincha satellit DNKlar bilan boyitilgan bo'ladi. Bunday taqrorlanishlarning oilalari faqat V-xromosomalarga xos bo'ladi yoki V-xromosomalarda ham, boshqa xromosomalarda ham uchraydi. Ko'pchilik olimlarning fikri bo'yicha, V-xromosomalar A-xromosomalardan kelib chiqqan: 1) har xil turlarning duragaylashishi natijasida; 2) A-xromosomalarning ayrimlarini bir biridan ajralmasligi va trisomiyalarning hosil bo'lishi tufayli.

Proto-V-xromosoma paydo bo'lganidan so'ng, unda joylashgan genlarning inaktivatsiyasi boshlanadi va deletsiyalar tufayli genetik

materialning bir qismi yo'qoladi, satelit DNK va mobil elementlar fiksatsiyalanali.

Nazorat uchun savollar

1. *Viruslarning irsiy moddasining tuzilishi.*
2. *Prokariot xromosomalarini tuzilishi.*
3. *Eukariot hujayralarining organoidlarini xromosomalarining tuzilishi*
4. *Achitqilarning xromosomalari va genomi.*
5. *Yuqori darajada tuzilgan eukariotlarning mitotik xromosomalari.*
6. *Euxromatin va geteroxromatin.*
7. *Telomeralar va telomerlarning getexromatini.*
8. *Xromatin va xromosomaning diminuitsiyasi.*
9. *Sentromeraning tuzilishi.*
10. *V-xromosomalar shchziga xos tuzilishi.*

8 BOB. XROMOSOMALARNING TUZILISHI VA TURLARI

Genning joylashish effekti. DNKning xromosomada joylashishi. «Lampa chyotkasiga» o'xshash xromosomalar. Politen xromosomalar.

8.1. Genom tizimida genning joylashgan joyini o'zgartirishi tufayli faolligini o'zgarishi.

Gen to'g'risida ma'lumotlar to'planganidan so'ng: irsiy informatsiyaning birlik bo'lib xisoblanishi, xromosomalarda ma'lum joyida joylashib va ma'lum vazifa bajarishi va h.k., genetiklar yana izlanishlarini davom ettirib, kuyidagi xulosalarga keladi – gen joylashgan joyini o'zgartirsa, uning faolligi ham o'zgarar ekan. Gen joylashish joyini o'zgarishi tufayli uning faolligini o'zgarishi joylashish effekti deb nomlanadi.

Birinchi marta joylashish effekti xodisasi genetika fanining asoschilaridan biri A. Stertevant (1925) tomonidan aniqlagan edi. Olim drozofila pashshasida izlanishlar olib borar ekan kuyidagi hodisaga e'tibor beradi: drozofilaning Bar geni teng bo'lmagan krossingover tufayli ikkala mutant alleli bitta xromosomaga tushib qoladi, natijada pashshalarning mutant fenotipini ekspressiyasi, ushbu allellar har xil gomologik xromosomalarda joylashganiga nisbatan o'zgarar ekan. Stertevant kuzatgan xodisa boshqa joylashish effektlardan farq qiladi, chunki mutant fenotip deyarli stabil holatda namoyon bo'ladi. SHu sababdan, bo'lajak nobel laureati E. Lyuis (1954) stabil joylashish effekti deb nomlaydi. Bunday tipdagi o'zgarishlarning xususiyatlari bo'yicha oddiy mutatsiyani eslatadi va tabiatda keng uchraydi, ayniqsa tajribalar amaliyotida. Masalan, 80-chi yillarda transpozon tarkibidagi white geni xromosomaning har xil joylariga biriktirishi tufayli, uning faolligi keskin o'zgarishi aniqlandi. SHunday qilib, barcha keltirilgan

misollar genning ekspressiyasi atrofidagi maxsus muhitga bog'liq ekanligini tasdiqlaydi.

1934 yilda N.P. Dubinin va B.N. Sidorov *cubitus interruptus* (ci) genining normal allelini tsentromeraning yonidagi joylashgan geteroxromatindan olib euxromatin rayoniga o'tkazilganda, dominant holatdagi allel o'zining dominantlik xususiyatini susaytiradi, demak gen normada joylashgan joyini o'zgartirsa, inaktivatsiyaga uchrar ekan. Bunday hodisa Dubinin effekti deb ataladigan bo'ldi.

Alohida hodisa bo'lib mozaik tipdagi joylashish effektini (MEP, ingliz abbreviaturasi bo'yicha — PEV) kuzatilishi. 1930 yilda G. Myoller ajoyib voqea kuzatadi: xromosomaning qayta qurilishida joylashgan va nurlanish ta'sirida hosil bo'lgan allel gen o'zining dominantlik holatini yo'qotadi, ya'ni geterozigotadan $R(g+)/g$ (R — xromosomaning qayta qurilishi, a g — gen) allel $g+$ kuzatilmaydi va individ mutant g -fenotipga ega bo'ladi.

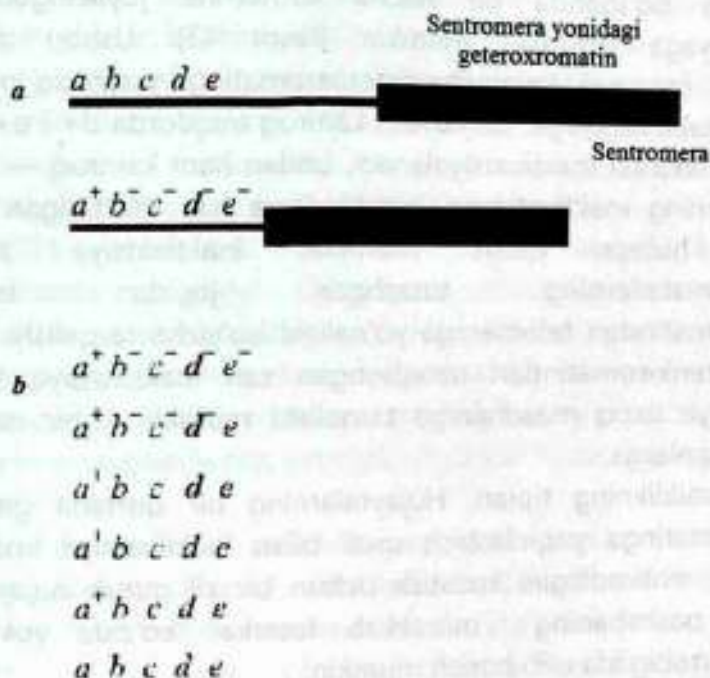
Myuller o'zi genetik inaktivatsiya hodisani kuzatadi, birinchidan, xromosomaning qayta qurilishi tufayli, ikkinchidan, gen tsentromeraga yaqin joylashgan geteroxromatinga o'tkazilishi kerak bo'lganda. Uchinchidan, genning yuzaga chiqishi mozaik tipda amalga oshadi, ya'ni ko'p miqdordagi bir xil hujayralarni tahlil qilganda, masalan, ko'p fasetkali ko'zning ommatidiyalari bir xil genotipga ega bo'ladi — $R(g+)/g$, bitta guruh hujayralarida mutant appel aniqlanadi, ikkinchida esa — normal allel bo'ladi.

Mozaik tipdagi joylashish effektining gen strukturasi. N.P. Dubinin va B.N. Sidorovlarning (1935) izlanishlari bo'yicha aniqlangan: mozaik tipdagi joylashish effektining geni yo'qolmas ekan, uning holati o'zgaradi xolos. Olimlar krossingover yorlamida xromosomaning qayta qurilishidan faollashmagan allelni ajratib olishadi, ya'ni tsentromera yonidagi joylashgan geteroxromatindan, natijada gen stabil normal fenotip hosil qiladi.

Keyinchalik 1938 yilda I.B. Panshin xromosomaning qayta qurilishlarini teskarisini hosil qilishadi, ya'ni geteroxromatindagi inaktiv holatda turgan genni dastlabki holatiga — euxromatinga o'tkazishadi, natijada gen faolligi tiklanadi.

Xromosomalarning qayta qurilishlarini ko'p miqdorda hosil qilish va ularning genetik inaktivatsiyasini indutsirlash ishlari natijasida aniqlanadi: mozaik tipdagi joylashish effekti kuzatiladi faqat eu- va

geteroxromatinning o'rtasidagi qayta qurilishlarda. Drozofilaning har qanday geni mos keladigan qayta qurilishi natijasida geteroxromatinga o'tkazilganda inaktivatsiyaga uchrashi mumkin, ya'ni mozaik tipdagi joylashish effektini boshidan kechiradi.



Rasm 45. Drozofilaning mozaik tipdagi joylashish effekti sharoitidagi genetik inaktivatsiyaning sxemasi:

a — geterozigotali genotip, bitta xromosomaning (rasmning yuqorisida) ipida mutang genlar (a dan e gacha) joylashgan, lekin odatdagi tartibda xromaning uchida, geteroxromatindan uzoqlashgan joyda, ikkinchi xromosoma (pastda) tarkibida ushbu genlarning normal allellari joylashgan, ammo ular geteroxromatin atrofiga o'tkazilgan bo'ladi, demak inaktiv holatga o'tishi mumkin; b — genlarning yuzaga chiqishi. Agarda genlarning bittasi ham inaktivatsiyaga uchramasa, pashshaning fenotipi kuyidagicha bo'ladi: a+ b+ c+ d+ e+, agarda gen e inaktiv holatda bo'lsa — geteroxromatinga yaqin joylashgani fenotipi bo'ladi a + b+ s + d + e, agarda ikkita yaqin joylashgan genlar: d w e inaktiv bo'lishsa fenotipi bo'ladi — a+ b+ d e vah.k. Agarda bitta zanjirdagi barcha genlar inaktiv bo'lsa, pashshaning fenotipi to'liq mutant bo'ladi: a b s d e

Inaktivatsiyaning tarqalishi. Individlarning bitta xromosomasida genlarning mutant allellari bir biriga yaqin joylashgan bo'lsa (a - e), boshqasida — ularning normal allellari, lekin geteroxromatinga o'tkazilgan bo'lganda bir necha ketma-ket joylashgan genlar inaktivatsiyaga uchrashi mumkin (rasm 43). Ushbu zanjirdagi genlardan (a+ - e+) ko'pincha geteroxromatinga yaqinroq joylashgan e+ geni inaktivatsiyaga uchraydi, kamroq miqdorda d+ i e+ genlari, birdaniga ikkalasi inaktivatsiyalanadi, undan ham kamroq — s+, d+ i e+ genlarning inaktivatsiyasi kuzatiladi va h.k. Keltirilgan misollar asosida huloqa qilish mumkin: inaktivatsiya zu- va geteroxromatinlarning tutashgan joyidan boshlanib geteroxromatindan telomeraga yo'nalishi bo'yicha tarqalishi mumkin ekan. Geteroxromatindan uzoqlashgan sari inaktivatsiya susayadi. Inaktivatsiya uzoq masofalarga tarqalishi mumkin — bir necha o'n santimorganlarga.

Mozaiklikning tiplari. Hujayralarning bir qismida genlarning geteroxromatinga yaqinlashish usuli bilan inaktivatsiya hosil qilish (mozaiklik) ehtimolligini kuzatish uchun bir xil guruh hujayralarida, masalan, pashshaning murakkab fasetkali ko'zida yoki uning kutikulyar qobig'ida olib borish mumkin.

Gen inaktivatsiyaning darajasi. Uzoq vaqtlar davomida normal funktsiyani buzilishi qaysi darajada kuzatilishi to'g'risida muhokamalar olib borildi. Ma'lum bo'ldi-ki, mozaik tipdagi joylashish effektida gen strukturasi buzilmas ekan. Bundan tashqari, mutant fenotipga ega bo'lgan hujayralarda inaktivatsiyaga uchragan genning transkriptlarini miqdori kam va uning oqsil maxsuloti ham kam bo'lishi aniqlangan. Demak, joylashish effekti deganda, birinchi navbatda gap transkriptsiyaning inaktivatsiyasi to'g'risida ketadi. Buning bevosida dalili bo'lib yaxshi o'rganilgan genlar transformatsiyasi tajribalarini natijalari xizmat qiladi. Masalan, drozofilalarning shunday liniyalari hosil qilindi-ki, ularda issiqlikda shokga olib keluvchi gen hsp26 euxromatin yoki geteroxromatinga o'tkazilgan edi. Euxromatinga o'tkazilganda gen hsp26 normal funktsiya bajargan edi va issiqlik shokning induktsiyasiga javob bergan, lekin, geteroxromatinga o'tkazilganda issiqlik shokga transkriptsiyal javobi nafaol edi.

Joylashish effektida xromosomaning inaktivatsiyaga uchragan gen joylashgan qismi kompakt holatiga keladi. Ushbu jarayon drozofilaning lichinkalarini so'lak bezlari politen xromosomalari bor hujayralarida kuzatilgan. Xromosomaning materiali zichlanadi, o'ta bo'yaladi, disklar qo'shilib, euxromatin bilan geteroxromatinkontak hosil qilgan joydan boshlab, bitta zich blokni hosil qiladi.

Kompaktizatsiya katta masofalarga tarqalishi mumkin, masalan, politen xromosomalarning 170 diskligacha. Drozofilaning politen xromosomalari bitta diski o'rtacha 30 tin ga teng bo'lsa, inaktivatsiyaga uchragan masofa 5000 tin ga etadi.

1991 yilda E.S. Belyaeva noyob voqea kuzatadi - geteroxromatin yaqiniga o'tkazilgan xromosomalar qismlarining uzulib-uzulib inaktivatsiyasiga uchrashi. Demak, genlar bir tartibda inaktivatsiyaga uchramas ekan, e dan boshlab k a gacha (rasm 44), balki uzuq-uzuq bo'lib, masalan, e+ d s+ b a+ yoki e d s + a va h.k., xromosoma darajasida esa, kompakt rayonlar odatdagi rayonlar bilan almashinadi.

Agarda uzuluksiz inaktivatsiyani oson tasavvur qilish mumkin bo'lsa, geteroxromatindan qandaydir "inaktivatsiyani hosil qiluvchi signal" chiqib butun xromosoma bo'ylab tarqaladi, uzuluqli kompaktizatsiyada esa, qandaydir noma"um mexanizm tufayli "inaktivatsiyani hosil qiluvchi signal" hatlab o'tishga imqoniyat yaratadi deb o'ylash mumkin.

Kompaktizatsiya tufayli xromosomalarning avvalgi euxromatin rayonlari geteroxromatinga xos bo'lgan xususiyatlarga ega bo'lib qoladi: ular kech replikatsiyaga uchraydi va ektopik kontaktlar hosil qiladi. Politen xromosomalarning kompakt rayonlarida DNK to'liq replikatsiyalanmaydi, go'yo tsentomeraga yaqin joylashgan geteroxromatinga o'xshab. Kompakt xromatin bloklarida geteroxromatinning struktura komponenti bo'lmish NR-1 oqsili aniqlanadi. Natijada avvalgi xromosomaning euxromatin uchastkasi geteroxromatinga aylanadi, ya"ni geteroxromatinizatsiyalanadi.

Haroratga sezuvchanlik davri embrional taraqqiyotning dastlabki davrilarga to'g'ri keladi, ya"ni xromosomalarda geteroxromatin tsitologik tuzilma (struktura) shaklida aniqlanishini boshlanishiga.

Kompaktizatsiya jarayoni joylashish effektining genetik inaktivatsiyasiga xos bo'lga uchta xususiyat ega: 1) mozaiklik, ya'ni bitta hujayrada xromosoma qismi kompakt holatda bo'lsa, boshqa qo'shni hujayrada normal euxromatin tuzilishiga ega; 2) eu- va geteroxromatin kontakt hosil qilgan joyidan boshlab butun xromosoma bo'ylab tarqalishi; 3) uzulukli tarqalish imqoniyatiga ega.

Joylashish effektining modifikatorlari. Mozaik fenotipning yuzaga chiqish darajasiga bir nechta omillar ta'sir etadi. Masalan, past harorat (14-18°S, drozofilaning normal taraqqiyoti odatda 25°S o'tadi) genetik inaktivatsiyani keskin kuchaytiradi, natijada bo'yalmagan fasetkalarning sektorlari kattalashadi, xromosomalardagi kompakt uchastkalar cho'ziladi.

Joylashish effektining yuzaga chiqishiga genomdagi geteroxromatin miqdori ham ta'sir etadi. Geteroxromatinning miqdorini o'zgartirish Y- xromosomada kuzatish oson, chunki bu genomning eng katta geteroxromatin blokidir, bundan tashqari, odatdagi duragaylash usullari bilan Y-xromosomani genomdan olib tashlash yoki kiritish mumkin.

Y-xromosoma olib tashlanganda (erkaklarining genotipi X0), genetik inaktivatsiya kuchayadi. Qo'shimcha kiritilgan geteroxromatin (XYY) inaktivatsiyani susaytiradi. Demak, genomdagi Y-xromosomaning miqdori joylashishi effektining kuchli modifikator vazifasini bajaradi.

Bundan tashqari, hozirgi vaqtda bir qancha genlarning mutatsiyalari genetik inaktivatsiyani kuchaytirish yoki susaytirish mumkin ekanligi aniqlangan, ya'ni joylashish effektining modifikatorlari hisoblanadi.

Dominant kuchaytirishlarning hosil qilish uchun quyidagi sxema bo'yicha olib boriladi: (enhanserlar — enhancers, Ep) va susaytirishlarni (supressorlar suppressors, Su) (rasm 45). Tajribalar uchun xromosomalari qayta qurishlariga ega bo'lgan urg'ochi pashshalar mutang zrkaklari bilan chatishtiriladi. Urg'ochi pashshalarda genlar joylashishi effekti kuchli rivojlanmagan bo'ladi, masalan, $ln(l)Wm4$ kuchsiz w geni bo'yicha mozaiklik xususiyatiga ega indivilar. Agarda enhanser mutatsiya indutsirlangan bo'lsa, avlodlar orasida ko'zining mutant sektori keskin ko'payaygan individlar paydo

bo'ladi, supressor mutatsiyalar indutsirlangan bo'lsa, bo'yalmagan fasetkalar miqdori, teskarisi, sezilarli darajada kamayadi.

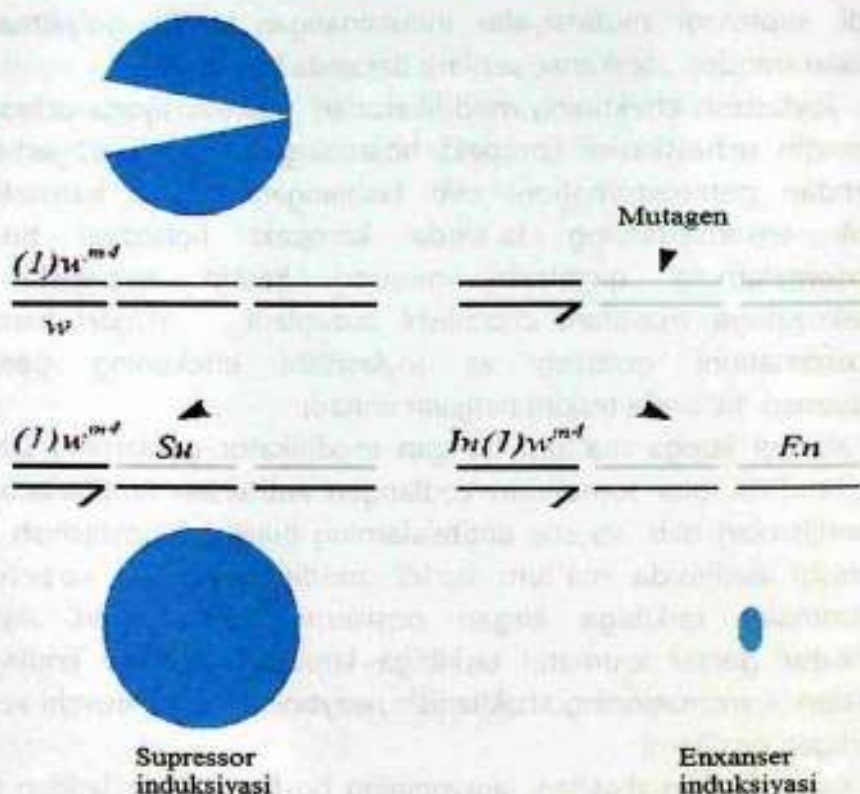
Joylashish effektining modifikatorlari inaktivatsiyaga uchragan eukromatin uchastkasini kompakt holatining darajasini o'zgartiradi. Genomdan geteroxromatinni olib tashlanganda, past harorat va genetik enxanserlarning ta'sirida kompakt holatdagi turgan xromosomalarning qismlarini miqdori keskin ko'payishi va kompaktizatsiya masofani cho'zilishi kuzatiladi. Yuqori harorat, geteroxromatinni qo'shish va joylashishi effektining genetik supressorlari ta'sirida teskari natijalar olinadi.

Xozirgi kunga ma'lum bo'lgan modifikator genlarning DNKsi klonlashtirilishi, ular tomondan kodlangan antitelalar (antitanachalar yoki antijismlar) olib va shu antitelalarning hujayrada joylashish joyi aniqlanishi natijasida ma'lum bo'ldi: modifikatorlarning ko'pchiligi xromosomal tarkibiga kirgan oqsillarni kodlar ekan. Ayrim modifikator genlar xromatin tarkibiga kiruvchi oqsillarni kodlaydi, boshqalari – xromatinning shakllanish jarayonida boshqaruvchi rolini bajaradigan oqsillarni.

Xromatinning shakllanish jarayonining boshqarish usullaridan biri gistonlarning modifikatsiyasidir, ya'ni ularning atsetillashishdir. Demak, gistonlarning atsetillashish jarayonini kuchaytirgan mutatsiya joylashish effektining yuzaga chiqishini susaytirishi kerak.

Oqsillarni modifikatsiyalovchi fermentlar va DNK replikatsiyasini amalga oshiruvchi omillardagi mutatsiyalar mozaik tipdagi joylashish effektini susaytirish yoki kuchaytirish xususiyatga ega bo'ladi. *S. cerevisiae* achitqisida multisubbirlik kompleks oridjina replikatsiyasi (ORC)

DNK replikatsiyasi uchun ham, mating type (MAT) inaktivatsiyasi uchun ham zarur. ORC ning subbirliklaridagi mutatsiyalarning effektlari har xil bo'lgan sababli ORC va replikatsiyaning boshlanishi bir biriga bog'liq emas. Drozofilada ORC2 ning subbirliги geteroxromatinda joylashgan bo'ladi, defektlari MEP ni susaytiradi. Achitqilar va drozofilada genlar inaktivatsiyasiga bir xil oqsil ishtiroq etishi sababli saylensing mexanizmi yuqori konservativ deb hisoblash mumkin



46- Rasm. Joylashish effektining enxanser va supressorlar hosi qilish uchun duragaylashning sxemasi.

Va nihoyat, mozaik tipdagi joylashish effektiga jiddiy ta'sir etadi xromatin oqsillarini kodlovchi genlar. NR1 oqsili, Su(var)2-5 geni bilan kodlangan, va SU(VAR)3-7 oqsili geteroxromatinning tuzilish bloklaridir. yavlyayutsya strukturnymi blokami geteroxromatina. Ushbu oqsillarning birortasini yo'qolishi MEP ning supressiyasiga olib keladi.

Euxromatinni shakllanishiga zarur bo'lgan oqsillarning kamayishi MEP ning kuchayishiga olib keladi. Misol qilib dekompekt holatdagi faol xromatinni shakllanishida muhim rol bajaradigan, gen trithorax like bilan kodlanadigan GAGA-omil oqsilini olish mumkin.

Enxanser va supressorlarni tekshirishlari natijasida aniqlanadi, bitta gen ham enxanser, ham supressor bo'lishi mumkin. Hamma gap genning dozasida. Bunday vokeani tushuntirish mumkin agarda xromosoma materialini kompakt va dekompekt holatga keltiradigan oqsil mavjud bo'lsa. Ikkita dozada bo'lsa, ular o'ziga xos vazifalarini bajaradi, ya'ni ma'lum darajada kompaktizatsiya va

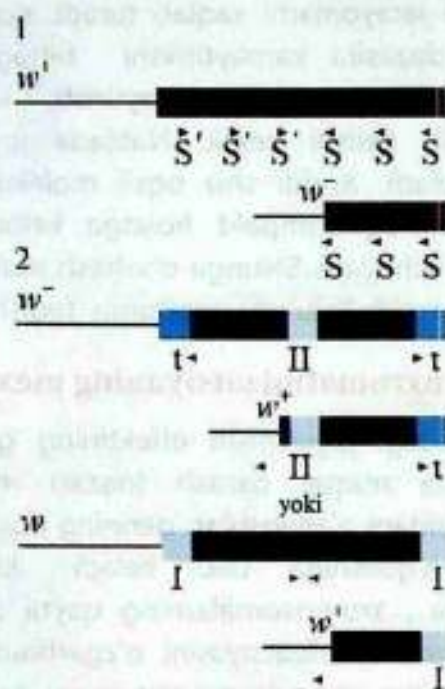
dekompaktizatsiya jarayonlarni saqlab turadi. Kompaktizator – oqsil molekulalarining dozadini kamaytirilishi bittagacha xromosoma qismining kompaktizatsiyasini susaytirish va gen faolligini kuchaytirishga olib kelishi kerak. Natijada joylashish effektining supressiyasi kuzatiladi. Xuddi shu oqsil molekulalar uchta dozada xromatinning kuchliroq kompakt holatga keltiradi va shu tufayli joylashish effekti kuchayadi. SHunga o'xshash mulohazalar xromatinni dekompankt holatiga olib keluvchi oqsillarga tegishli.

8.2 Geteroxromatinizatsiyaning mexanizmlari.

Mozaik tipdagi joylashishi effektining genetik inaktivatsiya mexanizmiga ikkita nuqtai qarash (nazar) mavjud: birinchidan, xromatin strukturasiidagi o'zgarishlar genning boshqaruvchi omillarga sezuvchanligini yo'qolishiga olib keladi, ikkinchidan, boshqa olimlarning fikricha , xromosomalarning qayta qurilishlari hujayra yadrosining kompartmentalizatsiyasini o'zgartiradi. Ikkinchi nazariya bo'yicha xromosomalar yadroda maxsus joyini egallaydi va saylesing va transkripsiya omillari yadroda notekis tarqalgan bo'ladi. SHu sababdan genni yadroning bitta joyidan ikkinchi joyiga ko'chirilsa uning faolligiga ta"sir etish mumkin.

Kompartmentalizatsiya to'g'risidagi fikrlar tasdiqlanishi mumkin xromosoma qayta qurilishlar va transpozonlarni qo'llanish tajribalarining natijalari asosida. Masalan, transpozonga kiritilgan white+ gen, to'rtinchi xromosomaning telomer rayonida joylashgan bo'lib, o'ta nafaol bo'ladi. Lekin, agarda translokatsiyani qo'llab, to'rtinchi xromosomaning uchida joylashgan materialni uzunroq ikkinchi xromosomaning uchiga o'tkazilsa , ya"ni geteroxromatindan uzoqroq masofaga o'tkazilsa, white+ genining nafaoligi ancha susayadi. Xromosomaning qayta qurilishi tufayli o'tkazilgan genga geteroxromatin nafaol ta"sir etadi, degan gipotezalar keng tarqalgan.

Nima sababdan geteroxromatinga o'tkazilgan gen tufayli xromosoma qismi kompaktizatsiyaga uchraydi va natijada genning inaktivatsiyasi kuzatiladi. K. Tartofa va kasbdoshlarining gipotezasi javobga yaqinroq keladi (rasm 46). Model bo'yicha geteroxromatinning 1 bloki DNK ning ketma-ketliklaridan tuzilgan bo'lib asosan geteroxromatinlardir.



Rasm 47. Mozaik tipdagi joylashish effektining genlar inaktivatsiyasini modellari.

Shu bilan birga ular bir birga qarama-qarshi yo'nalishgan va bir birini tenglashtiradi. Agarda w^+ geni ularga o'tkazilganda, u kompaktizatsiya jarayonini geteroxromatinning bitta domeni bilan birga o'tadi. Lekin, olimlarning o'zini fikri bo'yicha, ushbu model qanday qilib nafaollashish jarayoni uzoq masofalarga – politen xromosomalarning bir necha o'n disklarigacha tarqalishini tushuntirmaydi.

Alternativ bo'lib model 2 hisoblanishi mumkin, lekin shu model bo'yicha geteroxromatinning domenlarini chetlari chegaranlangan bo'lishi kerak.. Ular boshlanishi mumkin initsiatsiya saytlaridan (I), terminatsiya saytlari bilan tugaydi (t). Ikkala saytlarni orasida joylashgan DNK kompaktizatsiyaga uchraydi va natijada xromosoma qismi geteroxromatinga aylanadi. Ushbu modelni variantlaridan biri – terminatorlarni bo'lmasligi, agarda initsiatsiya saytlari bir birga qarama-qarshi yo'nalishgan bo'lsa (rasm 46). Kompaktizatsiya initsiatorlardan boshlanib xromosomaning euxromatin qismiga o'tadi.

SHunday qilib, joylashish effekti —bu nafaol holatda turgan geteroxromatinni xromosoma qayta qurishi tufayli euxromatinga o'tishiga aytiladi. Demak, tsentromeraga yaqin joylashgan geteroxromatinni nafaol holati va joylashish effekti tufayli euxromatinnin geteroxromatinga aylanishining sabablari umumiy, ya"ni birxil. Hozirgi kunga kelib, ko'pchilik olimlar tomonidan kuyidagi tasavvur qabul qilingan: tsentromeraga yaqin joylashgan nafaol superkompakt holatdagi geteroxromatin murakkab oqsil komplekslari bilan ta"minlanadi.

Ushbu komplekslar nafaollik "markazlarda" shakllanadi, ya"ni ushbu oqsillar bilan bog'lanish o'ta yuqori imqoniyatga ega bo'lgan DNKning ketma-ketliklarida (taxminan, chunki "markazlar" hali aniqlanmagan va xususiyati noaniq), so'ng kooperativ effekt tufayli (birinchi oqsil molekulalarning birikishi boshqalarini birikishini kuchaytiradi va h.k.) kristallar kabi o'sadi. Natijada multimer kompleksi (har xil oqsil molekulalardan tashkil topgan) uzoq masofalarga tarqalib, xromosoma ipini nafaol bloklarga joylashtiradi — geteroxromatin domenlariga. SHu model bo'yicha joylashish effektidagi genetik nafaollikning tushuntirish juda oson: xromosoma qayta qurilishi domen chegarasida DNKni yirtadi va kompaktizatsiya o'tayotgan joyga genni o'tkazadi. Kompaktizatsiya jarayoni initsiatordan boshlanib xromosomaning euxromatin qismiga o'tadi. Euxromatin bilan geteroxromatin o'rtasidagi odatdagi chegara bo'lmasligi tufayli kompaktizatsiya yangi euxromatin qismiga (qo'shni euxromatin qismi) tarqaladi. Bu sxemada gipotetik fikrlar ko'p, chunki inaktivatsiya markazlar va terminatorlar maxsus ketma-ketliklar shaklida aniqlanmagan. Lekin, bunday tuzilmalar bo'lishi bevosita kuyidagi faktlar bilan tasdiqlanadi: hamma qayta qurilishlar ham joylashishi effektini hosil qilmaydi.

YAdrodagi geteroxromatin miqdorini o'zgarishi qanday qilib genlarning nafaolligiga va xromosomalar kismlarining kompaktizatsiyasiga ta"sir etadi?

Geteroxromatin materialini joylashtirishida kompakt hosil qiluvchi oqsillar muhim rol bajaradi. Genomdan Y-xromosomani olib tashlansa (ya"ni geteroxromatinni katta qismini) kompaktizatsiya oqsillarini etarli darajada saqlamaydi, ya"ni bog'lovchi nishonlarni, tsentromeraga yaqin joylashgan geteroxromatinnini zichroq

joylashtiriladi va u bilan birga birikkan eukromatin qismini. Hozirgacha noaniq, nima sababdan ushbu jarayonlar mozaik shaklda amalga oshadi, ya'ni ikkita yonma-yon joylashgan hujayralarda joylashish effekti mozaik tipida bo'lsa, ikkinchisida esa, bunday joylashish effekti kuzatilmaydi.

Geteroxromatinning shakllanishi to'g'risida yangi ma'lumotlar kupayib bormoqda. Geteroxromatin inaktivatsiya jarayonini rivojlanishi asosan kodlanmaydigan DNK ketma-ketliklariga bog'liq bo'ladi. Ularning inaktivatsiyasi hujayrani keraksiz materialining ekspressiyasidan saqlaydi, politen xromosomalari ega bo'lgan maxsus to'qimalarda esa, ularning to'liq replikatsiyaga to'mqinlik qiladi, natijada hujayra uchun foydalidir.

Drozofilada mozaik tipdagi joylashish effektining izlanishlarning natijasida muhim umumiy genetik xulosalar kelib chiqadi:

1. Geteroxromatinning alohida tuzilishining asosida haqiqatda ham zichroq kompakt xolda joylashgan material bo'ladi. Kompaktizatsiya jarayoni geteroxromatinni maxsus markazlarida boshlanadi va xususiy kompaktlar hosil qiluvchi oqsillar yordamida tarqaladi. Geteroxromatindan hosil bo'lgan kshunchalik yuqori ekan-ki hatto eukromatingacha etib boradi, agarda u geteroxromatin atrofiga o'tkazilgan bo'lsa.

2. Mozaik tipdagi joylashish effekti xromatinning kompaktizatsiya holatini o'zgartiradigan oqsillarning ta'sirini o'rganish uchun juda yaxshi model hisoblanadi. Joylashish effektining modifikatorlarini aniqlash xromatinning komponentlarini genetik tahlil qilish uchun imqoniyat yaratadi.

Telomer geteroxromatinning joylashish effekti. Telomer geteroxromatin ta'sirida genetik inaktivatsiya kuzatilishi V. Gering va Dj. Rubin laboratoriyalarida 1984 yilda Drosophila melanogaster pashshasida aniqlangan. Ikkala izlanish guruhlar white+ geni tutgan transpozon olib, telomerning ketma-ketliklariga o'tkazadi, natijada white+ geni inaktivatsiyaga uchraydi va mozaiklik namoyon bo'ladi.

Telomer tsentromeraga yaqin joylashgan geteroxromatinlarning joylashish effektining yuzaga chiqishida ko'pgina umumiylik kuzatiladi. Farqi faqat telomer geteroxromatin ta'siridagi genetik inaktivatsiya boshqa genetik modifikatorlar ta'sirida ham o'zgaradi. Masalan, gen Su(var)2-5 mozaik tipdagi joylashish effektning ko'rinishiga ta'sir

etmaydi. Lekin Su(z)2 va Psc (Posterior sex combs) genlarining mutatsiyalari mozaik tipdagi joylashish effektini supressiyaga uchratadi.

Dubinin effekti. 1934 yilda N.P.Dubinin va B.N. Sidorovlar birinchi marta *sc* (*sc* gen *cubitus interruptus*) geni bilan bog'liq bo'lgan joylashish effektining o'zgacha hodisasini tasvirlashgan. *sc+* geni eu-va geteroxromatinning chegarisida 4-chi xromosomada joylashgan bo'ladi. *sc1* genining retsessiv mutatsiyasi gomozigota holatda hashoratning qanotini kubital tomirini L4 uzuq-uzuq tuzilishiga olib keladi. Agarda xromosoma qayta qurilishi (R natijasida *sc+* geni eukromatin rayonlariga o'tkazilsa, geterozigotalarning bir qismi R(*sc+*)/*sc1* mutant fenotipga ega bo'ladi. Bunday hodisa Dubinin effekti deb ataladi.(ED).

Dubinin effektining tabiatini tushunish uchun olimlar *sc* genini molekulyar-genetik tuzilishini va uning ekspressiyasini o'rganadi. Izlanishlar natijasida aniqlandi, *sc* geni embriogenezning dastlabki davrining genlar guruhiga kirishini. Ushbu genlar guruhi embrion segmentlarining qutblanishini boshqaradi. Uning mahsuloti CI oqsil bo'lib, transkripsiya jarayonini omil vazifasini bajaradi. Normada uning ekspressiyasi embrional segmentlarini faqat oldingi qismlari va imaginal disklari bilan chegaralangan bo'ladi. Gen ekspressiyasining boshqarilishida engrailed (*en*) geni muhim rol bajaradi, bundan tashqari, *sc* genini embrionning orqa qismida joylashgan segmentlar va imaginal disklarni negativ boshqaridishida ham ishtiroq etadi.

Sc geni bir necha guruh letal va morfologik mutatsiyalarining allel aro birlashish munosabatida bo'lgan ytig'indisidan tashkil topgan. *Drosophila* pashshasining qanotlarini retsessiv mutatsiyalar guruhi, bu guruhga *sc1* geni ham kiradi, genning boshqarish zonasidagi kichik bir qismidagi o'zgarishlari bilan bog'liq. Xuddi shu qism bilan EN oqsili bog'langan bo'ladi. Uzunligi 1,4 tpb teng bo'lgan DNK fragmentining shikastlanishlari qanotning imaginal diskdagi negativ gen ekspressiyasining o'zgarishlariga olib keladi: barcha mutantlarda *sc1* oqsili diskning oldingi va orqa qismlarida ekspressiyaga uchraydi.

Imaginal diskning orqa qismidan qanotning tomirlari L4 va L5 rivojlanishini bilish, o'rinni deb hisoblaymiz. EN oqsili *sc+* ekspressiyasini tsic-, va trans-joylashqanda ham boshqarishi mumkin. 1994 yilda Lakk

i Tartoflar taxmin taklif etishadi, Dubinin effekti (ED) to'rtinchi juft xromosomaning konyugatsiyadan sung ajrashgan negativ boshqarishning buzilishini natijasidir.

Shu gipotezani tasdiqlovchi O.V. Demakova tomonidan ayrim ma'lumotlar keltiradi. Olima kuchli Dubinin effektini hosil qiluvchi bir necha translokatsiyalar va genning barcha allelari bo'yicha geterozigotalarning hayotchanligi va fenotipini qiyosiy tahlil qiladi. Ma'lum bo'ldi, bunday geterozigotalar hayotchang, ya'ni qayta qurilishdagi gen R(ci+) inaktivatsiyaga uchramagan. Barcha qanotlardagi retsessiv cil guruhini mutatsiyalari Dubinin effektini namoyon qiladi, demak, effektning kuzatilishi allellar aro munosabatlarga bog'liq ekan.

Bundan tashqari, O.V. Demakova ikki guruh translokatsiyalarning tsitologik tahlilini o'tkazadi. Bitta guruhda ci genini xromosomalarning distal rayonlariga o'tkazib, kuchli ED hosil qilinadi, boshqa guruhda genni proksimal rayonlariga o'tkaziladi, natijada geterozigotalarda R(ci+)/cil effekt deyarli kuzatilmadi. Ikkinchi guruh qayta qurilishdagi tranlokatsiyalangan 4-chi xromosomaning gomologi tsentomeraga yaqin joylashgan geteroxromatin bilan ko'proq ektopik kontaktlar hosil qiladi. Yana ma'lum bo'ldi-ki, ikkinchi guruhda translokatsiyalangan va 4-chi xromosomaning normal gomologi bilan somatik konyugatsiyaning qayta tiklanish darajasi va miqdori ko'proq kuzatilar ekan. SHunday qilib, Dubinin effekti 4-chi xromosomani gomologlarining somatik konyugatsiyasiga bog'liq ekanligi tsitologik tasdiqlanadi.

8.3. DNKning xromosomalarda joylashishi

1974 yilda birdaniga to'rtta izlanuvchilar yadro xromatini tarkibida nukleosomalar borligini aniqlashgan: R.D. Kornberg xromatin subbirliklardan tuzilganligini aniqlaydi. Subbirliklar 200 pn tuzilgan DNK va ikkitadan 4 tipdagi giston molekullardan tashkil topgan. M. Noll ushbu tuzilmalarni ajratib oladi, A. Olins va D. Olins nukleosomalarning birinchi elektron mikroskopik tuzilishini nashr qilishgan.

Xromatinning fundamental subbirliqi nukleosomadir, uning tuzilishi barcha eukariotlarda deyarli birxil. Nuklosoma iplari past ion

kuchi bilan ishlov berilgan yadrolarda aniqlanadi. Individual nukleosomalarni hosil qilish mumkin xromatinga mikrokokkli nukleaza –endonukleaza bilan ta'sir etib. Endonukleaza nukleosomalarni birlashtiradigan DNK molekulasi ipini kesadi.

Har bir nukleosoma taxminan oqsil gisonlardan tuzilgan oktamer zarrachalar bilan bog'langan bo'ladi, tarkibida taxminan 200 pn DNK molekulasi joylashadi. Gistonlar tarkibida N2A, N2V, NZ va N4 molekulalarining ikkitadan nusxasi bo'ladi. N1 gistonning molekulasi monomer bo'lib nukleosomaning tashqarisida joylashadi, chunki uni olib qo'yilganda nukleosomaning tuzilishi o'zgarmaydi (rasm 47).

Nukleosoma tsilindr shaklida bo'lib, atrofida DNK zanjiri ikki marta o'raladi. DNKning bir marta o'rashiga 80 pn sarflanadi, natijada DNK zanjirida uzoqligi 80 pn joylashgan saytlar nukleosomaning yuz qismida yonma-yon joylashgan bo'ladi.

Ikkita nukleosoma orasidagi DNK qismi linker deb nomlanadi.. Oktamerni o'rab turgan DNK ipi uzunligi 146 pn teng bo'lsa, yana 50 pn linker uzunligiga to'g'ri keladi.

Hujayrada DNK 90% nukleosoma tarkibida bo'ladi. DNK ipining nukleosomaga joylashganidan so'ng ipining uzunligi 6 marta qisqaradi. Xromatinni ultrastrukturasi elektron mikroskop ostida tekshirilganda odatda ikkita nukleoprotein iplar aniqlanadi: diametri 10 nm va 30 nm ga teng bo'lgan iplar. Birinchi nukleosomada iplar ketma-ket joylashadi, ikkinchisida - spiral holatda bo'lib, iplarning diametri 10 nm teng. Spiralning har bir o'ramasida 6ta nukleosoma joylashadi.

V fibrille Diametri 30 nm ga teng bo'lgan fibrillada DNKning upakovka koeffitsient DNK taxminan 36-40 teng, ya'ni ipining har bir mikrometri 36-40 mkm DNK saqlaydi.



Rasm 48. Nukleosomaning tuzilishi (a) va H1 gistonining nukleosoma (b) bilan bo'lgan munosabati

Xromatinni mikrokokkli nukleaza bilan ishlov berilgandan so'ng elektroforez yordamida DNK qismlari uzunligi bo'yicha bir biridan ajratadi, ya'ni DNK bo'laklari elektroforez moslamasidan maxsus kovak-kovak geldan yuqori kuchlanishli elektr maydoni ta'sirida molekulaning zaryadi va o'lchamiga binoan ajratiladi. DNK bo'lagini maxsus bo'yoq bilan bo'yash natijasida oddiy ko'z bilan ko'rish mumkin bo'ladi. DNKning mayda bo'laklari elektr maydonida gel kovaklaridan yirik bo'laklarga nisbatan tez harakat qilgani uchun ularning startdan bosib o'tgan masofasini o'lchab DNK bo'lagining katta-kichikligi aniqlanadi. Hosil bo'lgan manzara foregramma deb

nomlanadi. Foregrammadagi chiziqlar DNK bo'laklarining startdan bosib o'tgan masofasi bo'lib, bitta nukleosomadagi DNK zanjirini uzunligiga bog'liq bo'ladi, odatda 200 pn ga teng. Nukleosomalarning 90 % da DNK uzunligi shu razmerda bo'ladi. Lekin, zamburug'larda nukleosomalardagi DNK uzunligi 154 pn, dengiz tipratikonini spermasida - 260 pn ga teng. CHiziqlarning foregrammada "narvan" ko'rinishida bo'lishi hamma linkerlar nukleaza bilan "kesilmagan" bo'lgan sababli razmerlari har xil bo'ladi: 200 pn teng bo'lgan fraktsiya monomer, 400 pn - dimerlar, 600 pn trimerlar deyiladi va h.k.

Nukleosomalarda giston molekulari mahsus joyda joylashadi. Barcha gistonlar ayrim molekularini aminokislotalarning bo'sh guruhlari bilan kovalent bog'lanib, modifikatsiyaga uchrashi mumkin. Lizinning bo'sh aminoguruhi atsetilirlanish va metilirlanishlari mumkin. Natijada musbat zaryad $-NH_3^+$ olib tashlanadi. Metilirlanishi mumkin arginin va gistidin ham. Fosforillanish serinning gidroksil guruhi bo'yicha kuzatiladi, gistidin ham. Natijada qo'shimcha manfiy zaryadli fosfat guruhi qo'shiladi Oqsil molekulasining zaryadini o'zgarishi oktamerning funksional xususiyatlariga ta'sir qilishi mumkin. Xromatin strukturasiidagi bunday o'zgarishlar replikatsiya va transkripsiya jarayonlarida yoki hujayra tsiklining boshqa davrilarida kuzatiladi. Masalan, giston N3dagi serinning fosforillanishi (10-chi joyda joylashganligi) xromosomalar mitoz jarayonida kondensatsiyaga uchraganda amalga oshadi.

Lekin, xozirgacha ham noaniq, DNKning maxsus ketma-ketliklari nukleosomada doimo maxsus joyida joylashganmi (fenomen nomi nukleosomalarning pozitsion yoki fazirolangan holati).

Xozircha aniq, nukleosomalar gen uzunligi bo'yicha joylashishi tasodifan emas, balki DNK maxsus ketma-ketligiga bog'liq bo'ladi.

Ammo to'liq tushunarli emas, gen transkripsiyaga uchraganda nukleosomalarnin tuzilishi saqlanadi-mi yoki yo'q-mi. Bo'linmayotgan yadroda, ya'ni interfaza davrida turganyadroda, genlar faol ishlayotganda nukleosomalar talabchanlik darajasida promotor qismining maxsus joylarida joylashgan bo'ladi. Transkripsiya omillarini o'rniga promotor rayonida nukleosomalarning bo'lishi genlarning faolligini susaytiradi. Nukleosomalarning oqsillari — gistonlar transkripsiya omillari bilan oqsillardan bo'sh bo'lgan DNK qismlari uchun raqobat qiladi. Bunday uchastkalar hujayrada DNKning

replikatsiyasidan so'ng hosil bo'lishi mumkin. Agarda gistonlar nukleosomalarining tuzilmalarini hosil qilishiga ulgursa, transkripsiya omillarining konsentratsiyasi etarli darajada bo'lmaganda, gen nafaol holatda bo'ladi (repressiya holatda). Teskarisi, transkripsiya omillarining konsentratsiyasi etarli darajada bo'lganda, ular gistonlar bilan raqobatga uchraydi va promotor rayonida RNK-polimerazaga birikib, maxsus tuzilma hosil qiladi.

Lekin, faol transkripsiya kuzatiladigan xromatindagi DNKdan gistonlar to'liq ajralmaydi. Ayrim genlarda, masalan, ribosoma genlarining 18S i 28S RNK bloklarida, nukleosoma tuzilmalari deyarli to'liq yo'qoladi, taxminan 85%. Boshqa tomondan oladigan bo'lsak, infitsirlangan hujayralardan ajratib olingan virusning SV40 minixromosomasini transkripsiya komplekslari gistonlarning to'liq to'plamiga va nukleosoma tuzilmalari ega bo'ladi, lekin ushbu virusda transkripsiya intensivligi ancha sust, rRNKning genlariga nisbatan

Shunday qilib, zamonaviy ma'lumotlari bo'yicha, transkripsiyalanayotgan genlar tarkibida nukleosomalar bo'ladi xuddi transkripsiya kuzatilmagan genlarga o'xshab. Demak, genlar transkripsiya jarayonida o'zgarishlarga deyarli uchramas ekan. Lekin transkripsiya jarayonida initsiatsiya qismida xromatinning o'zgarishlari aniqlangan bo'ladi.

Xromatin strukturasi o'zgarishini aniqlash mumkin, agarda DNK-azy I ning juda past konsentratsiyasi bilan ishlov berilganda oqsillar bilan himoyalangan DNK qismlari degradatsiyaga uchraydi va natijada mono- va dinukleotidlargacha parchalanadi. DNK molekulasi ferment bilan ishlov berilganda DNK-aza I ga o'ta sezuvchan uzulishlar hosil bo'ladi. Bunday saytlarda DNK nukleosoma tuzilmalarini tarkibiga kirmaydi va ferment bilan ishlov berishiga 100 marta oddiy xromatinga nisbatan sezuvchan bo'ladi. Har bir genda DNK-aza I ga sezuvchan 1-2 uchastka bo'lib, ular promotor zonasidan yuqoriroq joylashadi. Ayrim paytlarda promotor uchastkasi har xil nukleazalarga o'ta sezuvchan bo'ladi.

Transkripsiya omillarining ta'sirida transkripsiyaga bog'liq bo'lgan o'ta sezuvchan saytlar hosil bo'lishi mumkin.

Promotorlarini tuzilishiga ko'ra genlarning ikki tipi aniqlanadi: oldindan belgilangan (preset) va rekonstruktsiya qilingan (remodeling) genlar. Oldindan belgilangan genlar— shunday genlar ekan-ki,

ularning promotor bog'lanish saytlari DNK-aza ga o'ta sezuvchan bo'ladi, gen hali faollashmasdan turgan bo'lsa ham. Genning faollashish jarayonida boshqaruvchi omillar r/wc-ishtiroq etuvchi boshqaruvchi elementlar bilan bog'lanadi va promotor rayonidagi xromatin strukturasi sezilarli darajada o'zgarishlar hosil qilmay transkripsiya jarayonini amalga oshiradi. Rekonstruksiya uchragan genlarda boshqaruvchi elementlarni faollashtirish uchun zarur bo'lgan tsis-elementlar nukleosomalarda joylashgan sababli, ularga ta'sir qilib bo'lmaydi. Faol signalga javob berish uchun nukleosomalar shunday qayta shakllanishi kerak-ki, tsis-elementlarga etib borish mumkin bo'ladigan holatga. Natijada DNK-azaga o'ta sezuvchvn uchastkalar hosil bo'lishi kerak bo'ladi.

hsp26 geni oldindan belgilangan genning induktori shaklida yaxshi misol bo'ladi. Issiq shok boshlanishida gen bir necha minutda faollashadi. Induksiya oldin genning boshqaruv uchastqasida DNK-azaga o'ta sezuvchan ikkita saytlar joylashgan bo'ladi. Saytlar HSE ning ikkita rayonidan joy olgan. Saytlarning yonida HSEga bevosita yondashgan S- va T- qoldiqlaridan tashkil topgan (GAGA-rayon) traktlar joylashadi. Ular in vitro muhitida GAGA- omili bilan bog'lanadi va futprintlar ustida in vivo aniqlanadi. RNK-polimeraza II +25 bo'lgan uchastkani egallaydi va RNKning kichik molekulasini transkripsiya qilib, pauzaga o'tadi. Gen issiqlik shok bilan indutsirlangan so'ng HSF oqsili HSE element bilan bog'lanadi va RNK-polimeraza II esa harakatini davom ettiradi. Promotorning xromatini tuzilishida o'zgarishlar kuzatilmaydi. Gen hsp70 xuddi shu tipda tuzilgan bo'ladi..

Sut emizuvchilarning hujayralarida mavjud bo'lgan MMTV LTR genining promotor rayonida 6 nukleosoma bo'ladi.

Induksiya hosil qilgan omillar GRE va NF1N nukleosoma joylashgan joy bilan bog'lanadi, natijada nukleosoma o'zgaradi, joylashgan joyi esa, DNK-aza I ga o'ta sezuvchan bo'lib qoladi, NF1 oqsili u bilan bog'lanishini boshlaydi.

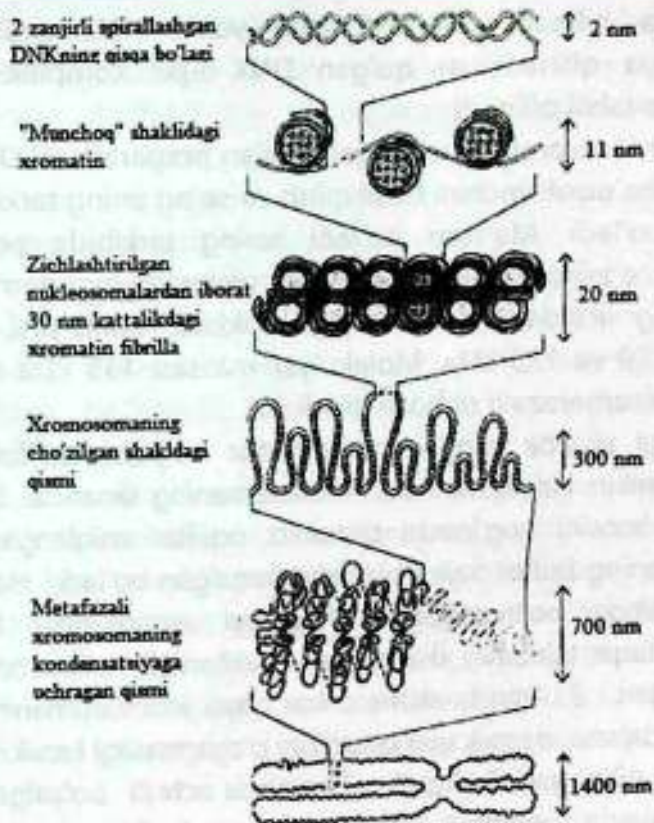
Achitqilarda RNO5 genining promotor rayoni 6ta nukleosomaga joylashgan bo'ladi. Ikkinchi nukleosomaning hosil bo'lgan joyida transkripsiya boshlanishining oldingi qismida boshqaruvchi RNO4 ni bog'lovchi sayt joylashadi. Ikkinchi va uchinchi nukleosomalar o'rtasida RNO4ni bog'lovchi bo'sh uchastok joylashgan

bo'ladi. Fosfatlarning ishtirog'ida gen faollashadi, shu vaqtda to'rtta nukleosoma rekonstruksiyalanadi.

DNKning nukleosoma usti joylashishi. Mitotik xromosomalarni qalin tanachalar shakliga olib keluvchi kompaktizatsiya jaryoni bir necha bosqichlardan o'tsa kerak (rasm 48). Birinchi bosqichi — nukleosoma darajasi, giston o'zagi ustidan DNK molekulasini o'ta o'ralishini ta'minlaydi. Ikkinchisi – nukleomer darajasi (o'tamunchoq), bu darajada 6ta nukleosoma qo'shilib bitta globulani hosil qiladi. Kompaktizatsiyaning ushbu bosqichlari DNK molekulasini uzun zanjirlari ustida amalga oshgan sababli, bir biriga yaqin joylashgan nukleomerlar qo'shilib 30 nanometr uzunligidagi DNP-fibrillasini hosil qiladi. Uchinchi bosqichi — xromomer darajasi: DNP fibrillalarni ilmoqlari, gistsiz oqsillar yordamida qo'shilib, kompakt tanachalar (0,1-0,2 mkm) hosil qiladi. Ular sun'iy kondensatsiya ta'sirida rozetka ko'rinishidagi tuzilmalar shaklini oladi. Domen ilmoqlari va xromomerlar bir tekis joylashmagan bo'lishi mumkin: xromosomalar differentsial bo'yalganda hosil bo'lgan chiziqlar mitotik xromosomalarning tanasiga to'g'ri keladi. To'rtinchi bosqich — xromonema darajasi: xromomerlar bir biriga yaqinlashadi va yo'g'on iplarni (0,1-0,2 mkm) hosil qiladi, ularni yorug'lik mikroskop ostida ko'rish mumkin. Xromonema ipi xromatidada qanday joylashganligi hali aniq emas: balki spiral shaklida yoki yana bitta ilmoqli tuzilmalar darajasini o'tadi. Albatta mitotik xromosomalarning bunday tuzilishning umumiy sxemasi tuzilishining o'ziga xosligini, maxsus uchastkalardan tuzilganligi, masalan, yadrocha hosil qiluvchi qismi, telomera va tsentromeralarni to'liq tushuntirmaydi,

SHunday qilib, ilmiy adabiyotlarni tahlil qilib, kuyidagi xulosa qilish mumkin: xromosomaning qanchalik nafis tuzilishini bilsak ham, yana undan ham ko'proq savollar tug'iladi.

Metafaza davrida turgan xromosoma tuzilishini yanada yaxshiroq o'rganish uchun xromosoma tarkibidagi giston oqillar 2M NaCl yordamida olib tashlanadi. Giston oqsillar bilan gistsiz oqsillarning katta qismi ham chiqib ketadi. Natijada xromosomaning o'rnida gistsiz oqsillarning sinchi (scaffold) qoladi, undan uzunligi 10-30 nm DNK iplari chikib turgan bo'ladi.



49 - Rasm. Xromatin kompaktizatsiyasining har xil darajalarini sxemasi va o'lchamlari.

Markaziy skaffold metafazadagi xromosoma konturini (tashqi ko'rinishi) saqlaydi, hatto nukleazalar ta'sirida DNK to'liq parchalangan bo'lsa ham.

Chiqib turgan halqalari ko'pincha ilmoqli domenlar deb nomlanadi. Odamning o'rta kattaligidagi xromosomada 2000 ilmoqli domenlar aniqlanadi. Skaffold bilan bog'langan DNK kislari SAR (scaffold attachment regions) deb nomlangan. Interfaza davrida turgan yadrolarda bunday halqalar ipcha va to'r shakldagi oqsil tuzilmalari bog'langan bo'lib, yadro matriksini hosil qiladi. YAdro matriksi 1960 yilda G.P. Georgiev va Y.U.S. Chentsovlar tomonidan aniqlangan.

Matriks oqsillari bilan birikkan DNK fragmentlarini (ular MAR — matrix attachment regions deb nomlanadi) ajratish uchun kuydagi muolajalar qo'llaniladi: 1) yadro hujayralari ajratiladi; 2) gistonlar

ekstraksiya qilinadi; 3) restriktaza yoki DNK-aza bilan DNK degradatsiya qilinadi; 4) qolgan DNK-oqsil komplekslardan DNK ajratiladi va tahlil qilinadi.

Agarda xromosoma halqalari bilan preparatlarni DNK-aza bilan ishlov berilsa oqsil sinchini hosil qilish va so'ng uning tarkibini aniqlash mumkin bo'ladi. Ma'lum bo'ladi, uning tarkibida yadro matriks oqsillariga o'xshash 20 xil atrofida gistonsiz oqsillarning bo'lishi. Oqsillarning ichida ustunlik qilgan ikkita fraksiyasi, molekulyar massasi 170 va 135 kDa. Molekulyar massasi 135 kDa teng bo'lgan oqsil topoizomeraza II ni hosil qiladi.

Oxirgi yillarda olingan ma'lumotlar bo'yicha skaffoldlar artefakt bo'lishi mumkin. Haqiqatla ham xromosomaning tanasida DNKning yon halqalarini asosini bog'lovchi gistonsiz oqsillar aniqlangan, lekin ular xromosomaning butun hajmi bo'yicha tarqalgan bo'ladi. Halqalarning in vivo sharoitida bo'lmasligiga quyidagi argumentlar keltiriladi: 1. Skaffoldlar faqat tajribaviy sharoitlarda shakllanadi, nativ xromosomalarda aniqlanmagan. 2. Agarda skaffold har qaysi xromosomaning tuzilishida muhim rol bajarsa, demak uning tuzilishi o'zgarish kerak, lekin bunday holatlar kuzatilmagan. 3. Oqsillarni aniqlash uchun bo'yalgan metafazali xromosomalarda skaffold aniqlanmagan. 4. Gistonlarni ajratib olish uchun xromosomalarni dispergiranadi, bunday xromosomalarda skaffold boshqa hosil bo'lmaydi.

Deproteinizatsiyaning har xil usullari yordamida shishgan xromosomalarning periferik qismlarida halqalardan tashqari rozetka shaklidagi DNKdan hosil bo'lgan tuzilmalar aniqlanadi. Metafaza davrida turgan xromosomalar preparatda yoyilib joylashganda rozetkalariga o'xshagan tuzilmalarni eslatadi. Ushbu tuzilmalar ko'p sonli umumiy markazdan chiqqan halqalardan tashkil topgan bo'ladi. Rozetkalar DNK zanjiri bilan bog'lanadi.

Bitta rozetkaning halqalarini umumiy uzunligi xitoy og'maxonning xromosomasida o'rtacha 14 mkmga teng, rozetkalar orasidagi DNK uzunligi – 4,2 mkm, bitta rozetkadagi halqalar soni taxminan 20 bo'ladi.

Bo'linayotgan hujayralarning xromosomasining skaffoldi va intefazali yadroning matriksi o'rtasida qanday munosabatlar bo'lishi mumkin?

Bir qator holatlarda DNKning ayrim fragmentlari xam skaffold, ham va matriks oqsillari bilan bog'lanadi. YAdro matriksi va xromosomaning skaffoldi har xil oqsillardan tashkil topgan, lekin umumiy oqsillari ham bo'ladi. Masalan, topoizomeraza II xromosomaning skaffoldini asosiy komponenti bo'lib, yadro matriksining tarkibiga ham kiradi.

MAR ning kutilmagan xususiyati - bu uning tarkibida konservativ ketma-ketliklarning bo'lmasligi. Ular odatda 70% A va T nukleotidlardan tuzilgan bo'ladi, ammo xech qanday konsensus ketma-ketliklari bo'lmaydi, topoizomeraza II aniqlovchi saytdan tashqari.

Halqalar politen xromosomalarning xromomeralariga mos kelishi noaniq. Drozofilaning politen xromosomasini xromomerasining DNKsini uzunligi 1 to 16 halqalarning shakllanishiga etadi xolos. Natijada drozofilaning razmeri 320 tpn bo'lgan 3R-xromosomasini oqsil skaffold bilan bog'langan saytdar xaritasi tuzilganda aniqlanadi: SAR-saytlar orasida DNKning razmerlari har xil 5 fragmenlari - 78, 43, 112, 26 va 62 tpn ga teng. Har bir halqada genlar soni 1-8 bo'ladi.

1980 yilda L. Djeras va G. Blobel tomonidan aniqlangan, yadro membranasi ostida, lamina deb nomlangan, oqsil qatlami joylashganligi. YAdro laminasi yo'g'onligi 25-100 nm teng bo'lgan oqsil karkas bo'lib, oraliq filamentlarga o'xshagan fibrillalardan tashkil topgan. Lamina yadro qobig'ini ichki tomonidan qoplaydi va nukleoplazmani ajratib turadi. YAdro laminasi yadro qobig'ini skelet vazifasini bajarishda ishtiroq etadi va shu bilan interfaza yadrosini bir butunligini saqlashda qatnashadi.

Yadroning katta hajmini egallagan xromatin yadro laminasi bilan qandaydir qismlari bilan bog'langan bo'ladi. Mitoz jarayonida yadro qobig'i parchalanadi va mayda pufakchalar shakliga aylanadi, lamina esa oqsilning subbirliklariga dissotsiatsiyalanadi. Kechki telofazada lamina dekontensatsiyalangan xromatinni o'rab oladi, keyinchalik ushbu kompleks membrana pufakchalari bilan o'raladi va shulardan yadro qobig'i tiklanadi.

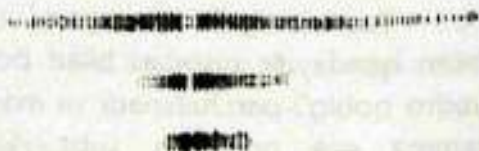
Yadro laminaning asosiy komponenti oqsillar bo'lib, laminalar deb ataladi. Ayrim holatlarda ushbu oqsillar xromatin va SAR, MARlarning ketma-ketliklari bilan xususiy bog'lanadi.

8.4. Xromosomalarning xromomer tuzilishi

XIX asrning oxirida bir qator olimlar (E. Va1biani, W. Pfitzner, W. Flemming) mitozning profaza davrida turgan xromosomada uncha katta bo'lmagan va juda yaxshi bo'yaladigan tanachalarni yoki xromomeralarni aniqlashadi, xromomeralar katta-kichikligi va shakli bilan farqlanadi. Gomologik xromosomalarda xromomeralarning ko'rinishi to'liq simmetrik bo'ladi (rasm 49). Vilson (1936) ta'rifi bo'yicha "Ipnig har bir xromatin donachasini boshqa ipda jufti bo'ladi va kichkina bo'lsa ham bittasida kuzatilgan xususiyat ikkinchi ipida bo'lmasligi" deb yozadi olim. Har xil juft xromosomalarda xromomeralar tuzilishi, katta-kichikligi, shakli, DNK miqdori va xromosomada joyi bilan farqlanadi, ya'ni xromomeralar aniq individuallik xususiyatiga ega bo'ladi va shu tufayli har bir juft xromosomalar ham individualdir. Ushbu individuallik nasllanadi.

Barcha eukariotlarda faqat mitoz va meyoznig (leptotena va paxitena) profaza davridagi xromosomalarda xromomer tuzilishi aniqlanadi, hujayra tsiklining boshqa davrlarida kuzatish qiyin. Intefaza davridagi yadro xromosomalarda xromomeralarning bo'lishi to'g'risida 1882 yilda V.Flemming fikr yuritgan.

Xromomerlar eng aniq ko'rinadi politen xromosomalar va "lampa cho'tkali" xromosomalarda. X. Bauer (N. Bauer) 1935 yilda taxmin qiladi, politen xromosomalarning disklari hosil bo'lishi mumkin parallel joylashgan xromatidalarining yon tomonida joylashgan xromomeralarining qo'shilishi hisobiga (rasm 50).



Rasm 50. *Agapanthus umbellatus* xromosomasining xromomerli ko'rinishi: meyoznig paxitena (a), o'rtacha profaza II (b) va mitozning o'rtacha-kech profazasida (v). Pastda politen xromosomalarda ko'ndalang disklarning hosil bo'lish sxemasi.

U. Dyurie 1941 yilda umurtqali hayvonlarning ko'pchiligi va ayrim umurtqasizlarning birlamchi ootsitlarni "lampa cho'tkali" xromosomalardagi xromomerlarini tasvirlab beradi (profazaning balki diplotena stadiyasida).

Xromomerlardan yon halqalar chiqadi, natijada xromosomani ko'rinishi kerosin lampani tozalash uchun ishlatadigan yumaloq sim cho'tkani eslatadi, shuning uchun bunday xromosomalarni "cho'tkali lampa" (lampbrush chromosomes) deb nomlangan. Amfibiyalarda bunday tipdagi xromosomalardagi xromomerlarning ko'rinishi birxil bo'ladi. Har xil turdagi salamandalarning karitipida xromomerlarning soni 4-10 mingta bo'ladi.

Bunday tekshiruvlarning barchasini natijasida xulosa qilinadi – xromosomalar xromomerlardan tashkil topgan. Lekin zamonaviy ma'lumotlar bo'yicha xromomer tushunchasi universal emas ekan.

Xromomerlarning barcha tiplari uchun talluqli bo'lgan ikkita xossa: birinchidan, ular barchasi kompakt holatda turgan DNK bo'laklari, ikkinchidan, xromomerlalarining miqdori va tuzilishi ma'lum bir organizmda hujayra tsiklining ma'lum bir davrida doimiy bo'ladi.

Xromomerlarning har xil tiplari bir biridan ancha belgilari bilan farq qiladi. 1. Murtak yo'lidagi hujayralarida meyotik xromosomalarning xromomerlari aniqlansa, politen xromosomalarning xromomerlari — somatik hujayralarida. Ontogenez jarayonida so'lak bezlari differentsiyalashishning yaqunlovchi etapi hisoblansa, meyoz davridagi hujayralar - yangi avlodning boshlangich davridir. 2. Xromomerlarning miqdori har xil to'qima hujayralarida har xil bo'ladi. Masalan, Agapantkus umbellatusning paxiten xromosomalarda 1600 xromomerlar aniqlanadi, II meyoz bo'linishining profazasida — 239, u Ornithogalum virens paxitena stadiyasida — 274, chang hujayralarining profazasida — 67. Xromatinning kompakt holatdagi uchastkalarni miqdoridagi farqlarning sabablari hujayralar hujayra tsiklining har xil stadiyasidagi xromosomalar bo'lib, kompaktizatsiya jarayonining har xil darajasida turgandir. Agarda xromomerlar dekompanat holatdagi interfaza davrida turgan politen xromosomalarning diskklarini yig'indisi bo'lsa, ular genom DNKning eng kichik fragmentlaridir, mitoz yoki meyozning xromomerlari moddani (materialning) kuchli kompaktizatsiyasi tufayli shakllanadi, balki interfazali

xromomerlarining qo'shilishidan hosil bo'ladi, ya'ni xromatinning yuqori darajadagi taxlanishidir.

Hujayralar bo'linishining keyingi bosqichlarida xromomerlarning kattalashuvi kuzatiladi, xromomerlar aro masofalalarning qisqarishi va oxirida material qo'shib mitotik xromosomani shakllanishig olib keladi.

3. Xromomerlarning miqdori o'zgarishi bilan ularning genetik tarkibi ham o'zgaradi. Loladoshlilar olilasiga mansub bo'lgan o'aimliklarning meyozi jarayoni, xromomerlarini bir qator xususiyatlari va genlari tekshirib Dj. Belling (1928) xulosa qiladi, xromomerlar bu genlar, chunki genlar va xromomerlar xromosomada bitta chiziq hosil qilib joylashadi, o'zaro razmerlari bo'yicha katta farqlanadi va ikkalalari bir xil printsipda, gomologiya printsipida konyugatsiyalanadi. Mana shu o'xshashliklar asosida olim genlar bu xromomerlar deb o'ylaydi.

Bunday gipotezaning foydali tomoni ham bor, chunki informatsiya birligi (genom) va morfologik struktura - xromosomani bir biriga mos kelishini aniqlash uchun urinib ko'radi. Lekin keyingi ma'lumotlar bo'yicha bunday emas ekan, shu sababdan gipoteza qoldiriladi.

Asosiy sababi genlarning miqdori ancha ko'p bo'lishi kerak aniqlangan xromomerlarning soniga nisbatan. Lima-de-Faria (A. Lima-de-Faria) fikri bo'yicha Homo sapiensning paxiten xromosomalarida xromomerlar soni 500 atrofida bo'ladi. Agarda 1 gen — 1 xromomer gipoteza to'g'ri bo'lsa, odamda 500 tuzilmaviy genlar bo'lishi kerak, bu raqam juda kam, chunki E. coli bakteriyada genlar miqdori 5000 atrofida aniqlangan. Odamda genlar miqdori 50 mingtadan to 100 mingtagacha bo'lishi mumkin degan ma'lumotlar keltirilgan.

SHunday qilib, olingan ma'lumotlarnin tahlil qilib, kuyidagi xulosa qilish mumkin: xromomerlar – bu lokal xususiyatiga ega bo'lgan xromosomalarning fragmentlaridir. Xromomer tarkibiga kirgan DNK fragmentining uzunligi hujayra tsiklining xromosomalarni kompaktaktizatsiya jarayoning etaplariga bog'liq. Ushbu ma'lumotlar xromomer genomning doimiy tuzilmasi emas, ontogenezning har bir davri uchun o'zining xromomerlar to'plami bo'ladi deb hisoblashga asos bo'ladi.. SHu sababdan barcha xromomerlarning tiplarini to'rtta guruhga ajratish mumkin: 1) leptoten, 2) paxiten, 3) "lampa cho'tkasi"

xromosomalarning, 4) interfazadagi politen xromosomalarning xromomerlari.

SHubhasiz, xromomerlarning funktsional tuzilishi va genetik tarkibi har xil tipdagi xromosomalarda har xil.

8.5. "Lampa cho'tkasi" tipidagi xromosomalalar.

"Cho'tkali lampa" tipidagi xromosomalalar shakllanadi uzoq davom etadigan, hatto bir necha oy, meyozi bo'linishining davrilarida. SHu davrining mobaynida xromosomalalar o'ta dekompekt holatda bo'ladi va ularni yorug'lik mikroskop ostida bemalol ko'rish mumkin. Meyozning kechki davrlarida xromosomalalar kompakt holatga o'tadi. Tritonning Notophthalmus viridescens ayrim "cho'tkali lampa" ko'rinishidagi xromosomalarning uzunligi 400dan to 800 mkm gacha boradi. Barcha "lampa cho'tkasi" tipidagi xromosomalalar to'plamini umumiy uzunligi 5-6 mm gacha boradi.

Bunday tipdagi xromosomalalar 1878 yilda V. Flemming (W. Flemming) tomondan aksolotlning har xil rivojlanish stadiyalardagi ootsitlarda aniqlangan edi. Xromosomalalar tasviri 1882 yilda berilgan.

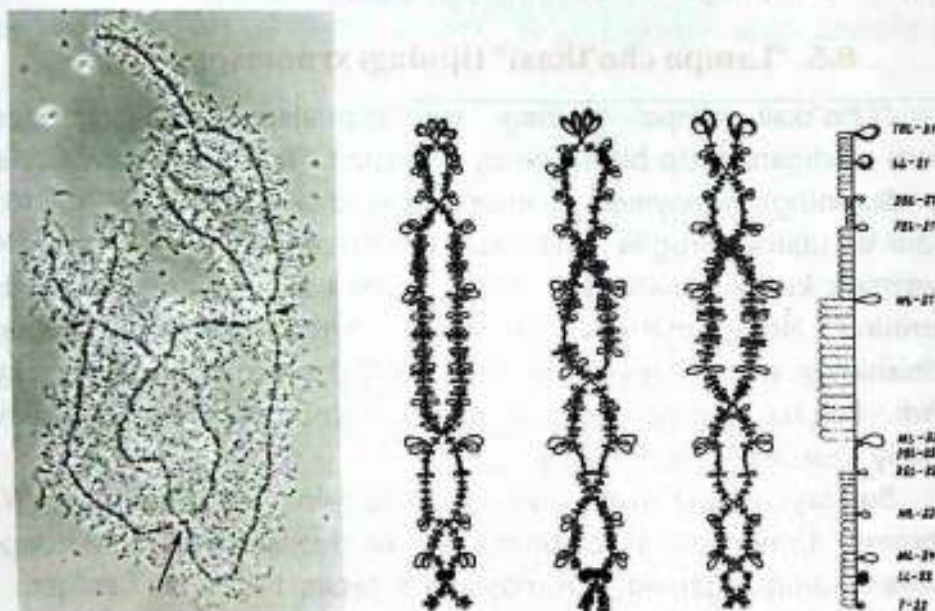
U. Dyurie (1941) bo'yicha shu xromosoma uzun ipcha shaklida bo'lib, uning ustida granularlar – razmeri 1-2mkm ga teng bo'lgan xromomerlar joylashadi. Xromomerlar juft bo'lib joylashadi, ulardan halqalar chiqib turadi (rasm 50).

Dj. Goll izlanishlari bo'yicha xromomerlar va ularning orasidagi iplar DNKdan tashkil topgan, eng yirik xromomerlar va ulardan chiqqan halqalarning o'ziga xos morfologik tuzilishi, razmerlari, ya'ni individuallik xususiyatiga ega.

Bunday xromomerlar, odatda kam uchraydi, "cho'tkali lampa" tipidagi xromosomalarda bir qator halqalar shaklida joylashgan bo'ladi (rasm 50).

Tuzilishi jihatidan bir biridan keskin farq qiladigan halqalarning bo'lishi xromosomaning maxsus joylarini va umuman xromosomani o'zini aniqlashga (identifikatsiya qilishga) markyorlar vazifasini bajaradi. Ushbu markyorlar bunday tipdagi xromosomalarning genetik xaritasini tuzishda qo'llaniladi (rasm 50).

"Cho'tkali lampa" tipidagi xromosoma ikkita xromatidan tuzilgan bo'ladi. Bir juft xromomerdan chiqqan ikkita halqa aslida ikkita xromatidalaridir.



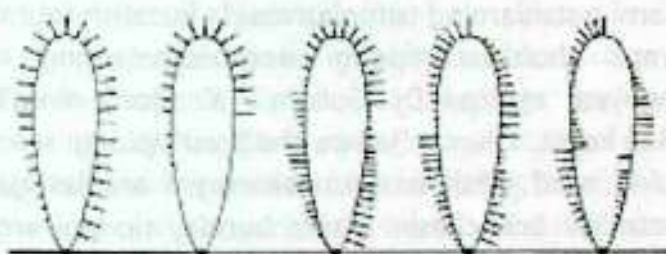
Rasm 51. *Notophthalmus viridescens* dan ajratib olingan va fiksatsiya qilinmagan xromosomalarining faza-kontrastli mikroskop ostidagi ko'inishi va tovuqning "lampa cho'tkasi" tipidagi xromosomalarda halqalarning xaritasi.

Har bir halqa murakkab tuzilgan: o'zak qismi ipsimon tuzilishga ega, atrofi shu rayonda to'plangan faol mahsulotlar bilan o'ralgan bo'ladi. Halqaning boshlanish joyidan to ohirigacha mahsulotlarni yig'ilishi assimetrik tarzda amalga oshadi. SHu sababdan halqaning bir uchida mahsulotlar mutlaqo bo'lmasligi, boshqa uchida – maksimal to'plangan bo'ladi. Demak, halqalar mahsulotning to'planishi bilan ham farqlanadi.

1956 yilda Dj. Goll xromomerlar va halqalardagi xromatidaning tuzilish sxemasini taqlif etadi. Sxema bo'yicha xromomer kompakt holatdagi DNKdan tuzilgan, undan chiqadi dekompakt holatdagi halqa. Halqada "matriksning" joylashishi transkripsiyaning harakat yo'nalishini aks ettiradi: halqaning ingichka qismi – transkripsiya

jarayonini boshlanishi, yo'g'on qismi – initsiatsiya uchastkasidan eng uzoq joylashgan qism.

Transkripsiya uchastkalarini halqada joylashishini bir necha tipi aniqlangan (rasm 52).



Rasm 52. "Lampa cho'tkasi" tipidagi xromosomaning halqasidagi xar xil tipdagi transkripsiya jarayoni

Klassik tip — matriks halqaning butun uzunligi bo'yicha joylashadi. Halqada ingichka va yo'g'on qismlari aniq ko'rinadi, qalinligi ingichka qismidan yo'g'on qismiga qarab asta-sekin oshib boradi va maksimumga etkanda qalinlashishi to'xtaydi.

Bunday tipdagi tuzilishda kuzatiladi: Proizvodnym etogo tipa organizatsii yavlyaetsya sleduyushchiy: transkripsiya birligi halqada qutblangan holatda joylashgan bo'ladi, lekin uning boshlangich va oxirgi qismlarida o'tmagan qismlari bo'ladi. SHunday halqalar borki, ularning tarkibida ikkita va undan ham ko'proq teskari qutblangan transkripsiya birliklari bo'lib, ular bir biriga nisbatan "boshi boshga" (transkripsiyaning boshlangich qismi), yoki "dumi dumga" (transkripsiyaning terminatsiya qismi) joylashgan bo'ladi (rasm 53).

Har xil bo'lgan DNKning ketma-ketliklaridan in situ gibridizatsiya natijasida aniqlanadi, ayrim genlar halqalarda transkripsiya uchastkalarini to'liq egalayli. Masalan, Triturus s. Carnifex ning gistonlar genlarini DNK si 8 halqada joylashadi.

Halqalarda satellit DNK transkripsiya jarayonini o'tadi. N. viridenscens ning satellit DNKsi, satellit I deb nomlangan va uzunligi 222 nj ketma-ket joylashgan fragmentlardan tashkil topgan bo'lib, faqat bitta transkripsiya birligiga ega bo'lgan, gigant (juda katta) halqa bilan gibridlashadi (duragaylashadi). Qiziqarlisi shuki, gibridizatsiya aniqlanadi, agarda preparat oldindan RNK-aza bilan

ishlov berilmagan va DNK denaturatsiyaga uchramagan bo'lsa. Bunday vokea kuyidagi ma'lumotni tasdiqlaydi: ushbu satellit DNK transkripsiyaga uchraydi "lampa cho'tkasi" deb atalgan xromosomalarda. Satellit TcS2 330 pn tuzilgan bo'ladi. Satellit ootsitning juda ko'p halqalarida transkripsiyaga uchraydi. Transkriptlarni ootsitlarning tsitoplazmasida kuzatish mumkin.

"Lampa cho'tkasi" tipdagi xromosomalarning qo'llanilishi ancha kengayadi ayniqsa Dj. Gollom i K. Morfi ning(1998) ajoyib kashfiyotidan keyin. Olimlar "lampa cho'tkasi"tipdagi xromosomalarni sun"iy usulda hosil qilish mumkin ekanligini aniqlashgan. Masalan, agarda spermiyini boshchasini o'zida bunday tipdagi xromosomalari bor bo'lgan ootsit hujayrasiga o'tkazilsa, spermiyning DNKsidan "lampa cho'tkasi" tipdagi xromosomalalar shakllanar ekan. Ularning soni shu turga xos bo'lgan xromosomalarning gaploid to'plamiga teng bo'ladi. Bunday fenomen avvalambor ksenopusda aniqlangan edi. Keyinchalik "lampa cho'tkasi" tipdagi xromosomalalar baqa va baliklar spermiyalarining boshchasidan, ksenopusning ootsitiga o'tkazilganda, shakllanishlarini kuzatishgan. Agarda bunday xromosomalarni shu usul yordamida hosil qilish mumkin bo'lsa, odamning xromosomalarni undan ham aniq genetik xaritasini tuzish imqoniyati bo'lar edi, degan fikrlar bor.

8.6. Politen xromosomalalar

Politen xromosomalalar Chironomus plumosus lichinkalarining so'lak bezlari, malpigi naychalari, ichak, gipoderma va muskul hujayralarida aniqlangan (1881, E. Balbiani (E. Balbiani)). Ular uzun tsilindr shakldagi bog'ichlar deb tasvirlangan bo'lib, bir necha marta o'raladi va yadro hajmini to'ldiradi. Bog'ichlar «permanent spirema»deb ataladi, chunki har bitta yadroda faqat bitta shunday bog'ich buladi va spiral shaklidagi ipni- spiremani eslatadi. To'qqiz yildan so'ng E. Balbiani «permanent spirema» infuzoriyaning makronukleusida aniqlaydi.

1933-1934 yillarda tri guruh izlanuvchilar: T. Paynter (T. Painter), E. Xayts i X. Bauer (E. Heitz, N. Bauer), R. King i X. Bims (R. King, N. Beams), ezilgan preparatlar usulini qo'llashadi va «spirema» yaxlit bog'ich emasligini aniqlashadi, ya'ni ayrim elementlardan tashkil

topganligini isbotlashadi, elementlarning soni mitotik xromosomalarning gaploid to'plamiga yaqin bo'ladi. Olimlarning fikri bo'yicha «spirema»ning har bir elementi gomologik xromosomalarning zich sinapsning natijasidir.

Politen xromosomalarga xos bo'lgan xususiyatlar: 1) bular maksimal dekompakt holatda turgan interfaza davridagi xromosomalardir, ya'ni genlari ekspressiya uchun maksimal imqoniyatlari bor bo'lgan va o'z funksiyasini faol bajarayotgan xromosomalar; 2) ular gigant razmerlarga ega, chunki minglab gomologik ipchalardan – xromatidalardan tuzilgan bo'ladi; 3) bunday xromosomalarda ko'ndalang chiziqlar bo'lib xromomerlar joylashiga mos keladi; 4) xromosomalarni elemenlarining soni politen xromosomalari bor bo'lgan yadroda ko'pincha gaploid bo'ladi, chunki gomologik xromosomalar birr biri bilan konyugatsiyalanadi, ya'ni juftlashadi, natijada xromosomalarning umumiy miqdori ikki baravar kamayadi.

Politen xromosomalarga ega bo'lgan hujayralar mitoz usuli bilan bo'linayotgan hujayralaridan bir qator xususiyatlari bilan farq qiladi. Birinchidan, politen xromosomalarning shakllanishi hujayra bo'linishining mexanizmini buzilishi bilan assotsiyalanadi, chunki hujayra tsiklini faqat S, DNK sintezlanadigan davr va G davrini o'tadi xolos, Ya'ni yadro moddasi ikki marta ko'payadi, ammo ikkita qiz hujayralarga taqsimlanmaydi. Bunday tipdagi hujayra tsiqli drozofilada emrional taraqqiyotini o'rta davrlaridan boshlab kuzatiladi.

Ikkinchidan, har bir replikatsiya jarayonining oxirida qiz xromatidalar segregatsiyaga uchramaydi (ya'ni bir biridan ajramaydi), natijada ular juftlangan holatda qoladi. Drozofila genlaridan bittasi escargot, imaginal disklarda diploid hujayrarning tsiklini saqlashini ta'minlaydi va hasharotning lichinka davridagi politen xromosomalarga ega bo'lgan hujayralarda nofaol holatda bo'ladi. Balki, uning ekspressiyasi politeniyaning rivojlanishini susaytirsak kerak. Uchinchidan, shakllangan politen xromosomalar mitoz usuli bilan bo'linmaydi. To'rtinchidan, yadro qobig'i va yadrocha birin-ketin keladigan DNK replikatsiyasining tsiklida intakt holatda bo'ladi.

Organ va to'qimalarda politeniya kuzatiladi rivojlanish jarayonini shunday davrilarida qachonki a²zolarining tez o'sishi, funksiyasini bajarish zurr bo'lqanda. Politen xromosomalarga ega bo'lgan

hujayralardan tuzilgan organlar, odatda qisqa vaqt davomida o'sish bilan bog'liq bo'lgan intensiv sekretsiya jarayonida ishtiroq etadi. Misol qilib olishimiz mumkin, ootsitlarni oziqlantiruvchi hujayralari, ipak va so'lak bezlarining hujayralari, trofoblast, antipodlar, endosperm va boshqalar. Politeniyaning o'ziga xos xususiyatlari ushbu vazifalarni bajarishga imqoniyatlar yaratadi. Hujayra tsiklida yadro va hujayraning bo'linish jarayoni to'liq bloklangan sababli, xromosomalarning replikasiyasi soddalashgan va kam vaqt davomida amalga oshiriladi. Politenizatsiya tufayli organ massasi diploid hujayrarning mitotik bo'linishiga nisbatan tezroq kattalashadi. Politeniya tipi bo'yicha hujayra tsikli organning yuqori funksional darajada saqlashga imqoniyat yaratadi, chunki mitozlar bilan uzilib turmaydi.

Evolyutsiya jarayonida rivojlangan barcha organizmlarda politeniya aniqlangan: infuzoriyalar, yumshoq tanililar (mollyuskalar), hasharotlar, sut emizuvchilar va bir pallali, ikki pallali o'simliklarda.

Yadrochalar. Yadrochalar yadro tuzilmalari shaklidaa birinchi marta politen xromosomalari bo'lgan hujayralarda politen xromosomalari bilan birga tasvirlangan, ya'ni 1881 yilda.

1930 yillarning o'rtalariga kelib ma'lum bo'ladi, yadrochalarning shakllanishi xromosomaning maxsus qismi bilan bog'liqligi. 1965 yilda F. Ritossa va S. Spigelmen aniqlashadi, yadrocha xromosomaning bir qismi bo'lib, yadrochanning tashkilotchisi (organizatori) deb nomlanadi. SHu joyda ribosomal 18S RNK i 28S RNK ning genlari transkripsiya jarayonini o'taydi. rRNK genlarning miqdori har xil hayvonlarning genomida 30 dan to 700gacha bo'lishi mumkin. V 1969 g. O. Miller va B. Bitti tomonidan yadrochanning suv ustiga "yoyish" usulini ishlab chiqishi natijasida o'ziga xos archaga o'xshash tuzilmalarni aniqlashadi. Ipchani ustida, ya'ni xromatidada, ribonukleoprotein «matriksi» — transkripsiya kompleksining molekulari va "o'sayotgan" RNK molekulasini joylashgan bo'ladi.

Bitta gendan bir vaqtning o'zida taxminan 100 RNK molekulasini "o'qiladi".

Yadrochanning tashkilotchisi (organizatori) tarkibiga kirgan har bir gen boshqa genlarga aloqasiz o'z vazifasini bajaradi. Agarda genlardan bittasini transpozonga joylashtirilsa va transformatsiya usuli yordamida genomga kiritilsa, transpozon o'mashgan joyda katta

bo'lmagan yadrocha shakllanadi. YAdrocha organizatorini bir qismining deletsiyasi bobbed mutatsiyalarni hosil qiladi. Ma'lum vaqtdan keyin mutantlarda taqrorlanishlarning miqdori normagacha tiklanadi. Ushbu jarayonga magnifikatsiya deyiladi, F. Ritossa tomondan 1968 yilda aniqlangan.

Yadrochalarning genlari ham amplifikatsiyaga uchraydi - rDNK ning xromosomasiz nusxalarini ko'payishiga. Amplifikatsiya amfibiyalarning ootsitlarida Dj. Goll, D. Braun va I. David lar tomonidan 1968 yilda kashf etilgan

Politen xromosomalarning genetik tahlilda qo'llanilishi. Fundamental kashfiyotlar bilan bog'liq bo'lgan politen xromosomalalar noyob ob'ekt shaklida uzoq yillar davomida qo'llanib kelgan. 30-yillarda politen xromosomalalar ustida izlanishlar olib borishi natijasida li v g. Dj. Patterson (1932) va O. Makkenzen (1934-1935) ma'lumotlari bo'yicha, mayda deletsiiyalarni genlar xartasini aniq tuzish uchun qo'llanishi mumkin.

Ushbu usul yordamida politen xromosomalarning bir qancha genlarini yuqori aniqlik bilan genetik xartasi tuzilgan, hatto yagona diskdagi va diskning qismidagi genlarni ham. Genlarning joylashishi tartibi xromosomaning genetik xartasida v politen xromosomalarda to'liq o'xshashdir. Xozirgi vaqtga kelib drozofilaning deletsiyalar yordamida yuzlab genlarini xaritalari tuzilgan.

Politen xromosomalarda geterozigot inversiyalar aniq ko'rinadi. 1936yilda bir qator olimlar (N.P. Dubinin, N.N. Sokolov va G.G. Tinyakov, shuningdek, A. Stertevant va F. Dobrjanskiy) politen xromosomalarni inversiyali polimorfizm va populyatsiyaning strukturasi izlanishlarida qo'llanishgan. Oxirgi 65 yil davomida bunday izlanishlar ko'pgina ilmiy laboratoriyalarda olib borilmoqda.

TSitogenetik xarita tuzish usuli xozirgi vaqtda gibridizatsiya in situ usuli bilan to'ldiriladi. Ushbu usul yordamida genning joyi bir necha ming nukleotidlar juftigacha aniqlash imqoniyatini beradi. PKlonlash usulini rivojlantirishda ham politen xromosomalarni qo'llash hal qiluvchi omil vazifasin bajaradi.

Mikroklonlash usullarini rivojlanishi xromosomalalar tuzilishi va funksiyasini tushunushda muhim rol bajargan, chunki xromosomaning kerak bo'lgan qismini aniqlash, mikromanipulyator yordamida kesib olish va politen xromosomaning shu rayonidagi

mikroklonlarini qutubxonasini hosil qilish imqoniyatini yaratadi. Ushbu usul yordamida jinsiy X-xromosomaning muhim qismi va ikkinchi xromosomaning bitta elkasi va tsentromeraning yonida joylashgan geteroxromatin klonlashgan bo'lib, klonlarining kutubxonasi hosil qilingan.

Politen xromosomalar qo'llanishi natijasida aniqlangan, gormonlar genlar faollashishi orqali ta'sir etadi, genlar faolligini gormonlar ta'sirida pog'onali ravishda o'zgaradi

Politen xromosomalarda umumbiologik hodisa kashf etilgan: hujayralarning stress ta'siriga bergan javobi yoki issiqlik shokning sindromi. Insulyatorlar ham politen xromosomalarda aniqlangan.

Nazorat uchun savollar:

1. *Genlar faolligini joylashish joyini o'zgartirishi natijasida o'zgarishi.*
2. *Gen joylashish effekti.*
3. *Geteroxromatizatsiyaning mexanizmlari*
4. *DNKning xromosomada joylashishi.*
5. *Xromosomalarning xromomer tuzilishi.*
6. *Telomer xromatinning joylashish effekti.*
7. *"Cho'tka lampasi" tipdagi xromosomalar.*
8. *Politen xromosomalar.*

9 BOB. JINS ANIQLANISHINING GENETIK ASOSLARI

Ginandromorf, interseks, germafroditlar va boshqa jinsning o'zgarishlari. Jinsnin aniqlanishini balans nazariyasi. Jinsning aniqlanishidagi genlar faoliyati. Sut emizuvchilarda jinsning aniqlanishi. Genlar dozasini kompensatsiyasi.

Chatishtirishning barcha shakllarida urg'ochi va erkak avlodining paydo bo'lish ehtimoli 1:1 nisbatanga yaqin, ya'ni 100 erkakga 100 urg'ochi to'g'ri keladi. Bunday nisbatdagi ajralish tahlil chatishtirishdagi belgilarning ajralish nisbati bilan korrelyatsiyalanadi, demak, ota-onaning biri geterozigota, ikkinchisi – tahlil qilinaytgan belgi bo'yicha gomozigota bo'ladi. SHu sababdan a priori taxmin qilish mumkin, jinsiy xromosomalar bo'yicha erkak organizm – geterozigota XY, urg'ochi –gomozigota XX.

Lekin bunday tipdagi jinsiy xromosomalar sut emizuvchi hayvonlarda, drozofila pashshasi va shuningdek odam uchun xosdir. Ayrim kapalaklar va chuvolchanglarda erkaklarning jinsiy xromosomalari XO, urg'ochilarda –XX.

Qushlar, ayrim kapalaklar, baliqlar, amfibiyalar (suvda va quruqlikda yashovchilar) va gulli o'simliklarning erkak organizmlar - gomogametalı — ZZ, urg'ochilari esa, geterogametalı (jinsiy xromosomalari har xil) - ZW yoki ZO.

Shunday qilib, jinsiy belgilarini ifodalochi genlar jinsiy xromosomlarda joylashgan bo'ladi. Qolgan barcha belgilar – tip, sinf, oila va qolaversa individual belgilarini ifodalovchi genlar asosan autosomalarda joylashgan.

Savol tug'uladi, qanday qilib jinsiy xromosomalarning soni va tarkibi erkak yoki o'rg'ochi organizmning rivojlanishiga ta'sir etadi. YAna, qizig'igi shuki, drozofilani Y- xromosomasi deyarli genlari yo'q (hozirgi kunga qadar spermatozoidlarning rivojlanish va shakllanishiga

ta'sir etuvchi 11 ta gen aniqlangan). Bundan tashqari, Y-xromosomaning bo'lmasligi, ya'ni jinsiy xromosomalarning XO bo'lishi ham erkak organizmni ifodalaydi. Jinsiy xromosomalar XXY — sog'lom serpushtli urg'ochidir. Qanday qilib drozofilaning erkak va urg'ochi lar shakllanadi?

Jinsning differentsiatsiyasini shakllanishi bo'ladi (fenotipik jins), ya'ni tashqi jinsiy organlarning rivojlanishi, ikkilachi jinsiy belgilarning paydo bo'lishi va birlamchi jinsning aniqlanishi. Birlamchi jins aniqlanishi deganda tushuniladi, erkak va urg'ochilarda gonadalarning (jinsiy bezlar: tuxumdon va urug'don) rivojlanishi. Ushbu jarayonning printsiptial sxemasi konservativ hisoblanadi. Maxsus boshqaruvchi signal ta'sirida ma'lum qandaydir hal qiluvchi gen faollashadi, natijada gonadogeneznig genlari faollashadi va jinsiy belgilarining rivojlanishi amalga oshadi. Jarayonda ishtiroq etuvchi komponentlar har xil organizmlarda farqlanishi mumkin.

Ayrim holatlarda erkak va urg'ochi organmlarning rivojlanishiiii irsiy omillarga emas, balki tashqi muhit ta'siriga bog'liq bo'ladi. Masalan, dengiz chuvolchangning *Bonellia viridis* erkaklari bir necha mm kattalikda bo'lib, urhochisining bachadonida yashaydi va rivojlangan tuxum hujayralarni otalantiradi. Demak, erkaklar tipik parazitlik hayot kechirishadi. Urg'ochilari olho'ri mevasining kattaligida bo'lar ekan.

Otalangan tuxumdan rivojlangae lichinkalar ma'lum vaqt davomida erkin hayot kechirishadi, so'ng etilgan urg'ochining xartumiga yopishib oladi yoki suvning tubiga tushib birikadi. Ikki toifadagi lichinkalar bir biridan farqlanmaydi va qaerga birikishi ham tasodifan, lekin lichinkadan voyaga etgan urg'ochi yoki erkagini rivojlanishi tashqi muhit sharoitga bog'liq. Agarda lichinkalar urg'ochi chuvolchangini xartumiga biriksa, ulardan erkaklar rivojlanadi. Erkaklari urg'ochining jinsiy organlariga o'tib parazitlik hayot kechiradi, suvning tubiga birikgan lichinkalardan urg'ochilar rivojlanadi.

Missisipi timsohlarda jinsning rivojlanishi tashqi muhit haroratiga bog'liq bo'ladi.

9.1. Ginandromorf, interseks, germafroditlar va boshqa jinsiy og'ishlar (patologiyalar).

Drozofila va boshqa organizmlarda ham shunday holatlar uchraydi -ki, tanasining har xil qismlari belgilari bo'yicha har xil jinsga taalluqli, ya'ni organizm jins bo'yicha mozaik bo'ladi, tananing bir qismi erkaklarga xos bo'lsa, ikkinchi qismi – urg'ochilarga. Bunday holat ginandromorfizm deb nomlanadi. Bunday voqeada zigota ikkita X-xromosomaga ega bo'ladi, demak urg'ochi organizm rivojlanishi kerak. Urg'ochi organizm X-xromosomada joylashgan oq rangli ko'z va kalta qanotlarini ifodalovchi genlar bo'yicha geterozigota bo'ladi $wm/w+m+$. Birinchi bo'linishlar natijasida tarkibida $w+m+$ genlar bo'lgan xromosoma eliminatsiyaga uchrasa va bundan tashqari, mitotik bo'linishning ekvatori embrionning bosh tomonidan to dum tomoniga nisbatan simmetrik joylashgan bo'lsa, tananing bir qismi bitta X-xromosomaga ega bo'lgan hujayralardan tashkil topgan bo'ladi, ya'ni erkak genotipiga xos, ikkinchi qismining hujayralari ikkita X-xromosomaga ega, ya'ni urg'ochi organizm rivojlanadi.

Tut ipak qurtining bir turning *Lymantria dispar* erkak va urg'ochilari bir biridan keskin farq qiladi. Har xil geografik irq'larga (evropa va yapon) mansub bo'lgan kapalaklar chatishtirilganda hosil bo'lgan avlodlarda erkak va urg'ochi belgilarga ega bo'lgan oraliq shakllar paydo bo'ladi, ya'ni interseksuallik holatiga olib keladi. Bunday organizmlar intersekslar deb nomlanadi. Drozofilada intersekslar aniqlangan. Ginandromorflardan farqli ravishda intersekslarda qaysidir qismi erkaklikga, boshqa qismi – urg'ochilikka xos bo'lishiga ajralmagan bo'ladi. Inintersekslarda rivojlanishning ma'lum davrigacha genetik jihatdan determinatsiya qilingan jins rivojlansa, keyinchalik ikkinchi jinsning belgilari paydo bo'ladi.

Natijada intersekslar sog'lom (normal) shaxslardan birlamchi va ikkilamchi jinsy belgilar oralik darajada rivojlangan bo'ladi. Masalan, drozofilaning intersekslari erkak va urg'ochilardan bimalol farq qiladi, ya'ni dag'al tukli yirik pashshalar bo'lib, ko'zlari katta, qanotlarini chetlari arraga o'xshash. Erkaklarga xos bo'lgan tojlar rivojlangan bo'ladi. Qorin qismi erkak va urg'ochilarga xos bo'lgan belgilarning oralik shakllariga ega. Tashqi jinsiy organlar ko'proq urg'ochilarga xos, lekin tuxumdonlari rudimentar, urug'donlar ham rivojlangan

bo'ladi. Ko'pincha bitta jinsiy bezi tuxumdon bo'lsa, ikkinchisi – urug'don. YOki jinsiy bezi urug'don bo'lib, lekin uning tarkibida kurtak shaklida urug'don to'qimasi ham rivojlanadi

Ko'pchilik o'simliklar va tuban hayvonlarda germafroditizm holati rivojlangan bo'ladi, ya'ni bitta organizmda ham erkaklik, ham upg'ochilik jinsiy organlar rivojlanadi.

9.2. Jins aniqlashining balans nazariyasi.

Zamonaviy genetikning asoschilaridan biri K. Bridges drozofila pashshasini ustida izlanishlar olib borib, bir nechta urg'ochilarida xromosomalarning triploid to'plamini, ya'ni $3X + 3A$ — uchta X-xromosom tshplamini va uchta autosomalar to'plamini, kuzatadi. Bunday urg'ochilar normal xromosomalarga ega bo'lgan erkaklari bilan chatishtirilganda ($2A + XY$) avlodlarida normal urg'ochi va erkaklari bilan birga jinsiy belgilarning oraliq shakllariga ega bo'lgan individlar kuzatilgan. Jinsiy xromosoma va autosomalar nisbati bo'yicha barcha avlodni 8ta sinfga ajratish mumkin:

1. $3X : 2A$ — triploid urg'ochi.
2. $2X : 2A$ — diploid urg'ochi.
3. $(2X + Y) : 2A$ — urg'ochi.

Mana shu uchta sinfdan X-xromosomalar miqdori autosomalar to'plamiga nisbatan birni tashkil etadi. Y –xromosomaning bo'lishi normal urg'ochini rivojlanishiga ta'sir etmaydi.

5. Genomida $XY : 2A$ xromosomalar nisbati kuzatilgan individlar, ya'ni X-xromosomalarning miqdori autosomalar to'plamiga nisbatan 0,5 tashkil etganlar – normal erkaklar ekan.

5-6. Genotipi $2X : 3A$ i $(2X + Y) : 3A$ bo'lgan injivilarda, ya'ni X-xromosomalar miqdori autosomalar to'plamiga nisbatan 0,5 va 1 oraligida bo'lsa, ham erkak, ham urg'ochi jinsiy belgilari rivojlangan ekan. Bunday individlar intersekslar bo'lgan edi.

7-8. Nihoyatda, agarda autosomalar to'plami uch baravarga ko'paygan bo'lsa, lekin bitta X-xromosomani bo'lsa ham ($X : 3A$), "o'taerkak" rivojlanadi. Bunday erkak individda jinsiy belgilar o'ta rivojlangan bo'ladi, ammo bepust, nimjon va tez nobud bo'ladi.

Teskarisi, autosomalarning diploid to'plamida X-xromosomalarning soni ko'paysa ($3X : 2A$), "o'taurg'ochi" organizm

rivojlanadi, tuxumdonlari kattalashgan bo'ladi va boshqa jins belgilarining o'zgarishi ham kuzatiladi. Ular, "o'taerkak" larga o'xshab nimjon tez nobud bo'ladi.

K. Bridges xulosa qiladi: demak, ikkita jinsiy X-xromosomani bo'lishi drozofila pashshasida urg'ochi organizmning rivojlanishi yoki Y-xromosomaning bo'lishi erkak organizmning rivojlanishiga olib kelishi shart emas ekan, eng muximi, X-xromosomalarning miqdorini autosomalar to'plamiga bo'lgan nisbati, ya'ni Y-xromosoma drozofilada jinsning rivojlanishida ahamiyati yo'q.

9.3. Drozofilada jinsning aniqlanishida genlar faoliyati.

Savol tug'iladi, qanday qilib X-xromosomalarning soni autosomalar to'plamining nisbati jinsning aniqlanishiga ta'sir etadi, Bridgesning balans nazariyasi bo'yicha? Oxirgi yillarda drozofilada jinsning shakllanishiga ta'sir etadigan juda ko'p genlar aniqlandi, masalan, Sxl (sex lethal), da (daughterless), sis (sisterless), tra (transformer), dsx (double sex) va boshqalar.

Tajribalar asosida aniqlanadi, X-xromosomalarning sonining autosomalar to'plamiga bo'lgan nisbatini embriogenezning boshlangich davrlarida Sxl geni qandaydir usul bilan tutib oladi. Ushbu gen jinsning har xil uchta yo'nalishidagi differentsiyalashishini boshqaradi: jinsiy belgilarni somatik hujayralari va murakkab yo'lining hujayralarida, bundan tashqari, dozaga bog'liq kompensatsiyaning rivojlanishiga (rasm 52). Ushbu jarayonlar qanday amalga oshadi?

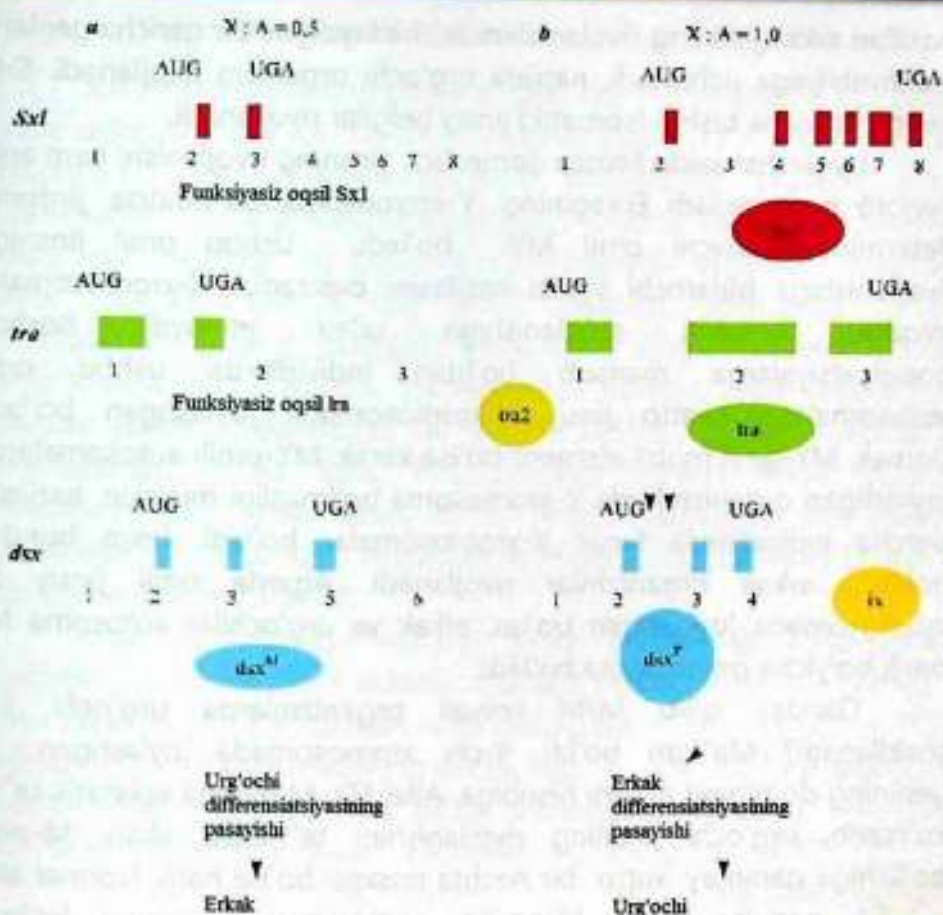
Embrionda jinsning shakllanishini dastlabki etaplarda jinsiy X-xromosomada joylashgan sis-a va sis-b genlar va autosomada joylashgan da geni ishtiroq etadi. Ushbu genlarning mahsuloti oqsilning kompleks molekulasi hosil qiladi. da genining mahsuloti onaning tuxum hujayrasiga o'tadi, uning miqdori doimo ikkita dozada bo'ladi, chunki onaning juft autosomalarda joylashgan genlarning mahsulotidir. sis-a va sis-b genlarning mahsuloti embriondagi X-xromosomalarning soniga bog'liq bo'ladi. Urg'ochi embrionning hujayralarida ikkita X-xromosoma bo'ladi, shu sababdan sis-a va sis-b genlarning mahsuloti ham ikkita dozada bo'ladi. Erkaklarda bitta X-xromosoma bo'lgan sababli, genlarning mahsulotining miqdori faqat bitta dozada bo'ladi. Ushbu mexanizm tufayli oqsil kompleksida

sis/da nisbati erkaklarda 1 : 2 to'g'ri kelsa, urg'ochilarda - 1 : 1 teng bo'ladi. Oqsil mahsulotlar jinsning aniqlashda hal qiluvchi Sxl. genning boshqaruvchi qismiga kelib tushadi. Genning boshqaruvchi qismi ikkita uchastkadan tashkil topgan bo'ladi. Ushbu uchastkalar shu genlardan RNKning transkripsiyasini faollashtiradi: erta va kechki promotorlarni RE i RL (rasm 52). Lekin oqsil kompleksi sis/da sis ning 2 dozada saqlagandagina, erta promotorning faollashtiradi. Bu jarayon embriogenezning boshlangich davrilarida, bastoderma davrida kuzatiladi. Keyinchalik transkripsiya kechki promotordan davom etadi, XX/AA, ham X/AA individlarga o'xshab. Lekin ikkala promotordan amalga oshirilgan transkripsiyaning natijasi har xil bo'ladi.

Sxl geni aminokislotalar ketma-ketligini ifodalovchi 8 uchastkadan tashkil topgan bo'ladi— ekzonlardan, oralarida ayiruvchi kodlamaydigan rayonlar joylashadi (rasm 52). Erkaklarda ($X : A = 0,5$) kechki promotorning PL faollashishi uchinchi ekzondan boshlanadi (rasm 52,a). Ekzon UGA ko'p miqdorda kodonlardan tashkil topgan bo'ladi. Har bir qodondan o'tib bo'lganida translyatsiya to'xtaydi, shu sababdan kesik hosil bo'ladi. Sxl genining normal funktsional oqsili bo'lmagan sababli keyinroq joylashgan tra geninig oqsili ham normal vazifa bajarmaydi, natijada yana qisqargan nofunktsional oqsil sintezlanadi (ikkinchi ekzonda joylashgan kodon UGA translyatsiyani to'xtadi). Lekin boshqa genning- tra2 oqsili ikkala jinsda bo'lsa ham, tra gening funktsional mahsuloti bo'lmagan sababli to'liq shakllanmaydi. Bundan tashqari, tra va tra 2 genlarning normal mahsuloti bo'lmagan sababli, "erkaklar" oqsili deb atalgan, maxsus oqsil dsxM sintezlanar ekan, chunki urg'ochi jinsiy belgilarini rivojlanishini repressiyaga uchratadi. Jarayonla ishtiroq etgan genlarning buzilishlari tufayli erkak jins shakllanadi.

$X : A \rightarrow Sxl$

- ◀ Dozali kompensatsiya
- ▶ Somatik hujayralarda jinsiy belgilar
- ◀ Homila hujayralarda jinsiy belgilar



Rasm 53. Xromosomalar balansini ko'rsatuvchi sxema. Jinsiy belgilarning rivojlanishiga *Sxl* genining ta'siri (yuqorida). Genlarning pog'onali o'zaro ta'siri natijasida erkak (a) va urg'ochi (b) (pastda) organizmlarning somatik jinsiy belgilarining rivojlanishi. Jarayonda ishtirok etadigan genlar: *Sxl*, *tra*, *tra2*, *ix* va *dsx*. Raqamlangan to'rburchaklar bilan genning kodlovchi qismlari – ekzonlar belgilangan. Ekzonlarning bo'yalgan qismlari – aminokislotalarni kodlovchi hududlar. Egri chiziq bilan intronlar ko'rsatilgan.

Urg'ochilarda ($X : A = 1$) *Sxl* genini transkriptida stop-kodoni bilan 3-chi ekzoni bo'lmaydi, natijada sifatli oqsil *Sxl* sintezlanadi. Ushbu oqsil *tra* geni bilan o'zaro bog'lanib, *tra2* genining mahsuloti bilan kompleks oqsilini hosil qiladi va urg'ochilarga xos bo'lgan *dsxF* genining RNKsini sintezlaydi (rasm 52, b). *dsxF* mahsulotining bo'lishi *ix* genini jarayonda ishtiroq etishini ta'minlaydi. *dsxF* va *ix* genlarning

oqsillari erkak jinsning rivojlanishini ta'minlaydigan bir qancha genlarni inaktivatsiyaga uchratadi, natijala urg'ochi organizm rivojlanadi. SHu sxema bo'yicha tashqi (somatik) jinsiy belgilar rivojlanadi.

Uy pashshasida *Musca domestica* jinsning rivojlanishi ham aniq genotik boshqariladi. Erkagining Y-xromosomasida odatda jinsning determinatsiyalovchi omil MY bo'ladi. Ushbu omil jinsning rivojlanishiga birlamchi signal vazifasini bajaradi. X-xromosomalar miqdori jinsning aniqlanishiga ta'sir etmaydi. Boshqa populyatsiyalarga mansub bo'lgan individlarda ushbu omil autosomalarda, xatto jinsiy X-xromosomada joylashgan bo'ladi. Demak, MY-omil mobil element bo'lsa kerak. MY-omili autosomalarda joylashgan organizmlarda Y-xromosoma bo'lmasligi mumkin, natijada barcha individlarda faqat X-xromosomalar bo'ladi, lekin bunday holatda erkak organizmlar rivojlanadi. Agarda omil jinsiy X-xromosomada joylashgan bo'lsa, erkak va urg'ochilar autosoma M-omili bo'yicha gomozigota bo'ladi.

Qanday qilib M/M liniyalı organizmlarda urg'ochi jins shakllanadi? Ma'lum bo'ldi, 4-chi xromosomada joylashgan F genining dominant allelini hisobiga. Allel FD M geniga epistatik ta'sir ko'rsatib, urg'ochi jinsning rivojlanishini ta'minlar ekan, M-omil bo'lishiga qaramay, xatto bir nechta nusxasi bo'lsa ham. Normal allel — F+ negativ holda M-omillar tomonidan nazoratda bo'ladi. SHunday qilib, dominant gen FD urg'ochilarning rivojlanishini ta'minlasa, retsessiv gen F+ — erkaklarning rivojlanishini.

Drosophila melanogaster Sxl geniga gomologik bo'lgan DNK ketma-ketligi *Musca domestica* genomida ham aniqlangan, ammo ushbu gen erkak va urg'ochilarda ham ekspressiyaga uchraydi: rivojlanish jarayonida ikkala jinsda bir xil transkriptlar va oqsillarning izoshakllari aniqlangan.

O'rta dengiz meva pashshasida *Serratitis capitata* ham Sxl *Drosophila melanogaster* geniga gomologik bo'lgan gen aniqlangan, lekin drozofilaning bu turida, uy pashshaga o'xshab, gen ikkala jinsda ham ekspressiyaga uchraydi.

Demak, har xil jinslarning rivojlanishini ta'minlovchi genlarning dastlabki signallari har xil tur hayvonlarda keskin farq qiladi.

9.4. Sut emizuvchilarda jinsning aniqlanishi.

Sut emizuvchilarning jinsini aniqlashda Y-xromosoma hal qiladi. Jinsiy xromosomalar XX- bo'lsa sog'lom urg'ochi, XY – sog'lom erkagi rivojlanadi. Lekin Y-xromosomaning bo'lmasligi urg'ochi jinsni shakllantiradi, X- xromosomalarning soni nechta bo'lishiga qaramay. Jinsiy xromosomalar XO bo'lsa, asosan urg'ochi organizi rivojlanadi, lekin norma holatdan farq qiladi. Masalan, odamlarda Turner-SHerishevskiy kasalligi uchraydi, uning jinsiy xromosomalardan faqat bitta X-xromosoma bo'ladi, ayollarga xos bo'lgan jinsiy organlar va belgilar yaxshi rivojlanmaydi va bepusht bo'ladi. Agarda nechta X-xromosomasi bo'lsa ham Y-xromosoma bo'lishi erkak belgilar rivojlanadi, lekin to'liq emas, ayrim belgilari ayollarga xos (soqolmo'ylovlar o'smaydi, tana nisbati ham ayolga xos), bepusht bo'ladi – Klaynfelter sindromi (XXU).

Erkak sut emizuvchilarning jinsiy bezlarining rivojlanishida dastlabki davrilaridayoq Y-xromosoma faol bo'lishi kerak, to'g'rirog'i u bilan birikkan testis aniqlovchi omil (testisdetermining factor — TDF). Ushbu omil Y-xromosomaning uncha katta bo'lmagan fragmentini X-xromosomaga translokatsiyasi tufayli aniqlangan, natijada jins bo'yicha inversiyali individlar rivojlanadi – erkaklari XX, va urg'ochilari XY.

Bunday o'zgarishlar ayrim 17 oilaga mansub bo'lgan individlarda aniqlangan. Masalan, inversiyali erkak sichqonlarning XXSxr X-xromosomasida Y-xromosomadan olib o'tkazilgan kichik fragmentlari aniqlangan. y da nebolshie fragmenty. Ularda testislari bo'lgan, ko'payish tizimi shikastlangan, chunki spermatogenez jarayoni anomaliyasi edi.

Odanda TDF omili asliida Y-xromosomaning kalta elkasida uzunligi 35 tpn bo'lgan SRY (sex determining region Y gene) geni ekanligi 1990 yilda aniqlangan.

SRY geni tarkibiga 80 aminokislotalardan tuzilgan oqsil molekulasini kodlovchi konservativ domen (HMG) kirgan bo'ladi. Ushbu mahsulot xususiy holda DNK bilan bog'lanib, molekulasini o'zgarishiga olib keladi. SRY-oqsili va unga o'xshash molekulalar (100tadan ortiq SRY- domeni bo'lgan oqsillar aniqlangan) bilan indutsirlangan DNK molekulasi mexanik usuli bilan uzoq masofalarga

ko'chib, transkripsiya, replikasiya va rekombinatsiya jarayonlarini boshqarishda muhim rol bajaradi.

Faqat HMG-domen SRY genini konservativ qismi bo'ladi. Boshqa qismlaridagi ketma-ketliklar kelib chiqishi jihatidan yaqin bo'lgan turlarda ham gomologik genlari bilan farq qiladi. Masalan, odamda shu gen uzunligi katta emas, intronlari yo'q, 204 aminokislotalardan tashkil topgan oqsil molekulasini qodlaydi. Uning gomologi, sichqon genomida ajratilgan, 395 aminokislotalardan tuzilgan.

SRY genidan tashqari, Y-xromosomada spermatogenezni amalga oshiradigan genlar joylashgan bo'ladi.

Genlar dozasini kompensatsiyasi. SHunday qilib, genetik jihatidan ikkala jins drozofila yoki nematodalar, shuningdek odamlarda ham, jinsiy xromosomalar soni va tarkibi bilan farq qiladi. Erkaklarida X-xromosomada joylashgan genlar bitta dozada bo'lsa, urg'ochilarida ikkita X-xromosoma bo'lgan sababli, ikkita dozada bo'ladi.

Agarda X-xromosomalardagi genlar bir xil intensivlik bilan faoliyat ko'rsatsa edi, urg'ochilarda ularning mahsuloti ikki baravar ko'p bo'lishi kerak, lekin unday kuzatilmadi.

Genlar dozasini kompensatsiya deb nomlangan mexanizm bo'ladi. A priori o'ylash mumkin, X-xromosomalardagi genlar bir xil intensivligida faoliyat ko'rsatish uchun, erkaklarda ular ikki baravar ortiq ishlashi kerak yoki urg'ochilarda X-xromosomalardan birini inaktivatsiya qilish zarur bo'ladi. Tabiat ikkala mexanizmini qo'llaydi.

Drozofilaning erkagida yagona X-xromosoma urg'ochilarning X-xromosomalarning faoliyati darajasigacha faollashar ekan, sut emizuvchilarda esa, bitta X-xromosomasi inaktivatsiyaga uchraydi, natijada genlar ekspressiyasi erkaklarning yagona X-xromosomasini ekspressiya darajasigacha kamayadi.

Genlar dozasining kompensatsiyasi to'g'risidagi asosiy ma'lumotlar drozofila lichinkalarining so'lak bezlarini politen xromosomalarni tahlil qilishi natijasidan olingan. Erkaklarida (XY) yagona politen X-xromosoma ikki baravar ingichkaroq bo'lishi kerak urhochilarning ikkita autosomal yoki ikkita X-xromosomalarga nisbatan. Lekin tsitologik preparatlarda u 25% foizga ingichkaroq bo'lib, unchalik kompakt tuzilma shaklida emas ("yumshatilgan" holatda) ekan boshqa xromosomalarga nisbatan. "YUmshatilgan"

degan atama xromatin geteroxromatin shaklida emas, balki euxromatin shaklida bo'ladi, ya'ni kompakt holdagi genetik material transkripsiya jihatidan nafaol bo'ladi, "yumshakt" material esa, RNKning sintezini yuqori darajada amalga oshiradi.

Yagona politen erkak X-xromosomasida gistsiz oqsillarning miqdori taxminan 1,5 baravar kam bo'ladi urg'ochining bitta X-xromosomasidagiga nisbatan.

"Yumshatilgan" va gistsiz oqsillar bilan boyitilgan dozali kompensatsiya uchun tuzilmaviy asos bo'lib xizmat qiladi, chunki haqiqatda ham erkakning bitta X-xromosomasida transkripsiya jarayonining intensivligi ikki baravar oshiqroq bo'ladi urg'ochining bitta X-xromosomasidagiga nisbatan.

Erkak organizmining yagona X-xromosomasini "yumshatilgan" tuzilma shakliga keltirilishi maxsus mexanizm nazoratida bo'ladi. Ushbu jarayonda beshta genning mahsulotlari: msl-1, ms 1-2, msl-3, mle (MSL-oqsillar) va mof, bulardan tashqari, kamida RNKning ikkita turi, bunday mexanizmda ishtiroq etadi. Beshta oqsillarning barchasi, oqsil kompleksni hosil qiladi va erkaklarning X-xromosomasini bir necha yuz uchastkalari bilan bog'lanadi, natijada xromosoma diffuz holatga keladi. MSL-oqsillarning har bittasi butun kompleksning normal funksiyasini bajarishda ishtiroq etadi. Dozali kompensatsiyaning kompleksi faqat erkaklarning X-xromosomasida joylashgan bo'ladi.

Ushbu kompleksni tarkibiga kirgan oqsillarni qisqa xarakteristikasini ko'rib chiqamiz.

MSL-2 oqsilning DNK bilan intensiv bog'lanish xususiyatiga ega bo'lgan maxsus qismi bo'lib, ring-finger deb nomlanadi. MSL-3 oqsili tarkibida boshqa faol qismi — xromodomen bo'ladi. Bu qism, oqsillarga xos bo'lgan xususiyatga ega, ya'ni xromatin bilan bog'lanadi. MSL-oqsillardan tashqari, ushbu jarayonda boshqa oqsillarning molekulari - N4 gistonlar ishtiroq etadi. Gistonlar odatda teskari funktsiyani bajaradi — DNK molekulasini bilan kompleksda nukleosomalarni hosil qiladi. DNK nukleosomada zich joylashib, kompakt tuzilmani hosil qiladi. N4 gistonlar, X-xromosomani dekompakt holatga olib keladigan, DNKning kompakt holatga olib keladigan N4 gistonlardan farqli ravishda modifitsirlangan bo'ladi: N4 oqsilning 16-chi o'rinda joylashgan lizin

aminokislota, atsetilirlashgan bo'ladi, ya'ni tarkibida atsetil qoldig'i bo'ladi. Bunday modifitsirlangan gistonlar (N4As16) xromosomaning MSL-oqsillar joylashgan qismlarda joylashar ekan. N4 gistonlarning modifikatsiyasini kompleks tarkibiga kirgan MOF- oqsillar bajarishi mumkin. Kak vvyasnilos, Gen mof atsetiltransferaza fermentni kodlaydi.

MSL oqsillar xromatinni transkripsiya va tuzilishini nazorat qiluvchi xromosomalarning boshqaruvchi elementlari bilan o'zaro ta'sir etadi. mle genini molekulyar tahlili bo'yicha u oldin ma'lum bo'lgan DNKning ikkala zanjirini ajratishda ishtiroq etgan genlar bilan gomologik ekan, ya'ni transkripsiya jarayonida zarur bo'lgan ferment gelikazani kodlaydi. Oqsil MLE ning tarkibida ATP-bog'lovchi domen bo'ladi, uni ko'pincha RNK-gelikaza deb atashadi. MSL oqsillar yana boshqa xususiyatga ega. Yaqinda ma'lum bo'ldiki, drozofilada MSL oqsillarga qarshi hosil bo'lgan antitanalar ham boshqa ikki qanotli hasharotlarining erkaklarining X-xromosomasi bilan bog'lanish xususiyatiga ega. Demak, xulosa qilish mumkin, dozali kompensatsiyada ishtiroq etuvchi barcha oqsillar yuqori darajada konservativ bo'ladi, dozali kompensatsiya mexanizmi esa, allaqachon evolyutsiya jarayonida paydo bo'lgan.

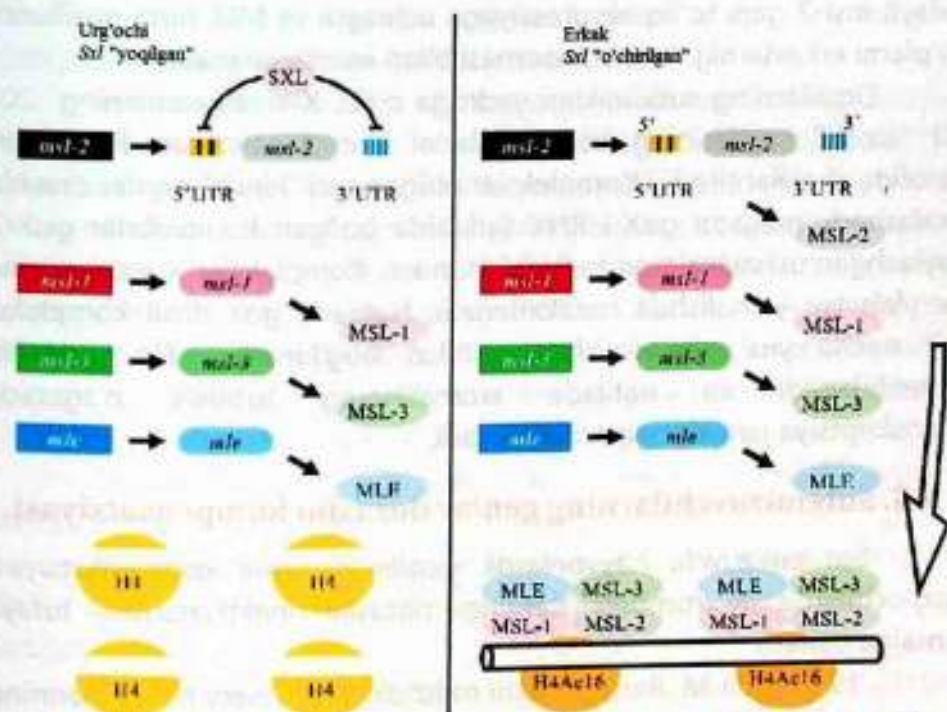
Erkaklarning politen X-xromosomalari bilan bog'lanadigan, oqsillarni kodlamaydigan yangi RNK sinfi aniqlangandi. Bunday RNKlar roX (RNA on X-chromosome) nomlanadi. Xozirgi kunga qadar ikkita gen ajratilgan goX — goX-1 va roX-2. Ikkala genda ham transkriptlar bo'ladi va faqat erkaklarga xos. RNKning bo'lishi va X-xromosoma bo'yicha tarqalishi to'liq bo'lgan oqsil dozali kompensatsiya kompleksining bo'lishiga bog'liq. Oqsillardan biri MSL — MSL-1, MSL-3 yoki MLE bo'lmagan mutant lichinkalarda erkakning X-xromosomasi to'liq RNK-oqsil kompleksi bilan qoplanmagan bo'ladi, faqat 20 dan to 40gacha saytlar aniqlanadi xolos. Ushbu saytlar kiruvchi (entry) saytlar deb ataladi, ya'ni xromatinga kirish uchastkalaridir. SHulardan ikkitasi goX-1 va goX-2 (3F va 10S rayonlari) genlarning joylashish joylariga to'g'ri keladi. Olimlarning fikricha, goX genlar atrofida sintezlanayotgan RNK bilan birgalikda RNK-oqsil dozali kompensatsiya kompleksini hosil qiladi. Bunday kompleks goX genini autosomaga o'rmayotgan joyida ham hosil bo'ladi.

goX-1 va goX-2 genlardagi nukleotidlar ketma-ketliklarini tahlil qilinganda aniqlandi, ular bir biridan farq qiladi, lekin X-xromosomada joylashish joyi bir xil. Balki, kompleks tarkibiga genlar oilasiga goX mansub bo'lgan xil RNKlar kirsa kerak.

goX genini autosomaga o'rnayotgan joyida goX-oqsil komplekslarni ko'pincha hosil bo'lish ekspansiyasi qo'shni rayonlari qolib, uzoqda joylar rayonlarga ham tarqaladi. Drozofilada dozali kompensatsiya o'sha Sxl geni nazoratida bo'ladi, ya'ni umuman jinsning rivojlanishini geni nazoratida.

Sxl genini normal oqsili predotvrashchaet urg'ochilarda dozali kompensatsiyani rivojlanishiga to'sqinlik qiladi, natijada MSL oqsillar xromosomada joylashmaydi. Sxl genini mutatsiyasi MSL oqsillar urg'ochi X-xromosomalarda paydo bo'ladi, shu bilan dozali kompensatsiya jarayoni buziladi.

Olimlarning fikri bo'yicha Sxl genining mahsuloti birinchi navbatda msl-2 geni bilan o'zaro ta'sirda bo'ladi (rasm 54).



Rasm 54. Drozofilada dozali kompensatsiyaning boshqarilish sxemasi.

X-xromosomalar soni autosomalar to'plamiga nisbatan birga teng bo'lgan urg'ochilarda Sxl geni "ishga tushgan" holatda bo'ladi, ya'ni msl-2 genining RNK translyatsiyasini amalga oshmaydi. 5'-translyatsiya kuzatilmaydigan rayondagi (5'UTR) uncha katta bo'lmagan intron msl-2 genining transkriptidan erkaklarda chetlatiladi, lekin urg'ochilarning transkriptida saqlanadi. SHunday qilib, Sxl geninig oqsili bevosita shu intronning alternativ splaysingini nazorat qiladi. msl-2 genida oqsil bilan bog'langan yana bitta SXL - 3'-uchida (3'UTR) joylashgan sayt bo'ladi. Qanday qilib ushbu tuzilmalar urg'ochilarning msl-2 genini translyatsiyasiga ta'sir etadi noma'lum, lekin msl-2 genining mahsuloti yadroga tushmaydi. Uning bo'lmasligi tufayli boshqa MSL oqsillari X-xromosoma bilan assotsiatsiya qila olmaydi, gistonlarning atsetilirlangan shakllari.

N4As16 to'planmaydi va urg'ochining X-xromosomasi transkripsiya jarayonida o'ta faol bo'la olmaydi (rasm 55).

X-xromosomaning soni autosomalar to'plamiga nisbatan 0,5 teng bo'lganida, Sxl geni ishga tushmaydi. Mahsuloti Sxl bo'lmagan tufayli msl-2 geni to'liq ekspressiyaga uchraydi va MSL ning oqsillarini to'plami erkaklarnig X- xromosomasi bilan assotsiyalanadi.

Oqsillarning subbirliklari yadroga o'tib, X-xromosomaning 20-40 "kirish" saytlarining komplekslarini sintezlanayotgan RNK goX atrofida shakllantiradi. Komplekslar etilgan sari "kirish" saytlar orasida aralashadi, natijada goX-I RNK tarkibida bo'lgan komplekslar goX-2 joylashgan uchastkalarga tushishi mumkin. Komplekslar X-xromosoma bo'ylab tsis-yo'nalishda harakatlanadi. Natijada goX-oqsil kompleksi bir necha yuz genlar-nishonlar bilan bog'lanadi, N4 gistonlar atsetilirlanadi va natijada xromatinning tuzilishi o'zgaradi, transkripsiya jarayoni giperfaollashadi.

9.5. Sutmizuvchilarning genlar dozasini kompensatsiyasi.

Sut emizuvchi hayvonlarda genlar dozasini kompensatsiyasi urg'ochilarda X-xromosomalarning bittasini inaktivatsiyasi tufayli amalga oshadi.

1949 yilda M. Barr urg'ochi mushuklarning nerv hujayralarining yadrolarida yadro materialining kompakt bo'lakchalarini aniqlaydi, erkaklarda bunday bo'lakchalar yo'q edi. Ushbu bo'lakchalar kashf

etgan olimning nomiga Barr tanachalari deb ataladi. 10 yildan keyin S. Ono xulosa qiladi, Barr tanachasi urg'ochi sut emizuvchilarning somatik hujayralaridagi bitta X-xromosoma hisobiga shakllanadi.

1961 yilda M. Layon (M. Lyon) xulosa qiladi, sut emizuvchilarda X-xromosomalarda joylashgan genlar dozasi kompensatsiyasi urg'ochining har bitta somatik hujayrasida ikkita ota-ona xromosomalarining birini inaktivatsiyaga uchrashi hisobiga amalga oshadi.

Urg'ochi sutemizuvchilarning X-xromosomasini inaktivatsiya jarayoni layonizatsiya deb nomlanadi. X-xromosomaning layonizatsiyasi embrional taraqqiyotining boshlangich darilarida kuzatiladi. proisxodit v rannem embrionalnom razvitii. Inaktiv holatdagi X-xromosoma hujayra tsiklining barcha davrlarida geteroxromatin shaklida va transkripsiya jihatidan nafaol bo'ladi; replikatsiyalanadi kech S-fazasida, autosomalar va faol X-xromosomadan keyin. SHunday qilib, urg'ochi sutemizuvchilarning X-xromosomalaridan biri kompakt holatda bo'ladi, ya'ni nafaol. Natijada X-xromosomalarning genlar dozasi erkak va urg'ochilarda tenglashadi va bitta dozani tashkil etadi.

Sut emizuvchilarning X-xromosomasida alohida inaktivatsiya markazi bo'ladi (Xic — X chromosome inactivation center). Inaktivatsiya jarayoni yagona inaktivatsiya markazida initsiatsiyalanadi, so'ng butun X-xromosoma bo'ylab progressiv tarzda tarqaladi. Inaktivatsiya qonun bo'yicha "hammasi yoki bittasi ham emas" amalga oshadi. X-xromosomaning nafaol holati embriogenezda hosil bo'lib, qiz hujayralariga barcha keyingi bo'linishlarda nasldan naslga o'tadi. Bunday alohida X-xromosomaning inaktivatsiya umumiy markazini bo'lishi kuyidagi faqtlar bilan isbotlanadi:

1) inaktivatsiyaga uchraydi butun xromosoma va ikkitasidan - bittasi;

2) retsiprok translokatsiya bilan ajratilgan X-xromosomaning faqat qismi inaktivatsiyaga uchraydi, ikkinchi qismi kompakt holatga o'tmaydi.

X-autosomalar translokatsiyalarini tekshiruvlari natijasida aniqlandi, X-xromosomaning faqat bir qismi birikkan autosomaning lokuslarini inaktivatsiya kilaoladi.

Translokatsiyalar xaritasini tuzib, odam va sichqonning mitotik xromosomalarini inaktivatsiya markazini aniqlash imqoniyati bo'ldi.

Xic markazini ifodalovchi DNK uzunligi taxminan 1 mln pn. Teng. Ushbu rayon tarkibiga X- xromosomaning inaktivatsiyasida ishtiroq etadigan bir nechta elementlar va to'rtta gen kiradi. Ularning eng asosiylari:

- Xist (X-inactive-specific transcript) — X-xromosomani inaktivatsiya holatiga olib keluvchi uzun kodlamaydigan RNKni kodlaydigan gen;

- Tsix —parallel (ma"nosiz) Xist geninig DNK zanjiridan transkripsiyalangan element, ushbu RNK Xist genining ekspressiyasini nazorat qiladi;

- Xce (X chromosome-controlling element) — ota-ona X-xromosomalaridan qaysi biri inaktivatsiyaga uchrashini aniqlaydigan gen;

- DXPas34 —CpG- asoslari bilan boyitilgan, uzunligi 3 tpn teng, Tsix faollashtirish uchun zarur bo'lgan, 34 marta taqrorlangan satellit DNK dan tashkil topgan rayon.

Xist geni bir qator o'zgacha xususiyatlarga ega: uning transkripsiyasi urg'ochining nafaol X-xromosomasi bilan bog'liq bo'ladi, Xist genining RNKsini faqat bitta X-xromosomaga ega bo'lgan individlarda, yani erkaklarda va XO ga ega bo'lgan shaxslarda aniqlanmagan. Hujayra ichida, tsitoplazma va ribosomalarda RNK Xist bo'lmagan. Demak, ushbu gen oqsilni kodlamaydi va uning RNKsini translyatsiya qilmaydi. SHu bilan birga Xist genining RNKsi hujayra yadrosida osongina aniqlanadi, Barr tanachasi tarkibida. Ko'pchilik olimlarning fikri bo'yicha shu RNK X-xromosomaning inaktivatsiyasida bevosita qatnashadi.

Xist geni odamda genom DNKsining 45 tpn ga teng bo'lgan qismini egallaydi, lekin uning 8ta ekzonini umumiy uzunligi 16,5 tpn ni tashkil etadi.

Xist genining ekspressiyasida alternativ splaysing bo'lishi aniqlangan. kDNK ning ajratilgan ko'pchilik klonlarida 4 yoki 6i ekzonlar bo'lmagan, kamdan-kam boshqa ekzonlar bo'lmagan kdonlar uchragan. Nozern-blot natijalarini tahlili yana bitta qiziq faktni aniqlashga imqoniyat yaratdi: gibridizatsiya signali diskret chiziqlar shaklida aniqlanmasdan, balki uzluksiz oynaga surtilgan yupqa qatlam

shaklida kuzatiladi. Bunday ko'rinishi Xist genining tarkibida ko'p sonli transkriptlarni bo'lishi to'g'risida dalil bo'lib xizmat qiladi. Transkriptlarning katta-kichigligi har xil bo'lib 10 ptn gacha va undan ham yuqori bo'lishi mumktn. PZR-polimeraza zanjirli reaksiya yordamida bir nechta har xil uzunligidagi transkriptlar aniqlangan bo'ladi. Demak, xulosa qilish mumkin, Xist genining transkripsiyasini initsiatsiyasi geterogen bo'lib, bir nechta initsiatsiya saytlariga ega. Bundan tashqari, ushbu start saytini yaqinida TATA-domen kuzatilmagan, lekin SAAT bloki 99 o'rinda joylashgan bo'ladi. TATA-domen minor start saytiga nisbatan 39 o'rinda (pozitsiya) joylashganligi aniqlangan.

Gen Xist geni sut emizuvchmililarnig ko'pchiligida aniqlangan. Barcha turlarning ekzonlarida uzun "o'qish" ramkalari yo'q, eng uzuni – 483 pn ga teng, ya"ni ekzonlarning umumiy uzunligini taxminan 3%ni tashkil etadi.

Xist genidan chiqqan signallarning X-xromosomaning boshqa uchastkalariga tarqalishi uchun shu xromosomaga xos bo'lgan ketma-ketliklar kerak bo'lmaydi. Lekin, inaktivatsiya signali eng effektiv tarqaladi ayni X-xromosomada.

Ushbu faktni tushuntirish uchun X-xromosomada signallarni kuchaytiradigan va uzatadigan uchastkalar borligi to'g'risida gipoteza taqlif etilgan («way stations» ili «boosters»). Bunday uchastkalarining tuzilishi, kelib chiqishi hali noma"lum, lekin o'rta meyyorda taqrorlangan ketma-ketliklardan tashkil topgan bo'lsa kerak degan ma"lumotlar yig'ilib bormoqda. LINE elementlarning joylashishi G-bo'yalgan qismlarga to'g'ri kelmaydi; ular mushuk va odamning X-xromosomasida bir tekis o'ta yarqiroq bo'yalgan bo'ladi. SHu sababdan LINE-elementlar Xist genining signallarini kuchaytirish uchun kandidatlar vazifasini bajaradigan omillar deb qarash mumkin.

Zamonaviy tushunchalar bo'yicha Xist RNKsi Xist transkripsiyasi initsiatsiya bo'lgan X-xromosomaning xromatini bilan lokal tarzda o'zaro bog'lanadi. Natijada xromosoma kompakt holatga keladi va yadro qobig'i bilan bog'lanadi, urg'ochi sut emizuvchilarda X-xromosomalardan biri zich tanachani – jinsiy xromatinni, ya"ni Barr tanachasini hosil qiladi. SHu X-xromosomadagi genlarning barchasi nofaol holatda bo'ladi shu bilan genlar dozasi ikkala jinsda tenglashgan bo'ladi.

Lekin X-xromosomadagi hamma genlar Xist genining ta"sirida inaktivatsiyaga uchramaydi. Odamning X va Y-xromosomalarning uchlarida uncha katta bo'lmagan genlar guruhi joylashgan bo'lib (psevdoautosom rayonlar - PAR), ular faol holatda qoladi. Ular X- va Y-xromosomalarda gomologik bo'ladi. Kalta elkaning uchida joylashgan PAR 1-rayon ning uzunligi 2600 tpn ga teng bo'lib, tarkibida 8ta ekzon bo'ladi. Faqat ikkita gen (320 tin) uzun elkasini uchida joylashadi. SHu psevdoautosom rayonlar meyozi jarayonida konyugatsiyalanadi va rekombinatsiyaga uchraydi.

SHunday qilib, shu razdelda ko'rib chiqqan izlanishlarning natijalari asosida xulosa qilish mumkin, jinsni rivojlanish jarayonini aniqlashda zamonaviy genetika yirik muvaffaqiyatlarga erishdi. Bir qancha ma"lumotlar olingan bo'lishiga qaramay, jins belgilarini rivojlanishi va boshqarilishi oddiy genlar o'zaro ta"siriga bog'liq, deb aytish mumkin. Evolyutsiya jarayonida dozali kompensatsiyaning kamida uchta mexanizmi shakllangan: gipertranskripsiya, gipotranskripsiya va transkripsiyaning repressiyasi. Ularning ikkitasida kodlamaydigan RNK molekulalarini ishtirogida tasodifan parallellari aniqlangan, lekin ushbu RNKlarning ta'siri natijasida olingan natijalar har xil bo'lib chiqdi.

Nazorat uchun savollar:

1. *Ginandromorf, interseks, germafroditlar va jinsning boshqa o'zgarishlari.*
2. *Jinsning aniqlanishini balans nazariyasi.*
3. *Jins aniqlanishida genlar faoliyati.*
4. *Sut emizuvchilarda jinsni aniqlanishi.*
5. *Genlarning dozasini kompensatsiyasi.*

BOB 10. ONKOGENETIKANING ASOSLARI

Hujayralar transformasiyasi va o'smalar hosil bo'lish jarayoni. O'smalar hosil bo'lishining sabablari. Onkogenlar. Antionkogenlar yoki o'smalarning supressor-genlari. Metastazlar hosil bo'lishining genetik boshqarilishi. O'smalarning ko'p pog'onali shakllanishi (o'smalar progressiyasi).

Statistika bo'yicha butun dunyoda har yili 6 mindan ko'proq asosan oltita organlarning rak kasalliklari aniqlanadi (o'pka, oshqozon, sut bezi, to'g'ri ichak, bachadonning bo'yin qismi va prostata bezi). Bemorlarning deyarli yarmi kasallikdan o'ladi. Demak, rivojlangan mamlakatlarning aholisidan har beshinchisi onkologik kasalliklardan haloq bo'ladi (yunon. "onkos" - o'sma), ya'ni onkologiya sohasidagi izlanishlar katta ahamiyatga ega va zarurdir. Xavfli o'smalarning rivojlanishida hujayralarda kuzatilgan tuzilishi va funksiyasining o'zgarishini aniqlash fundamental va nazariy ahamiyatga ega.

10.1. Hujayralarning transformasiyasi va o'smaning hosil bo'lish jarayoni.

Har bir to'qimada hujayralar miqdori, xuddi tanada egallagan to'qima hajmiga o'xshab, deyarli o'zgarmaydi. Tabiiy ravishda haloq bo'lgan hujayralar esa, yangi hosil bo'lgan hujayralar hisobiga tiklanib turadi. Tiklanish jarayonini tempi ekzogen va endogen omillar nazoratida bo'ladi. Agarda kamayish - to'ldirilish balansi qandaydir sabablarga tufayli to'ldirish hisobiga o'zgarsa, hujayralarning ortiqcha massasi hosil bo'ladi va balans o'zgarigan joyda to'qimaning giperplaziyasi kuzatiladi. Giperplaziya uzoq davom etsa, xavfsiz so'ng xavfli o'smalarga aylanishi mumkin. Xavfsiz o'sma sekin o'sadi va o'zining to'qima chegarasidan chiqmaydi, ya'ni ostida yoki yonida joylashgan to'qimalarga o'tmaydi, yoki qo'shni to'qimalarga invaziya kilmaydi va metastazlar hosil qilmaydi.

Agarda o'sma xajmi bo'yicha kichikroq bo'lsa, uning qon tomirlari bo'lmaydi, natijada ozuqa yetishmagan sababli hujayralar bo'linsa ham, tabiiy haloq bo'lgan hujayralar hisobiga jarayon tenglashadi va natijada o'sma kattalashmaydi, ya'ni o'smaydi.

Jarrohlik yo'li bilan xavfsiz o'sma yonida joylashgan va bo'linayotgan yosh hujayralari bilan birga olib tashlansa, odatda yangi o'sma hosil bo'lmaydi.

Xavfli o'smaning asosiy belgisi hosil bo'lgan joyidan atrofidagi to'qimalarga o'sib boradi, chunki qon tomirlar o'sma ichiga qarab o'sa boshlaydi. Natijada yetarli darajada ozuqa olib, o'sma o'sadi. Agarda o'sma ostidagi to'qimaga o'sib ichiga kirib ketsa, o'sma hujayralarning invaziyasi deyiladi. Invaziya — xavfli o'smaning eng birinchi belgisi hisoblanadi. Agarda o'sma hujayralari asosiy o'sayotgan joyidan uzilib, limfa yoki qon orqali organizm bo'yicha tarqaladi va boshqa organlarda o'rnashib qolsa, (ko'pincha limfa tugunlarida, jigar, o'pka), shu joylarda o'smalar o'sishini ikkilamchi manbai hosil bo'ladi, ya'ni metastaz jarayoni kuzatiladi (rasm 54).

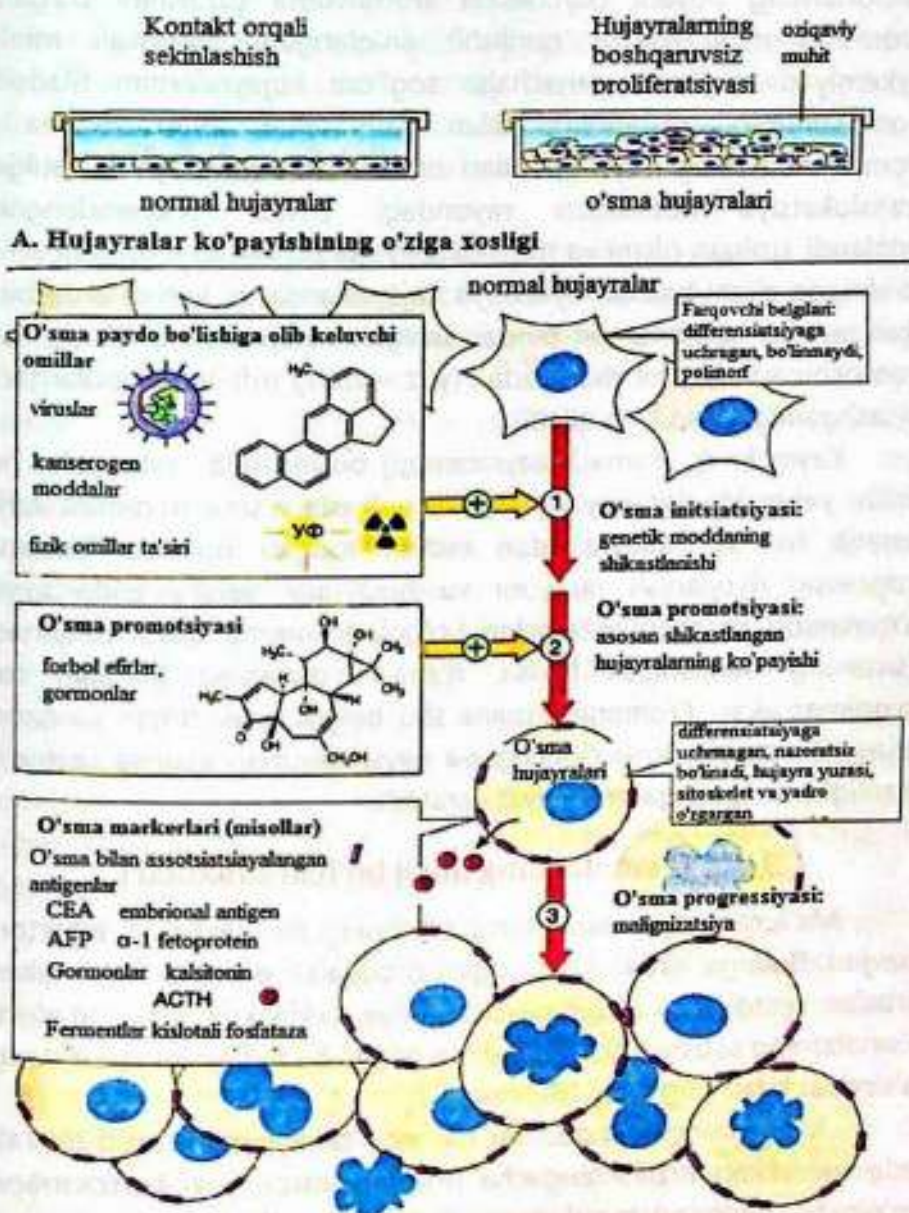
Ayniqsa mikrometastazlar juda xavfli bo'ladi, chunki o'smalar o'sish joylari juda mayda bo'lib, uni aniqlash qiyin va olib tashlash ham qiyin. O'smani aniqlash mumkin bo'lganda, o'sma ancha katta bo'ladi va o'smalarni tarkibida yuz millionlar hujayralar bo'ladi: o'smada hujayralar miqdori 108 yetganda, uni rengen nurlari yordamida ko'rish mumkin bo'ladi, miqdori 109 bo'lsa uni palpasiya bilan aniqlash mumkin. Bemor haloq bo'lishi mumkin qachonki o'smada hujayralar soni taxminan 1012 bo'lganda, chunki bunday kattalikdagi o'sma hayot uchun muhim bo'lgan organlarni asaosiy vazifalarining buzilishiga olib keladi.

Har qanday o'smaning hujayralarini genetik jihatidan o'xshash bo'lgan (singen) hayvonga o'tkazish va o'tkazilgan o'smani hosil qilish mumkin. Natijada bunday o'sma chegarasiz o'saveradi, qancha marta o'tkazilsa, shuncha o'sish davom etadi. O'smalarning rivojlanishi avtonom tarzda amalga oshadi, chunki sog'lom hayvonga o'tkazilganda ham, o'sishi davom etadi.

Xavfli o'smalarga atrofidagi to'qimala ta'sir etmaydi, natijada ular boshqa territoriyalarga invaziya qiladi va boshqa begona to'qimalar orasida ham bermalol o'saveradi.

Xavfli o'smaning yana bitta ajralmas xususiyati hujayralarining abadiyligi. Normal hujayralar o'limqa mahkum, ya'ni ularning hayot

siklida programmashtirilgan o'lim — apoptoz bo'ladi. Sun'iy usulda o'stirilganda ular ma'lum marta bo'linib, haloq bo'ladi. O'smalarning hujayralari bo'linish me'yorini bilmaydi xo organizmda bo'lsin, xo sun'iy usulda o'stirilayotganda.



B. Hujayralar transformatsiyasi

Rasm 55. Kanserogenez sxemasi

Xavfli o'sma uchun ayniqsa juda muhim va majburiy bo'lgan belgisi uning monoklonalligi. Xavfli o'sma bitta genetik o'zgargan hujayradan rivojlanadi, ya'ni genetik jihatdan bir xil hujayralar avlodidir. Monoklonallik xususiyati DNKsini tahlili natijasida isbotlangan. Masalan, mieloid leykemiya bilan kasallangan bemorlarning deyarli barchasida xromosoma tuzilishini o'zgarishi (xromosomaning qayta qurilishi) aniqlangan. Surunkali mieloid leykemiyada oq qon tanachalar sog'lom hujayralardan filadelfiya xromosomasini mavjudligi bilan farq qilar ekan (9 va 22 xromosomalarning uzun yelkari orasida translokatsiya kuzatilgan). Translokatsiya kuzatilgan rayondagi DNKsi sekvenirlanganda aniqlandi, uzilgan qismi va translokatsiyaga uchragan fragmentlarning qo'shilgan qismi barcha leykemiya hujayralarida va bemorlarda bir xil ekan, ammo bemorlar bir biridan uzilgan va birikkan DNK qismlarini xromosomada har xil masofada (yuz – ming juft nukleotidlargacha) joylashganligi bilan farq qiladi.

Keyinchalik, o'sma hujayralarning bo'linishida mutasiyalar hosil bo'lib, yangi klonlar paydo bo'ladi, natijada o'sma to'qimasi tarkibi genetik har xil hujayralardan tashkil topgan bo'ladi. O'smaning progressiv rivojlanish jarayoni va hujayralar seleksiyasida avvalgi to'qimaning belgilari asta-sekin yo'qoladi, ammo qaysi to'qimadan o'smaning rivojlangan bo'lsa, o'sha to'qimaning belgilari to'liq yo'qolmas ekan. O'smaning mana shu belgisi qaysi organ va qanday hujayralardan paydo bo'lganligi va qaysi davolash usuliga sezuvchan ekanligini aniqlashga imqoniyat yaratadi.

10.2. O'smalarning hosil bo'lish sabablari.

Ma'lumki, o'smalarni hosil qilishning bir necha xil inuktorlari mavjud. Bularga kiradi: kanserogen moddalar, o'smalar hosil qiluvchi viruslar, rentgen va ultrabinavsha nurlar. Lekin ko'pincha, to'g'rirog'i o'smalarning asosiy qismi tasodifan paydo bo'ladi, ya'ni indusirlangan ta'sirotlar bilan bog'liq holda emas.

1. Kanserogen moddalar har xil - oddiylardan tortib (SS14) to juda murakkab tuzilishlarigacha (metilxolantren yoki benzantrapien). Ko'pincha ularning ta'siri o'xshash biologik effekt rivojlanishiga olib

keladi, ya'nn o'smalar hosil qiluvchi hujayralarni ko'payishini stimullashtiruvchi mutasiyalarni hosil bo'lishiga

Kanserogen moddalarga yaqin keladi bitta-ikkita paydo bo'lgan o'sma hujayralarning o'sishi va bo'linishiga imqoniyat yaratgan moddalardir - kanserogenezning promotorlari. Ushbu moddalar kimyoviy kanserogenezning muhim komponentidir, chunki normal to'qima ichida paydo bo'lgan yakka, yolg'iz o'sma hujayralari odatda atrofidagi to'qima ta'sirida bo'lib, ko'paymaydi, ya'ni o'smaga aylanmaydi va latent holatda yillar davomida saqlanadi. Promotorlar normal to'qimaning ta'sirotni yo'qotadi va kuchli kanserogen omil vazifasini bajaradi.

Kanserogen moddalar (promotorlar ham) odamda juda ko'p o'smalarning rivojlanishiga sababchi bo'ladi, masalan, ko'midagi forbol efiri (kanserogenning promotori) "mo'ri tozalovchi" rak kasalligini sababchisi bo'ladi, anilin esa, kraska zavodini ishchilarida - siydik pufagini, nikotin - o'pkaning rak kasalliklarning sababchilari bo'ladi.

2. O'smalar hosil qiluvchi viruslar. Bular bo'lishi mumkin o'zida retroviruslar saqlaydigan DNK yoki RNK tutuvchi viruslar. Ularning barchasi noyob xususiyatga, ya'ni hujayra-xo'jayinning genomi bilan integratsiya qilaoladi.

3. Birinchi marta o'sma hosil virus 1910 yilda P. Raus tomondan tovuqlarda aniqlangan. Sarkoma o'smasidan olingan hujayrasiz filtrat organizmga yuborilganda yangi o'smalar rivojlandi. Infisirlangan agent vazifasini RNK-saqlovchi retrovirus bajargan edi (Raus sarkomaning virusi), ya'ni virus bo'lib, uning RNK molekulasida teskari transkriptaza fermenti yordamida DNK sintezlanadi va hujayra-xujayin genomiga borib birikadi.

Genotipning roli. O'smalarning ko'pchiligii kelib chiqishida asosiy sabab genetik o'zgarishlar: har xil mutasiyalar va genomning reorganizasiyasi. Ayrim holatlarda bu tanlanishning natijasidir. Tanlanish usuli yordamida sichqonlarning toza liniyalari - 100% xavfli o'smalarning rivojlanishiga olib keladigan (leykozlar, sut bezlarning rak kasalligi, o'pka raki)hayvonlar hosil qilinadi. Leykozlar va sut bezlarining rak kasalligining kelib chiqishi ham genotip, ham virusga bog'liq bo'lsa, o'pka rak kasalligini rivojlanishi organizmning genotipi va kanserogen moddaga bog'liqdir. Lekin, olimlarning fikricha o'smalarning rivojlanishi asosan genotipga bog'liq, ya'ni hujayra

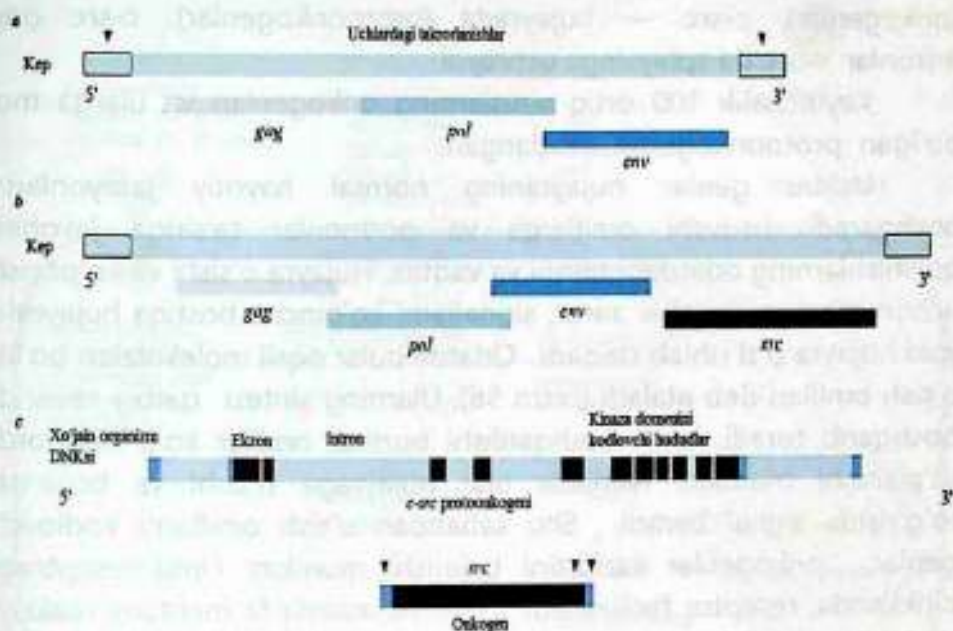
normal bo'lishining nazorat qiluvchi genlarning mutasiyalari natijasida kelib chiqadi. O'smalar progressiyasining stadiyalari va metastazlarning hosil bo'lish jarayoni ham genlar nazoratida bo'lsa kerak.

10.3. Onkogenlar.

Xavfli o'smalarning rivojlanishi genotipga bog'liq ekanligini ikkita faktlar tasdiqlash mumkin: 1. Nasllanadigan o'smalar bilan o'smalarning hujayralarida maxsus xromosoma qayta qurilishlarning korrelyatsiyasi. 2. O'smalarning xavflilik xususiyatini stabiligi, transformirlangan hujayralarga va hujayra bo'linishida avloddan avlodga o'tishi.

Xavfli o'smalarning rivojlanish jarayoni genetik nazoratda bo'lishini bevosita tasdiqlanishi viruslarda harorat sezuvchi mutasiyalarni hosil qilishida aniqlandi. 1970-yillarning boshida sarkoma virusining harorat sezuvchi mutantlar hosil qilinadi. Mutantlar maxsus harorat ta'sirida normal hujayralarni rak hujayralariga aylantirish xossasiga ega bo'ladi. Demak, bunday harorat ta'sirida ekspressiyaga uchraydi faqat bitta genning mutant shakli, lekin o'sma hujayralariga transformasiya qilish va bunday xususiyatni saqlash uchun yetarli ekan. Ushbu mutasiyani boshqa harorat ta'sirida inaktivasiya qilish, hujayrani normal holatiga olib keladi. Shunday qilib, xulosa qilinadi, sarkoma virusida bitta gen bo'lib, o'smaning xavfliligini hosil qiluvchi va saqlovchi vazifasini bajaradi. Mana shu gen onkogen deb nomlandi. 1981 yilda tovuqning sarkoma virusidan birinchi onkogen ajratildi — src (rasm 55).

Onkogenlar tutuvchi retroviruslar ichida Raus sarkomaning virusi o'ziga xos tuzilishiga ega, chunki viruslarning hayot sikli uchun zarur bo'lgan uchta geni saqlangan: gag, pol i env. Boshqa onkogen viruslarda shu genlarning bitta yoki ikkitasi qisman yoki to'liq yo'qolgan bo'ladi, transformasiyalangan onkogenni biriktirish uchun, ya'ni almashgan bo'ladi. Shu sababdan transformasiyalangan virusning zarrachalari shakllanishi mumkin faqat hujayra ichida, bunday hujayrada normal (defekt bo'lmagan) transformasiya bo'lmagan yordamchi-virus bo'lib kuzatilmagan funksiyalarni kompensasiya qiladi.



Rasm 56. Siphonning leykemiya virusini strukturasi (a) va Raus sarkomani (b), hamda *src* onkogenini va protoonkogenini *c-src* (v). *gag* — virusning kapsid oqsilini kodlovchi gen, *pol* — teskari transkriptazani, *env* — virusning glikoprotein qobig'ini.

Viruslarning LTR tarkibida transkripsiyani boshqaruvchi signallarini ko'pchiligi bo'ladi: inisiyasiya, transkripsiya va poliadenilirovaniyani va boshqalar.

Tez orada aniqlanadi, *src* genini sun'iy ravishda hujayraning genetik apparatiga o'tkazilganda, virus bo'lmasa ham, hujayra transformasiyaga uchraydi. Bundan keyin viruslarning boshqa onkogenlari aniqlanadi: *myc*, *ras*, *abl* va boshqalari. Demak, o'smalarning viruslari o'zicha o'smaning rivojlanishini ta'minlamas ekan, viruslar onkogenni hujayraning genetik apparatiga o'tkazadi va unga biriktiradi. Agrda virusning genetik apparatidan onkogenni olib tashlansa, virus ko'payadi, hujayra genomiga kiradi, lekin xavfli o'smani hosil qilmaydi.

Umurtqali hayvonlarning normal hujayralari tarkibida bo'ladi gen *src* ga o'xshagan, Raus sarkomaning virusini tarkibiga kirgan, lekin identik bo'lmagan, DNK fragmentlari. Shu sabdan genom va virusning ketma-ketliklari har xil nomlanadi: *v-src* — viruslarda

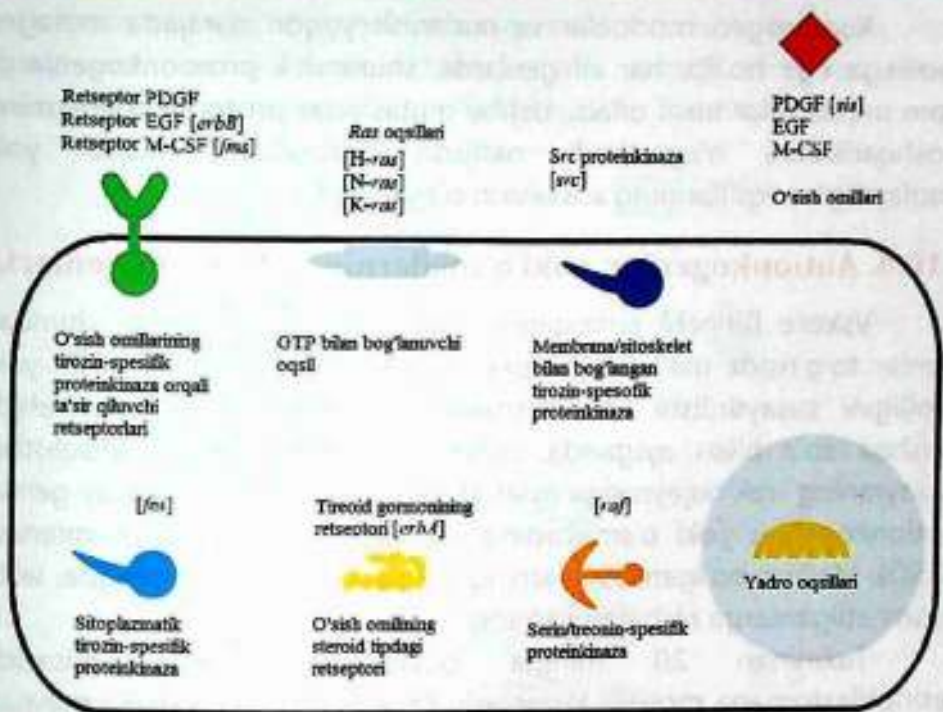
(onkogenlar), c-src — hujayrada (protoonkogenlar). c-src dagi intronlar v-src da splaysinga uchraydi.

Keyinchalik 100 ortiq viruslarning onkogenlari va ularga mos bo'lgan protoonkogenlar aniqlangan.

Ushbu genlar hujayraning normal hayotiy jarayonlarini boshqaradi: usuvchi omillarga va gormonlar ta'siriga javobini, bo'linishlarning odatdagi tempi va vaqtini. Hujayra o'sishi va ko'payishi uchun maxsus signallar zarur, signallarni ko'pincha boshqa hujayralar yoki hujayra o'zi ishlab chiqadi. Odatda bular oqsil molekulalari bo'lib, o'sish omillari deb ataladi (rasm 56). Ularning sintezi qatbiy ravishda boshqarib turadi, lekin boshqarilishi buzilsa, omillar ko'p miqdorda to'planishi mumkin. Natijada ular hujayraga o'sishi va bo'linishi to'g'risida signal beradi, Shu sababdan o'sish omillarni kodlovchi genlar, onkogenlar vazifasini bajarishi mumkin. Omil reseptorga birikkanda, reseptor faollashadi, ayrim holatlarda fermentativ reaksiya shaklida, masalan, maxsus oqsillar fosforillashadi. Reseptorlarning ayrim shikastlanishlari natijasida, ular o'sish omili bo'lmasa ham, faollashishi mumkin va o'sishi kerak bo'lishi to'g'risida uzuluksiz signal berishib turadi. Shikastlanishi tufayli reseptorning geni onkogenga aylanadi. Hujayraning o'sishi to'g'risidagi signallarni yetqazish faqat o'sish omillari va ularning reseptorlari bilan chegeralanmaydi. Signallarni hosil qilish va o'tkazishda bir qancha boshqa oqsillar ham qatnashadi, jarayon esa, ko'pincha bitta oqsil ikkinchi oqsilni fosforildaydi, ikkinchisi – uchinchisini va h.k. Ushbu zanjirlarning ishtiroqchilarini kodlovchi genlar onkogen rolini bajarishi mumkin.

Signallarni o'tkazish zanjiri hujayraning yadrosida tugaydi. Yadroda transkripsiya omillari faollashadi, ya'ni maxsus genlarning boshqaruvchi uchastkalari bilan bog'langan va ularni faollashtiruvchi oqsillardir.

Bu oqsillar hujaraning o'sishi va ko'payishi uchun zarur bo'lgan oqsillardir. Transkripsiyani kodlovchi genlar orasida onkogenlar ham bo'lishi mumkin (rasm 56). Shunday qilib, hujayraning o'sish va ko'payishini to'g'risida signal beruvchi oqsillarni kodlovchi genlar potensiai onkogenlar bo'laladi, chunki shikastlanganda yoki ushbu genlarning boshqarmagan holda faollashishi tufayli, hujayralar rak hujayralarqa aylanadi.



Rasm 57. Hujayraning o'sishi va bo'linishi to'g'risidagi signallarning hujayra qobig'idan to hujayra yadrosigacha o'tishining asosiy bosqichlari.

Xulosa qilish mumkin, viruslarning rivojlanish siklida xujayinning genini (odam yoki sichqonni) "ushlab" olish davri bo'ladi va natijada xo'jayin hujayralari onkogen rolini bajaradiv.

Protoonkogenlarning faollashtirishini bir qancha usullari mavjud bo'ladi, natijala ular avtonom holatga o'tadi (rasm 58). Odatda har xil kanserogen omillarning ta'siri protoonkogenlarning doimiy faollashgan holatda turishiga olib keladi. Masalan, xromosomalardagi translokatsiyalar tufayli protoonkogen yangi joyga o'tib qolishi mumkin – faollashgan promotorning nazoratiga. Natijada, protoonkogen tinmay ishlaydi va hujayra bo'linishlar siklidan chiqaolmaydi (myc) yoki membranadan yadroga (ras) tinimsiz signallar yuborib turadi yoki o'sish omillarining sintezini amalga oshiradi.

Ayrim o'smalarni viruslarining tarkibida onkogenlar bo'lmaydi, lekin xromosomaning protoonkogeni joylashgan joyiga birikib, uni faollashtiradi, ya'ni uzuluksiz ekspressiya hosil qiladi. Bunday voqeaga "kiritilgan" kanserogenez deyiladi.

Kanserogen moddalar va nurlanish yuqori darajada mutagen faollikga ega bo'lib, har xil genlarda, shunidek protoonkogenlarda ham mutasiyalar hosil qiladi. Ushbu mutasiyalar protoonkogenlarning boshqarilishini o'zgartiradi, natijada nazoratdan chiqadi yoki kodlaydigan oqsillarining xossalari o'zgartiradi.

10.4. Antionkogenlar, yoki o'smalarning supressor genlari.

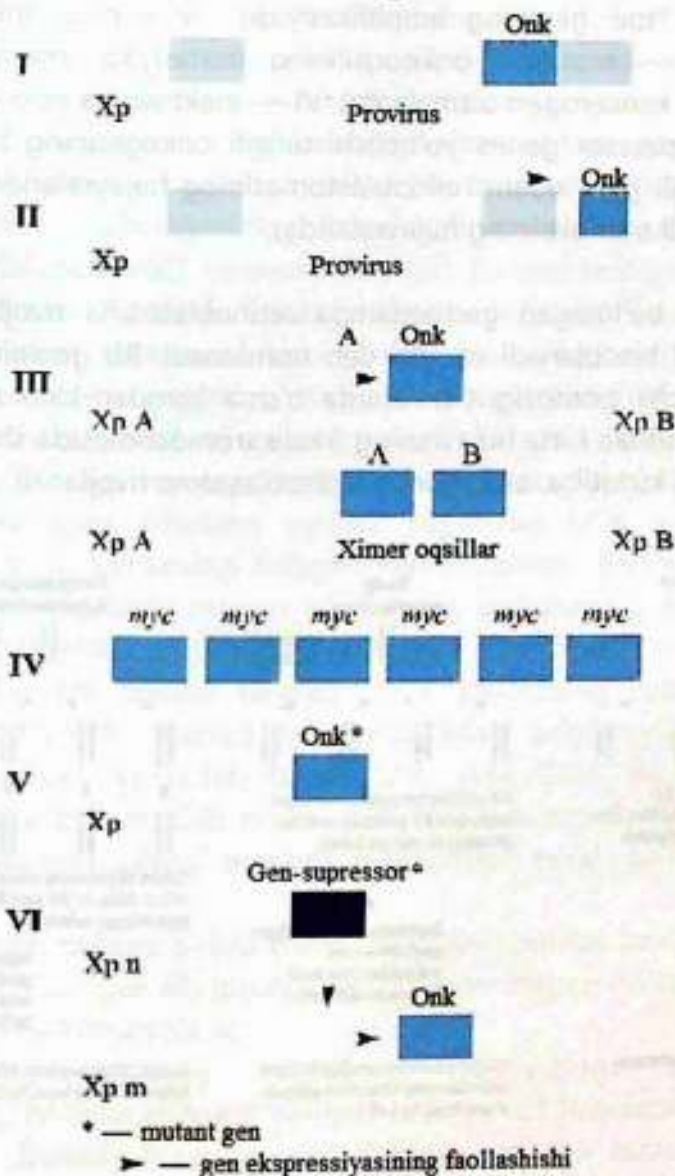
Vskore Birinchi onkogenlar kashv etilganidan so'ng, shunday genlar to'g'risida ma'lumotlar paydo bo'ladi, ularning yo'qolishi yoki faolligini susaytirilishi ham o'smalarning rivojlanishiga olib keladi. Boshqa so'z bilan aytganda, ushbu genlarning oqsil mahsulotlari hujayraning rak hujayrasiga aylanishga yo'l qo'ymaydi. Bunday genlar antionkogenlar yoki o'smalarning supressor genlari deb nomlanadi (GSO). Ma'lum bo'lgan GSO larning miqdori ko'payib bormoqda, lekin kashv etilganlarga nisbatan kamroq.

Taxminan 20 mingta bolalarning ichidan bittasida retinoblastomaga moyillik kuzatiladi. Kasallikning ikkita shakli mavjud: irsiy va irsiy bo'lmagan. Irsiy shaklida o'smalar ikkala ko'zda ko'p miqdorda rivojlansa, irsiy bo'lmagan shaklida esa, bir dona o'sma hosil bo'ladi va faqat bitta ko'zda.

60-chi rasmda retinoblastomani induksiya qilgan mutant genining nasllanish sxemasi ko'rsatilgan. Taxmin qilinadi, irsiy shakli bilan kasallangan bemorlarda o'smani rivojlantirish supressor geni xromosomaning bittasida faolligini yo'qotdi. Shu sababdan shu genning mutasiyasi bo'yicha geterozigotalar genetik jihatidan rak kasalligiga moyil bo'lib qoladi. Ushbu lokusning birinchi somatik mutasiyasi shu hujayrani mutasiya bo'yicha gomozigota holatiga aylantiradi va natijada o'sma rivojlanadi. Shunday qilib, retinoblastoma ikkita mexanizm bo'yicha rivojlanadi: bittasi - mutasiya generativ hujayralarida kuzatilsa, ikkinchisi - somatik hujayralarida.

I — virusning onkogeni: virusning genomini bir qismi xo'jayin xromosomasiga kirgani (provirus). Onk - retroviruslarning onkogenlari, masalan, *sre*, *myc*, *ras*, *erb*; Xr — xo'jayinning xromosomasi. II — hujayra onkogenning faollashishi birikkan provirus tufayli (masalan, sichqonlarning sut bezlarini rak kasalligida onkogen onkogen Int-1). III — xromosomning translokatsiyalari — uzulishi va har xil

xromosomalarning fragmaetlarini qo'shilishi natijasida yahlit bitta yangi xromosomani hosil bo'lishi, natijada onkogenning faollashishi yoki yangi onkogenning hosil bo'lishiga olib kelishi mumkin.

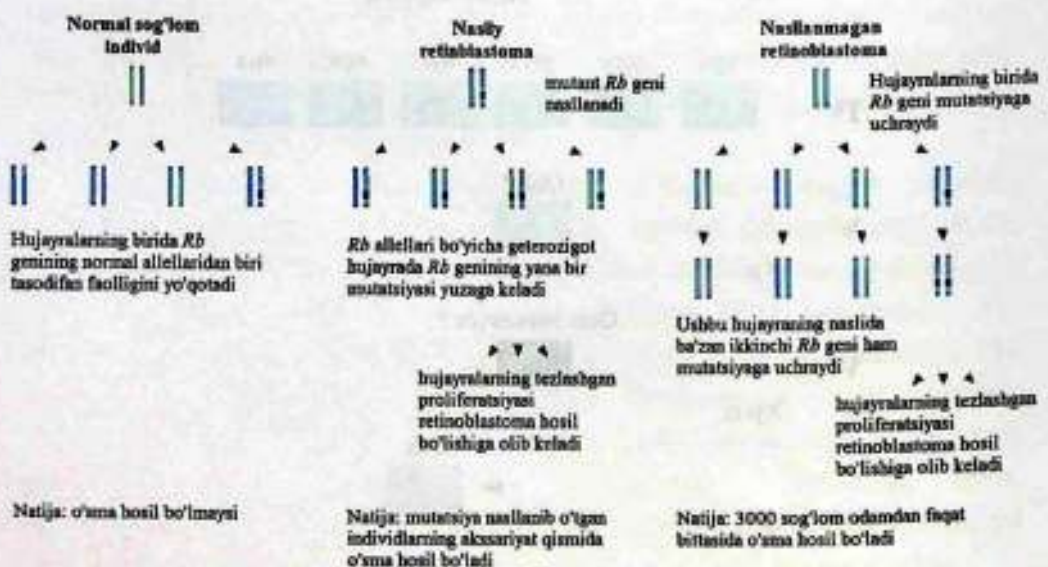


Rasm 58. Onkogenlarning kelib chiqishi va follaishi.

Birinci voqeada indamas gen faol turgan promotor yoki hujayraning enxanseri nazoratiga tushadi va faollashadi (masalan, gen myc Berkitt limfomasida). Ikkinchi voqeada, uzulgan – qo'shilgan joyda ximer oqsilini kodlaydigan yangi ximer geni hosil bo'ladi

(masalan, ximer genining oqsili bsg-abl surunqali mieloleykozda). IV — protoonkogenning amplifikatsiyasi (nusxalar miqdorini ko'payishi) tufayli o'smalarning transformatsiyasi kuzatiladi (nerv sistemasining o'smalarida tue genining amplifikatsiyasi) V — protoonkogenning mutatsiyasi — mutant onkooqsilining mutatsiyasi (masalan, c-ras spontan va kanserogen o'smalarda). VI — inaktivatsiya yoki o'smaning o'sishini supressor genini yo'qolishi tufayli onkogenning faollashishi (masalan, RB geni odam retinoblastomasining hujayralarida; gen r53 odam har xil o'smalarining hujayralarida).

Faol bo'lmagan gen odamda retinoblastoma rivojlanishining jiddiy omili hisoblanadi va Rb deb nomlanadi. Rb genining normal alleli bo'yicha gomozigot bolalarda o'sma kamdan-kam rivojlanadi, agarda tasodifan bitta hujayraning ikkala xromosomasida shu genning mutatsiyasi kuzatilsa, ana shunda retinoblastoma rivojlanadi.



Rasm 59. Rb geni mutatsiyasining sxemasi va odamda retinoblastomaning irsiy va irsiy bo'lmagan shakllarining rivojlanishi.

Keyingi izlanishlarda aniqlanadi, Rb genining faolligini yo'qolishi faqat retinoblastomani emas, balki har xil o'smalarning rivojlanishini

sababchisi bo'ladi. Rb geni 1986 yilda klonlangan bo'lib, genomda 180 tpa ga teng joyini egallaydi va molekulyar massasi 110 kDa bo'lgan oqsilni kodlaydi. Ko'pchilik normal hujayralarda gen faol ravishda o'z funksiyasini bajaradi, uning maxsuloti hujayra bo'linishlarda asosiy "tormoz"lardan biri bo'lib xizmat qiladi. Rb genining funksiyasi hujayrani mitotik sikldagi harakatini nazorat qilishdir. Hujayralar ko'payishda hujayra siklining bir nechta fazasi o'tadi. Muhim fazalari — hujayralarning bo'linishi yoki mitoz (M); DNK sintezidan oldingi faza (G1); DNK replikatsiyasining fazasi (S); undan keyin bo'linishga tayyorgarlik fazasi (G2) va yana mitoz (M). Bundan tashqari, hujayralar o'tishi mumkin G1 dan S fazaga emas, balki G0 fazaga. Hujayra siklining bitta fazasidan ikkinchi fazasiga o'tish qat'iy ravishda boshqaraladigan jarayon. Hujayra siklini ma'lum etaplarida "tekshiruvchi nuqtalar" (checkpoints) bo'lib, maxsus oqsillar aniqlaydi, hujayrada hamma narsa joyidaligi, siklnig keyingi fazasiga o'tishiga tayyor ekanligini. Masalan, agarda hujayrada DNK shikastlangan bo'lsa, signal orqali keyingi fazaga o'tish to'xtatiladi. Bunday tekshirish tizimi katta miqdorda maxsus oqsillarning bo'lishini talab qiladi. Sikl bo'yicha harakatlanishga ruhsat berishda hal qiluvchi rolini siklinlar oilasiga kiruvchi oqsillar bajaradi. Ular oqsillarning fosforillanishini amalga oshiruvchi maxsus fermentlar bilan bog'lanadi — siklinga bog'liq bo'lgan kinazalari bilan (SZK, yoki Cdk). Faqat siklinlar kompleksida bo'lgan Cdk o'zini oqsil - nishonlarini fosforillashtiradi, natijada siklning keyingi fazasida maxsulotlari kerak bo'lgan genlar faollashadi.

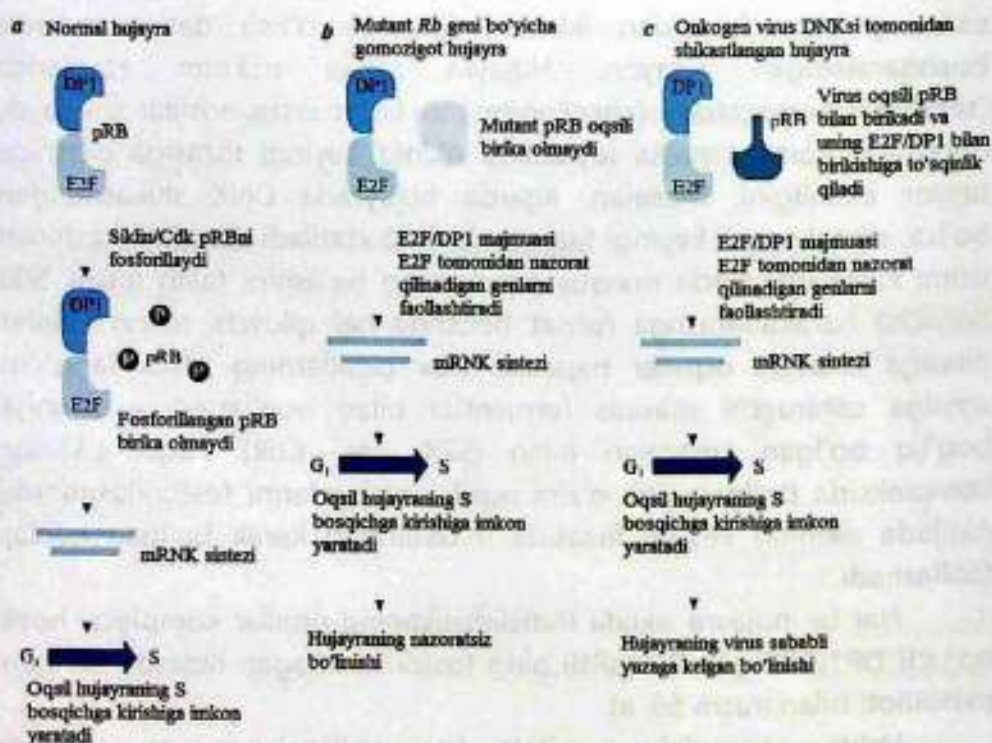
Har bir hujayra siklida transkripsiyaning omillar kompleksi hosil bo'ladi DP1/E2F gen Rb (pRB) ning fosforillanmagan holatda bo'lgan maxsuloti bilan (rasm 59, a).

Ushbu kompleks DNKning replikatsiyaga tayyorlanish jarayonida ishtiroq etmaydi, natijada hujayra G1 fazasidan S fazaga o'tmaydi. Bunday holat saqlanganicha hujayra G1 fazasida turgan bo'ladi.

Agarda pRb oqsil siklin/siklinga bog'liq kinaza ta'sirida fosforillanmasa, u transkripsiya omillari bilan DP1/E2F boshqa bog'lanmaydi. Ozod bo'lgan molekula DP1/E2F hujayra S-fazaga o'tish uchun faollashishi kerak bo'lgan genlarning boshqaruvchi qismlari bilan bog'lanadi va ularni ishga soladi.

Agarda hujayradagi ikkala gomologik genlar mutant holatda bo'lishsa, Rb oqsil o'z fuksiyasini bajarmaydi, ya'ni kompleks DP1/E2F bilan bog'lanmaydi, natijada S-fazasiga o'tish jarayoniga javobgar bo'lgan genlar faollashmaydi. Hujayraning bo'linishi ko'proq kuzatiladi, normaga nisbatan (rasm 59, b).

Ayrim onkogen viruslar (masalan, adenoviruslar, virus SV40) o'zining onkogenlari tufayli o'smalarning o'sishini ta'minlaydi. Onkogenlar kodlaydigan oqsillar pRb oqsili bilan kompleks hosil qiladi, natijada transkripsiya omillari bilan bog'lana olmaydi DP1/E2F (rasm 59, v).



Rasm 60. Hujayra siklining G₁ bosqichdan S bosqichga o'tishida pRb oqsilining roli.

Boshqa o'sma hosil qiluvchi supressor geni p53 deb nomlanadi (p — protein, 53 — molekulyar massasi, kDa). Ushbu genning ajratilgan mutant allellari, ularning miqdori 3400 ortiq, odamda kuzatilgan barcha tipdagi o'smalarning 50% ni tashkil etadi. r53

genining ta'siri programlashtirgan hujayralar o'limi – apoptoz jarayonini nazorat qilishda ishtiroq etishdir.

DNK zararlanishi

p53 geni



*p53*ning noma'lum usul bilan stabilizatsiyasi

p53 oqsili



Gen faollashishi

WAF1

Promotor



Cdk

Kinaz faollik



Kinaz faollikning yo'qligi



Sikning G1 bosqichda to'xtashi

Rasm 61. DNK tuzilishining buzilishi tufayli hujayra siklining G1 bosqichda to'xtab qolish jarayoni bosqichlari.

Agarda hujayra siklini o'tayotib qaysidir tekshirish nuqtada to'xtab qolgan bo'lsa, masalan DNK ning shikastlanishi natijasida, hujayrada qanday o'zgarishlar kuzatiladi. Birinchi yo'li — shikastlangan DNKning maxsus reparatsiya fermentlari yordamida qayta tiklash. Agarda reparatsiya amalga oshmasa, hujayra apoptozga uchraydi. Maxsus hujayra tizimlari ishga tushib, hayot uchun muhim tuzilmalarni buzilishiga olib keladi, natijada hujayra haloq bo'ladi.

Aniqlanmagan sabablarga ko'ra DNKning shikastlanishlari p21 oqsilini kodlaydigan WAF1 genini faollashtiradi va p53 oqsilini stabillashtiradi. Hujayrani G1 fazasidan S-fazaga o'tishi uchun zarur bo'lgan kinazaning faolligiga p21 oqsili to'sqinlik qiladi.

Ushbu mexanizmlar tufayli onkogen xususiyatlarga ega bo'lgan hujayralar halok bo'ladi.

Yuqorida aytib o'tilganidek cyc/Cdk oqsil kompleksi hujayraning G1 fazasidan S-fazaga o'tishini stimullashtirish xossasiga egadir.

p53 genining maxsuloti bo'lgan oqsil har xil genlarning boshqaruvchi hududlari DNKsi bilan bog'lanishi mumkin bo'lib, transkripsiya omili shaklida ta'sir etadi (rasm 61). p53 dan signal qabul qiluvchi genlardan biri WAF1 dir, uning maxsuloti - r21oqsili bo'lib, cyc/Cdk majmuasi bilan bog'lanadi, natijada kinaza faolligiga to'sqinlik qiladi va G1dan S-fazaga o'tishiga yo'l qo'ymaydi. Lekin p53 oqsili normal hujayrada stabil bo'lmagani tufayli r21 oqsili kam miqdorda sintezlanadi.

Hujayrani G1 fazada to'xtatish uchun genlarini faollashtirish kerak. Normal hujayraning genlarini faollashtirishini eng oddiy usuli DNK molekulasida shikastlarni hosil qilishdir, masalan, nur bilan ta'sir etish. Natijada DNKdagi o'zgarishlar oqsil r53 stabillashtiradi va 60 rasmda ko'rsatilgan jarayonlar ketma-ket amalga oshadi.

Hujayra G1 fazada to'xtab qolishi natijasida DNKsining reparatsiya tizimini induksiya qilishi uchun vaqt beriladi. Agarda DNKning shikastlari juda yuqori darajada kuzatilgan bo'lsa, ularni qayta tiklashning imqoniyati bo'lmasa, hujayra apoptoz holatiga uchraydi. Apoptozni induksiya qilish r53 genini asosiy vazifasidir.

p53 genining mutasiyasi bo'yicha gomozigota-hujayralarda WAF1 geni faollashmaydi, cyc/Cdk faolligini yo'qotish uchun r21 oqsili

sintezlanmaydi, natijada hujayra G1 fazada to'xtaydi va apoptoz kuzatilmaydi. Shikastlangan DNKga ega bo'lgan hujayra S-fazga o'tadi. Mana shularning barchasi rak kasalligini rivojlanish xavfligini kuchaytiradi.

10.5. Metastazlarning kuzatilishini genetik nazorati.

Zamonaviy onkologiyaning asosiy muammolardan biri, metastazlarning rivojlanishini mexanizmlarini aniqlash: nima sababdan o'sma hujayralari boshqa begona territoriyalarda ham o'sadi, qanday qilib o'sma hujayrasida boshqa to'qima hujayralarning hujayra aro moddasi bilan aloqa qilish xususiyati paydo bo'ladi. 1984 yilda mts-1 geni klonlangan bo'ladi. Ikki xil liniyalarning sichqonlarning CSML-100 va CSML-0 o'sma hujayralari tahlil qilingada niqlandi, CSML-0 liniyali sichqonlarda metastazlar hosil bo'lmadi. CSML-100 liniyada uzunligi 0,55 tpn teng bo'lgan mRNK aniqlangan, CSML-0 liniyada esa, aniqlamagan. Ushbu mRNK metastazlar hosil qiluvchi ko'pchilik o'smalalarda aniqlanadi, mts-1 genini ishtiroq etishi to'g'risidagi isbotlovchi dalillar trasgen hayvonlar ustidagi tajribalar asosida isbotlangan. Agarda sichqonning tuxum hujayrasining yadrosiga gen mts-1 ni saqlaydigan konstruktsiya yuborilsa, so'ng ushbu transgen sichqonlarni xuddi shu liniyadagi, lekin sut bezining rak kasalligini rivojlanishiga o'ta moyil bo'lgan sichqonlar bilan chatishtirilganda, hosil bo'lgan avlodlarning ko'pchiligida ham sut bezlarida, ham o'pkada, metastazlar tufayli o'smalar rivojlangan bo'ladi.

10.6. O'smani shakllanishining ko'p bosqichliligi (o'smaning progressiyasi).

Rak kasalligi bilan kasallanish xavfi insonning yoshi o'tgan sari ortib boradi: masalan, 40 yoshdagi insonlarda 100000 sidan 8ta bemor aniqlangan bo'lsa (Angliya va Uel's ayollardagi ma'lumotlar), 60 yoshdagi insonlarda — taxminan 60 atrofida, 70 yoshdagilarda - 120. Kasallanish xavfi insonning yoshi o'tgan sari ortib borishi, o'smalarning ko'pchiligini rivojlanishi ko'p bosqichli bo'lib, bir nechta genlarning mutasiyalarini to'plab borishi (akkumulyasiya) tufaylidir.

Birinchiidan, o'smaga qon tomirlarning o'sib chiqishi bir qator genlarning nazoratida bo'ladi. Keyin, o'smaning hujayrasi

boshlangich o'sma massasida uzilib va metastazlar hosil qilish xossasiga ega bo'lishi uchun kadxerin-katenin genlarning mutasiyalari bo'lishi kerak. Ushbu genlarning maxsulotlari barcha epiteliy hujayralarni o'zaro bog'lab birgina yahlit sistemani hosil qiladi. Odamda o'smalarning hosil bo'lishi bo'yicha statistik ma'lumotlarga ko'ra, oxirgi 10 yil mobaynida hujayrada 6-7 mutasiya yig'ilganda, rak kasalligi rivojlanar ekan. Masalan, yo'g'on ichakning xavfli o'smasini rivojlanishida bir qator stadiyalar kuzatiladi. Avvalambor, gen-supressor ARS (adenomatous polyposis coli) yo'qoladi, natijada kichik hajmdagi o'sma paydo bo'ladi. Agarda DNKning gipometilirlanishi qo'shilsa, I sinfdagi adenoma hosil bo'lishi mumkin (yo'g'on ichak yoki to'g'ri ichakning epiteliy to'qimasidan o'sib chiqqan kichkina polip). So'ng, agarda mutasiya tufayli protoonkogen K-ras onkogenga aylansa, o'sma kattalashadi (II sinflangi adenoma). Bundan keyin o'smaning supressorini DCC mutasiyasi bo'yicha gomozigotizatsiya kuzatilsa, o'sma undan ham kattaroq bo'ladi va III sinfdagi adenomaga aylanadi.

r53 genining ikkala nusxasini yo'qolishi xavfsiz adenomani xavfli karsinomaga aylantiradi. Boshqa qandaydir genlarning yo'qolishi esa, metastazlarning rivojlanishiga olib keladi.

Nazorat uchun savollar:

1. *Hujayralarning transformatsiyasi va shsmaning hosil bo'lish jarayoni.*
2. *O'smalarning paydo bo'lish sabablari.*
3. *Onkogenlar. Antionkogenlar, yoki o'smalarning supressor genlari.*
4. *Metastazlarning hosil bo'lish jarayonining genetik nazorati.*
5. *O'smani shakllanishining ko'p bosqichlilik (o'smaning progressiyasi).*

11 BOB. GENETIK MUHANDISLIKNIING ASOSLARI

Genetik muhandislikning fermentlari. Restriktazalarning tavsifi (xarakteristikasi). Rekombinant DNKlarni konstruksiya qilish. Yangi genni hujayraga kiritish. Bakteriya hujayralari bilan genetik manipulyasiyalar o'tkazish. Sut emizuvchilarning hujayralariga genlarni kiritishi. Genoterapiya. CRISPR ning genlar tahriri texnologiyasi.

11.1. Genetik muhandislikning fermentlari.

Restriktaza va polimerazalarining xarakteristikasi. Gen injeneriyasi – organizmlar genlari yoki genlar majmuasining faoliyatini ko'zlagan holda o'zgartirilishiga aytiladi, ya'ni rekombinant DNK va RNK hosil qilish, genlarni hujayradan (organizmdan) ajratib olish, genlar bilan har xil manipulyasiyalar qilish, va genlarni boshqa hujayralarga (organizmaga) o'tkazishda, usullar va texnologiyalar majmuasini qo'llashdir. Ushbu usullarning maqsadi hujaraning irsiy, genetik apparatini o'zgartirish. Natijada, ko'p sonli mutant-bakteriyalar hosil qilish va maqsadga muvofiq ulardan ajratib olish va qo'llash. Biologiyaning muhim kashfiyotlardan biri, bu kimyoviy va radiasion mutagenezni hosil qilish. Lekin, mikroorganizmlarning imqoniyatlari tuzilish xossasi bilan chegaralangan bo'ladi. Masalan, mikroorganizmlar o'simliklarda, ayniqsa dorivorlarida to'planadigan qimmatli moddalarni sintezlana olmaydi. Odam va hayvonlarning hayotiy jarayonlari uchun zarur bo'lgan bir qator fermentlar, peptid gormonlar, immun oqsillar, interferonlar va faqat odamda va hayvonlar organizmida sintezlanadigan boshqa oddiy birikmalarni bakteriyalar sintez qila olmaydi. Olimlar o'simlik va hayvon hujayra va to'qimalarni sun'iy usulda o'stirish usuli bilan chegaralarni chetlatish uchun harakat qilishgan va qilmoqda. Oxirgi o'n yillar davomida olimlar o'simlik va hayvonlarning to'qima hujayralarini organizm tashqarisida,

ya'ni sun'iy usulda o'sishga va ko'payishga majbur qilish usullarini yaratadi, guyo bakteriyalarga o'xshab.

Rekombinant DNKlarning konstruksiya qilishda qo'llaniladigan fermentlarni bir nechta guruhlariga ajratish mumkin:

- DNK fragmentlarni hosil qilishda qo'llanadigan fermentlar (restriktazalar);
- DNK matrisasida DNK sintezini amalga oshiruvchi fermentlar (polimerazalar) yoki RNKni (teskari transkriptazalar);
- DNK fragmentlarini bir biriga ulaydigan fermentlar (ligazalar);
- DNK fragmentlarini uchlaridagi tuzilmalarini o'zgartirish imqoniyati bor bo'lgan fermentlar.

Restriktazalar. Restriktazalar (restriksiya qila oladigan endonukleazalar, restriksiyaning endonukleazalari) - bular fermentlar bo'lib, DNK molekulasiining nukleotidlari ma'lum ketma-ketliklarini (restriksiya saytlari) aniqlaydi va hujum qiladi. 1953 yilda aniqlangan edi, E. soli ma'lum shtammni DNKsini olib boshqa shtammdagi bakteriyaga yuborilganda (masalan, shtamm V DNKsini -shtamm S hujayralariga), DNKning faolligi kuzatilmadi, chunki tezdagina fragmentlarga bo'linib ketdi. 1966 yilda aniqlandi, bunday holat xo'jayin DNKsini maxsus modifikatsiyasiga bog'liq ekanligi tufayli kelib chiqadi, molekula tarkibida bir necha metilirlangan asoslar buladi, modifikatsiyalanmagan DNKda kuzatilmaydi. Metilirlanish (asosga metil guruhi birikadi) replikasiya tugashidan keyin kuzatiladi. Bakteriya o'zining DNKsini modifikatsiyasi tufayli boshqa, har qanday begona DNKdan ajrata oladi. "Nishon" hosil qilish uchun javobgar modifikatsiyaning metilirlangan fermentlari, ya'ni DNK-metilazalar. Modifikatsiyadagi farqlar begona DNKni restriksiya fermentlariga sezuvchanlik hosil qiladi, natijada ular kerakli saytlarda metil guruhning bo'lmasligini aniqlaydi.

Restriksiya va modifikatsiyalar bakteriyalarda keng tarqalgan; ularning kuzatilishi rezident DNKni boshqa begona nukleotidlar ketma-ketliklari bilan "ifloslanishidan" himoya qiladi. Metilirlanmagan DNKni parchala oladigan restriktaza 1968 yilda Mezel'son va Yuan tomonidan aniqlangan. Ushbu ferment DNKning ma'lum ketma-ketliklariga nisbatan o'ta xususiylikka ega, lekin boshqa uncha uzoqda bo'lmagan joyda joylashgan molekula qismlarini ham nospesifik tarzda parchalashi mumkin. Yaqin orada, 1970 yilda Smit va Vil'koks

Haemophilus influenzae dan birinchi restriktazani ajratib olishadi. Ushbu ferment DNKning ma'lum tartibdagi ketma-ketliklarni (Hind III) parchalash xususiyatiga ega bo'ladi. Har xil bakteriyalar o'zining DNKsini o'zgacha nishonlagan tufayli, restriktazalar ham bunday ketma-ketliklarni "tanish" kerak. Haqiqatda ham, o'sha vaqtdan beri 150tadan ortiq restriksiya saytlarini (DNKni parchalash joyi) aniqlovchi restriktazalar ajratilgan.

Polimerazalar. Birinchi marta DNK-polimerazani Kornberg o'z kasbdoshlari bilan 1958 yilda E. Coli dan ajratib olishadi.

E. coli (Pol I)ning DNK-polimerazasi I ikki zanjirli halqa shaklidagi DNK bilan bog'lanmaydi. Lekin, agarda bunday molekulalarini denaturatsiya qilinsa va bir zanjirli shakllari hosil bo'lsa, ana shu holatdagi molekulalar bilan polimeraza bog'lanar ekan. Bog'langan molekulalar miqdori ushbu uchastkalar uzunligiga to'g'ri proporsional, taxminan – bitta molekula 300ta nukleotidlarga to'g'ri keladi. Pol I ikki zanjirli DNK spiralini bir zanjirli uzilgan qismlari 3'-gidroksil 5'-fosfat bilan va ikki zanjirli DNK molekulasining uchlari bilan bog'lanadi.

Ferment monomer polipeptid zanjiri bo'lib, molekulyar massasi 109 kDa teng va 3- domen tuzilma shaklida bo'ladi. Har bir domen o'zining fermentativ faolligiga ega: 5' - 3' polimeraza, 3' - 5' ekzonukleaza, 5' - 3' ekzonukleaza.

1. 5'—3' polimeraza faolligi. Reaksiya uchun kerak bo'ladi bir zanjirli DNK-matrisa va unga komplementar fragment praymer 3'-ON uchi bilan.

2. 3'—5' ekzonukleaza faolligi. Bir yoki ikki zanjirli DNKni 3'-ON uchi tomonidan gidrolizlaydi. 3'—5' nukleaza faqat DNK ning komplementar bo'lmagan uchastkalarda diefir bog'ni uzadi. Ma'lumki, polimeraza reaksiyalarida o'sayotgan zanjirga komplementar bo'lmagan nukleotidlar ham tushib qolishi mumkin. Lekin polimeraza bunday nukleotidni zanjirga bog'la olmaydi. Shu sababdan 3'—5' ekzonukleaza "yordam beradi", ya'ni adashgan nukleotidni olib tashlaydi va o'rniga komplementar – to'g'ri bo'lgan nukleotid kelib birikadi. 3'—5' ekzonukleolitik faollilik DNK sinteziga qarshi yo'nalishda amalga oshadi (rasm 8). Shunday qilib, DNK-polimerazaning 3'—5' ekzonukleaza faolliligi matrisadan polimerizasiyani aniqlik bilan o'tishida muhim rol bajaradi. Ushbu

ekzonukleazaning effektivligi yoki jarayonning davralarini miqdori optimal sharoitda polimeraza faolligining subbirliklarini davrilari soniga nisbatan 2% ni tashkil etadi.

3. 5'—3' ekzonukleaza faolligi. Ikki zanjirli DNKning bitta zanjirini bo'sh 5'-uchidan boshlab degradasiyaga uchratadi. 3'—5' ekzonukleazadan farqli ravishda 5'—3' ekzonukleaza faqat komplementar bo'lgan ikki zanjirli DNKning diefir bog'ini uzadi. Bundan tashqari, agarda 3'—5' nukleaza bir uzushda faqat bitta nukleotidni olib tashlasa, 5'—3' nukleaza 5'- uchidan boshlab uzunligi o'ntagacha oligonukleotidlarni uzishi mumkin (gidroliz mahsulotlarini 20% atrofida). Nukleazaning nukleotidlarning olib tashlash tezligi kuzatilayotgan polimerizasiya jarayonidan bir tartib yuqori bo'ladi. Natijada DNK gidrolizining mahsulotlarida oligonukleotidlarning nisbiy miqdori ko'payadi.

Fermentlar faolligini bunday birga kuzatilishi E. coli DNK-polimeraza I siga shikastlangan DNKning in vivo sharoitida reparatsiya jarayonida faollik rolini bajarishga imqoniyat yaratadi. N - uchli domen aminokislotalarning qoldiqlaridan tashkil topgan qo'shni halqa bilan bog'langan bo'lib, proteolitik fermentlar yordamida osongina ajraladi. Qolgan qismi bifunksional bo'ladi, chunki polimeraza va 3' - 5' ekzonukleazadan tuzilgan bo'ladi va Klenov fragmenti deb nomlanadi (tasvirlagan olimning nomi bo'yicha). Klenov fragmenti funksiyasini bajarish uchun matrisali osDNK (Mg) 3'-ON-uchi bo'sh bo'lgan promotor- zatravka bo'lishini talab qiladi. Klenov fragmenti DNK-polimerazaning I molekulyar massasi 76 kDa atrofida bo'lgan polipeptid zanjirini bir qismi bo'ladi, uning tarkibida 5'→3'-ekzonukleazaga mos keladigan domen bo'lmaydi.

DNK-polimeraza I va uning fragmenti ham, radiaktiv nishonlangan dezoksiribonukleotidlarni sintezlanayotgan DNK zanjiriga nik-translyasiya usuli yordamida kiritishda qo'llaniladi, ya'ni dsDNK molekulaning bir zanjirini uzunasi bo'yicha uzishini siljishida 3'-ON-uchi fermentlar uchun zatravka bo'lib xizmat qiladi. Polimerizasiya jarayonida DNK-polimeraza I 5'→3'-ekzonukleaza yordamida matrisa bo'ylab siljiydi, Klenov fragmenti esa, DNK zanjirini 5'-uchidan boshlab bo'shatadi, ya'ni nukleotidlarini asta-sekin olib tashlaydi. Bundan tashqari, Klenov fragmenti kDNK ning ikkinchi zanjirini sintezi uchun, Senger usuli bo'yicha DNKning sekvenirlash,

"to'rttoq" uchlar hosil qilib, 5'- chiqib turgan DNKning "yopishqoq" uchlarini to'ldirish, radiaktiv nishonni kiritish va fermentning 3'→5'-ekzonukleazasi yordamida DNKning restriksiya fragmenlarining 3'-chiqib turgan qismlarini olib tashlash vazifalarni bajaradi.

11.2. Teskari transkriptaza.

Teskari transkriptaza mRNKning transkripsiyasida DNKni ikkinchi komplementar zanjirini hosil qilishda qo'llaniladi. Genomi bitta zanjirli RNKdan tashkil topgan retroviruslarni tekshirilganda aniqlangan bo'ldi, hujayra ichi rivojlanish jarayonida retrovirus o'zining genomini ikki zanjirli DNK molekulasi shaklida xo'jayin -hujayra xromosomasiga integratsiya stadiyasini o'tadi. 1964 yilda Temin RNK-matrisa asosida komplementar bo'lgan DNK sintezini amalga oshiradigan virus xususiylik ferment bo'lishi to'g'risida gipotezani taqlif etadi. Faqat 1970 yilda Temin va Mizutani, va ularga bog'liq bo'lmagan holda Baltimor ushbu fermentni Raus sarkomaning virusini hujayra tashqarisidagi virionlar preparatida ajratishga muvaffaq bo'ldilar, otkrili iskomiy ferment v preparate vnekletochnix virionov virusa sarkomi Rausa. Bunday ferment RNKga bog'liq bo'lgan DNK-polimeraza teskari transkriptaza yoki revertaza deb nomlandi.

Qushlarning retroviruslarini revertazasi yaxshi o'rganilgan. Har bir virion tarkibida ushbu fermentning 50 molekula atrofida bo'lar ekan. Teskari transkriptaza ikkita subbirliklardan tuzilgan — a (65 kDa) va r (95 kDa), polimer tarkibida ekvimolyar miqdorda bo'lib, kamida uchta fermentativ faollikga ega: 1) DNK-polimerazali, matrisa vazifasini RNK ham, DNK ham bajarishi mumkin;

2) RNKazi N ning faolligi bilan, gibril RNK—DNKda tarkibidagi RNKni gidrolizlaydi, lekin, bir yoki ikki zanjirli RNKni emas;

3) DNK-endonukleazali faolligi bilan.

Birinchi va ikkinchi tipdagi faolliklar virus DNKsini sintezi uchun zarur, endonukleaza esa, virus DNKsini hujyra-xo'jayin genomiga integratsiyasi uchun Tozalangan teskari transkriptaza DNK sintezlaydi RNK- ham DNK-matrisasida. Sintezni boshlash uchun revertazaga, boshqa polimerazalarga o'xshab, kaltagina ikki zanjirli uchastok (praymer). Praymerom bo'lib xizmat qilishi mumkin reaksiya

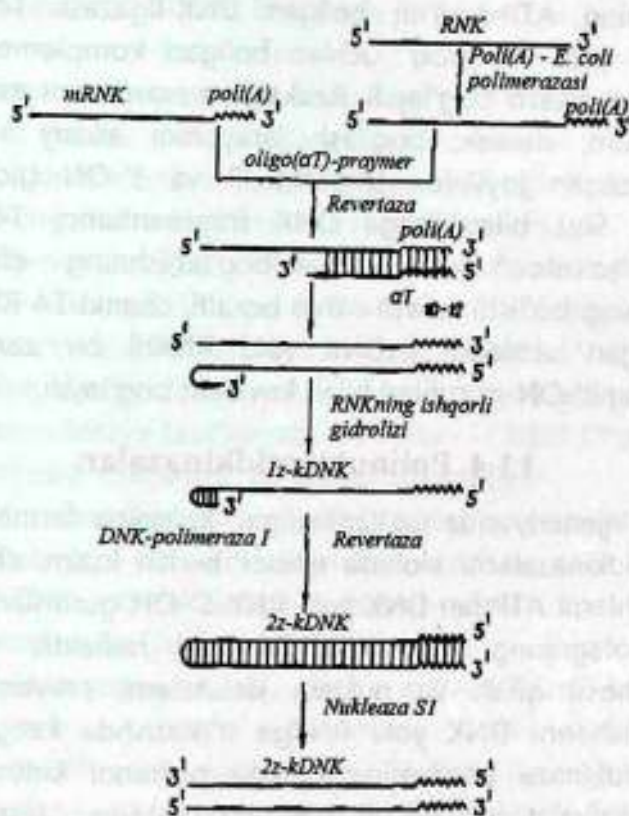
jarayonida yangi sintezlangan DNK zanjiri bilan kovalent bog'langan bir zanjirli RNK va DNK segmentlari.

Teskari transkriptaza asosan qo'llaniladi matrisali RNKdan komplementar DNK ning hosil bo'lishida (kDNK) (rasm 61). Teskari transkripsiya reaksiyasini maxsus yaratilgan sharoitda RNKning faolligini kuchli ingibitorlari yordamida olib boriladi. Natijada RNK molekularining to'liq razmerlardagi DNK-nusxalarini olishga erishildi. Teskari transkripsiyada poli (A)-tutuvchi mRNKni praymer vazifasini i oligo (dT) bajaradi, 3'-poli (A) uchlari bo'lmagan RNK uchun—kimyoviy usul yordamida sintezlangan 3'-RNK uchiga tekshirilayotgan RNKga bo'lgan koiplementar oligonukleotidlar, mRNK asosida komplementar bo'lgan DNK sintezidan va RNKning parchalanishidan keyin (odatda ishqor bilan ishlov beriladi) DNKning ikkinchi zanjirini sintezi kuzatiladi. Bu jarayonda revertazaning 3'-uchida bir zanjirli kDNK o'zining komplementar bo'lgan qismlarini hosil qilish xossasi bilan foydalaniladi va mana shu qismlar praymer vazifasini bajaradi. Matrisa bo'lib kDNKning birinchi zanjiri xizmat qiladi. Ushbu reaksiya revertaza bilan ham katalizlanadi, E. Coli ning DNK-polimerazasi I bilan ham. Ikkala fermentlarning birga bo'lishi tufayli sifatli ikki zanjirli kDNK hosil qilish imqoniyatini yaratadi. kDNKning ikkala zanjiri sintezlangandan so'ng, ikktnchi zanjirin hosil qilishda praymer vazifasini bajargan DNK qismlari orqali o'zaro kovalent bog'langan bo'ladi.

Hosil bo'lgan halqani endonukleaza S1 yordamida nuklein kislotalarning maxsus bir zanjirli qismlarini parchalanadi. Hosil bo'lgan uchlari har doim to'mtoq bo'lmaydi. Keyingi klonlashning effektivligini ko'tarish uchun Klenov fragmenti va E. coli ning DNK-polimerazasi I yordamida to'mtoq uchlari hosil qilinadi.

Hosil bo'lgan ikki zanjirli kDNKni klonlanayotgan vektorlarga kiritish, DNK gibrid molekulari tarkibida ko'paytirish va keyingi izlanishlarda qo'llash mumkin bo'ladi.

1961 yilda Mezel'son va Veygl aniqlashadi, rekombinasiya jarayoni uzilish va DNK molekulasini qayta tiklanishini o'z ichiga oladi. Ushbu ma'lumot asosida olimlar DNK fragmentlarini bir biriga ulaydigan fermentlarni izlashadi. Mana shunday ferment 1967 yilda aniqlanadi va DNK-ligaza deb nomlanadi. Ferment ikki zanjirli nuklein kislotaning molekulasida fosfodiefir bog'ining sintezini katalizlaydi.



Rasm 62. RNK molekularidan ikki zanjirli DNK ning nusxalari sintezi sxemasi

11.3 Ligazalar.

Ikki zanjirli DNKning bir zanjirli uzilishlarda DNK-ligaza yordamida fosfodiefir bog'larning hosil bo'lishi, restriksiyaga o'xshab, in vitro sharoitida rekombinant DNKning sintezlash jarayonida asosiy etaplardan biri hisoblanadi. DNK-ligazalarni, AMR donori sifatida qanday kofaktor qo'llanishiga qarab, ikkita oilaga ajratishadi: 1) ATP-bog'liq bo'lgan ligazalar, ular bakterial va eukariotik viruslar, achitqilar, eubakteriyalar va sutemizuvchilarda aniqlangan.

2) NAB⁺-bog'liq bo'lgan DNK-ligazalar, ular faqat eubakteriyalarda aniqlangan, entomopoksviruslar, hasharotlar *Melanoplus sanguinipes* va *Amsacta moorei* dan tashqari.

Xozirgi kundagi gen-injener izlanishlarda ko'proq qo'llaniladi T4 bakteriofagning ATP-bog'liq bo'lgan DNK-ligazasi. T4-DNK-ligaza "yopishqoq" yoki "to'mtoq" uchlari bo'lgan komplementar dsDNK fragmentlarini o'zaro bog'laydi. Reaksiya mexanizmini asosida xulosa qilish mumkin, demak, bog'lash jarayonini asosiy sharti bo'lib, DNKning uzilgan joylarida 5'-uchini R va 3'-ON gidroksillarning bo'lishidir. Shu bilan birga DNK fragmentlarini T4-DNK-ligaza yordamida "to'mtoq" uchlari orqali bog'lanishning effektivligi T4-RNK-ligazaning bo'lishi tufayli oshib boradi, chunki T4-RNK-ligaza 5'-fosforilirlangan uchlarni osDNK yoki RNKni bir zanjirli nuklein kislotalarning 3'-ON-guruhlarini bilan kovalent bog'laydi.

11.4. Polinukleotidkinazalar.

Gen injeneriyasida qo'llaniladigan ko'pgina fermentlar orasida polinukleotidkinazalarni alohida e'tibor berish lozim, chunki ular γ -fosfat guruhlarni ATPdan DNK yoki RNK 5'-OH guruhlarga o'tkazadi. T4 bakteriofagning polinukleotidkinazasi radiaktiv nishonlangan zondlarni hosil qilish va nuklein kislotalarni sekvenirlash uchun radiaktiv nishonni DNK yoki RNKga o'tkazishda keng qo'llaniladi. Polinukleotidkinaza yordamida DNKga nishonni kiritishida ikki xil tipdagi reaksiyalar qo'llaniladi: bevosita reaksiya, ferment γ -fosfat guruhni DNKning defosforilirlangan 5'-uchiga bevosita yetqazadi va almashinuv reaksiyasi. Almashinuv reaksiyada reaksiyaning aralashmasida ADRning ortiq miqdorini bo'lishi tufayli polinukleotidkinaza majbur bo'ladi fosfat guruhni DNK ning 5'-uchidan ADP ga, ATRni hosil qilib, o'tkazishga, bo'shagan OH-guruh esa, yana γ -fosfat bilan fosforilirlashadi odatdagi mexanizm bo'yicha.

Terminal transferaza. Osushestvlyayet posledovatel'noe prisoedinenie AMR iz pula dezoksiribonukleozidtrifosfatov k 3'-OH-gruppam molekul DNK, ispol'zuetsya dlya vvedeniya radioaktivnoy metki v sostave mechenix nukleotidov v 3'-koni DNK. Dezoksiribonukleozidtrifosfatlardagi AMRni DNK ning molekulasini 3'-OH- guruhlarga ketma-ket biriktirish vazifasini bajaradi. Nishonlangan nukleotidlarning tarkibidagi radiaktiv nishonni DNK 3'-uchidagi fragmentlarga (ayniqsa kDNK) gomopolimer nukleotidlar ketma-ketliklarni (konnektorlarni) keyinchalik klonlash uchun.

Ishqorli fosfatazalar Klonlashning effektivligini kuchaytirish uchun qo'llaniladi. DNK yoki RNK ning 5'-fosfat guruhlarini chetlatish reaksiyalarini katalizlab, ribo- va dezoksiribonukleozidtrifosfatlarning makroergik bog'larini uzadi. Ularni nuklein kislotalarning fragmentlarini 5'-uchli radiaktiv nishon R ga kiritish uchun tayyorlashga qo'llaniladi va DNK vektor molekulalarining o'zaro bog'lanishga qarshilik qiladi.

Gen injeneriyasida nukleazalar. E.coli Ekzonukleazasi III. Fag X nukleazasi. SI-nukleaza. RNKaza A. DNKaza I. E. coli ekzonukleazasi III 5'-nukleotidlarni dsDNKdan ketma-ketlik bilan 3'→5' yo'nalishda ajratish reaksiylarni katalizlaydi. Ferment apurinizirlangan DNKga nisbatan endonukleaza faolligigaga, RNKaza H (RNK-DNK-gibridlarda RNK gidrolizi) va 3'-fosfataza faolligiga ega bo'ladi.

Fag X ekzonukleazasi 5'-uchli fosfat guruhleri bo'lgan 5'-mononukleotidlarni birin-ketin ajratish reaksiylarini katalizlaydi. Ferment osDNK molekulalarini hosil qilishda va keyinchalik sekvenirlash uchun qo'llaniladi.

Aspergillus orizae (35 kDa, 267 a. o.) nukleaza S1si Zn ionlari bo'lgan muhitda bir zanjirli uzulishlar va ikki zanjirli DNKning halqalarida osDNK va RNK larni, 5'-fosforilirlangan mono- i oligonukleotidlarni hosil qilib, xususiy parchalaydi, lekin noto'g'ri juftlashgan nukleotidlarni emas. Bunday xususiyatlar loviyaning (mung bean) va P1 *Penicillium citrinum* nukleazalariga xosdir.

Oshqozon osti bezining ribonukleazasi A (RNKaza A) uncha katta bo'lmagan oqsil bo'lib, (124 a.o.), endoribonukleaza faolligiga ega. Ferment xususiy tarzda pirimidin asoslarni orasidagi fosfodiefir bog'larni svyazi uzadi. Gidroliz reksiyalarni maxsulotlari 3'-fosforilirlangan pirimidin mononukleotidlar va oligonukleotiddar bo'lib, uchida pirimidin-3'-monofosfatlar joylashadi. Sut emizuvchilarning ko'pchilik to'qimalarida maxsus oqsil ingibitor aniqlanadi RI (450-460 a.o.), tuzilishi bilan RNKaza A ga o'xshash.

Oshqozon osti bezining dezoksiribonukleazasi I (DNKaza I) endonukleaza bo'lib, bir-, va dsDNKlarni gidrolizlaydi, natijada 5'-fosfat guruhlar saqlaydigan mono- va oligonukleotidlardan tuzilgan murakkab aralashma hosil bo'ladi. Mg ionlari muhitida bo'lgan DNKaza I DNKning har bir zanjiriga alohida ta'sir etadi, uzilgan joylar molekulaning uzunasi bo'ylab joylashadi, Mn ionlarini ta'sirida esa,

DNKning ikkala zanjiri, deyarli bir biriga qarshi bo'lgan joylarda parchalanadi.

Restriktazalarning xarakteristikasi. Atamalar «restriktaza», «restriksiyaning endonukleazasi» va «xususiy endodezoksiribonukleaza» sayti sinonimlar hisoblanadi.

Bakteriyalarning barcha restriksiya endonukleazalari maxsus ancha kalta bo'lgan DNK ketma-ketliklarini "taniydi" va ular bilan bog'lanadi. Ushbu jarayonda DNK molekulasi tanish saytida yoki boshqa joyda, bu ferment tipiga bog'liq, kesiladi. Bakteriyaning shtammi restriksiya faolligiga bilan birga DNKning metilirlash xususiyatiga ega bo'ladi. Ushbu jarayonga ham shunday xususiylik restriksiyaga o'xshagan DNK ketma-ketliklariga ham xos. Metilaza metil guruhlarni restriksiya fermenti bog'langan joyiga adenin yoki sitozin qoldiqlariga biriktiradi, ya'ni o'sha saytning o'zida. Metilirlanish natijasida sayt restriksiyaga nisbatan chidamli (mustahkamlangan) bo'ladi. Demak, DNKning metilirlanishi, uni kesilishidan saqlaydi.

DNK-metilazi. *E. coli* shtammlarining ko'pchiligi DNKning metilirlanishini ikki xil fermentlari saqlaydi: dam- va dcm-metilazalarni. Birinchisi metil guruhlarni adeninning GATC ketma-ketligidagi N-o'riniga olib o'tkazadi. Bunday vaziyatlarda restriktazalarning ko'pchiligi (masalan, Bell, Mbol yoki ClaI), restriksiya saytlarning tarkibiga kirgan shu metilirlangan ketma-ketligi, ushbu saytlar bo'yicha DNKni parchala olmaydi. Ayrim restriktazalarga, masalan, EeorII ni, dcm-metilaza ham xuddi shunday ta'sir ko'rsatadi. dcm-metilaza fermenti CMeCAGG va CMeCTGG ketma-ketliklarda S5-o'rinda joylashgan sitozin qoldiqlarini metilirlanishiga olib keladi. Bunday metilazalarning klonlashgan DNKga xohlamagan ta'sirini chetlatish maqsadida xo'jayin sifatida *E. coli* ning mutant shtammlari - dam- i dcm- qo'llaniladi. Bakterial tizimining restriksiya va modifikasiyalarning DNK-metilazalari, gomologik restriktazaning katta razmerlardagi fragmentlarini hosil qilish maqsadida, in vitro sharoitida tekshirilayotgan DNK fragmentlarida mos bo'lgan restriksiya saytlarini blok hosil qilish uchun qo'llaniladi. Restriktazalarning 3 asosiy sinflari bo'ladi: 1, 2 i 3.

Barcha restriktazalar ikki zanjirli DNK molekulasida aniq ma'lum bo'lgan ketma-ketliklarni "taniydi", lekin 1-chi sinfning restriktazalari DNK molekulasining har xil joylarida uzilishlar hosil qilsa, 2-chi va 3-chi

sinflardagi restriktazalar DNKning faqat ma'lum joylarini – saytlarini "taniydi" va shu joylarni yoki ulardan ma'lum masofada joylashgan qismlarni parchalaydi.

1 va 3 tipdagi fermentlar murakkab subbirlik tuzilma shaklida bo'lib, ikki xil tipdagi faolliklarga ega – modifisirlangan (metilirlangan) va ATF ga bog'liq bo'lgan endonukleazaning.

Ikkinchi sinfdagi fermentlar ikkita aloxida oqsillardan tuzilgan: restrisirlangan endonukleaza va modifisirlangan metilazadan, shu sababdan gen injeneriyasida faqat 2-chi sinfdagi fermentlar qo'llaniladi. Kofaktorlar sifatida magniy ionlari ishlatiladi.

Xozirgi kunga qadar 500 dan ortiq 2-chi sinfdagi restriktazar ajratilgan, lekin mikroorganizmlardan ajratilgan fermentlar ichida DNKda bir xil tartibdagi ketma-ketliklarni taniydiganlar aniqlangan. Bunday juftlar yoki guruhlar izoshizomerlar deb ataladi. Izoshizomeriya bo'lishi mumkin, haqiqiy - fermentlar nukleotidlarning bir xil ketma-ketliklari aniqlanadi va xuddi shu joyda DNK molekulasini uzadi, va yolg'on - fermentlar DNKda bir xil saytlarini aniqlaydi, saytning ichida lekin har xil joylarida molekulani uzadi. Bunday restriktazalar geteroshizomerlar deb nomlanadi.

2-chi sinfdagi restriktazalarning ko'pchiligi 4 dan to 6 gacha nukleotidlar juftlarning ketma-ketligini taniydi, shu tufayli ular ikkita guruhga bo'linadi: birinchi – tetranukleotidlarni taniydi va molekulaning bir necha joyidan uzadi, ikkinchisi – olti juft ketma-ket joylashgan nukleotidlarni aniqlaydi.

Bunday xodisa to'rtida nukleotidlar ma'lum tartibda joylashgan ketma-ketliklarni uchrash ehtimolligi ko'proq bo'ladi oltita nukleotidlarning ketma-ketliklariga nisbatan. Masalan, T7 bakteriofagning 40000 p. o. dan tuzilgan DNKsida E. soli restriktazasi R1 taniydigan ketma-ketliklar yo'q.

Birinchi guruh restriktazalarga kiradi Hpa II va Alu (Arthrobacter luteus dan), ikkinchi guruhga - Eco RI (Escherichia coli dan) va Hind III. Faraz qilish mumkin, DNK zanjiri bo'yicha restriktazalar taniydigan uchastkalar tasodifan joylashgan bo'lsa, fermentlar uchun to'rtida ketma-ket joylashgan nukleotidlar (sayt) nishon vazifasini bajaradi, bunday holatda saytlar har 256 p.o. bir marta uchrashi kerak, oltita nukleotidlarni taniydigan fermentlar uchun har 44096 p.o. Agarda restriksiya sayti gen ichida joylashgan bo'lsa, unda DNK-restriktaza

bilan ishlov berilganda, gen inaktivasiyaga uchraydi. Bunday voqeani uchrash ehtimolligi birinchi guruh restriktazalar bilan ishlov berilganda juda yuqori bo'ladi, ikkinchi guruh restriktazalarga nisbatan. Shu sababdan shikastlanmagan gen hosil qilish uchun parchalashni ikkinchi guruh bir necha ketma-ket restriktazalar yordamida olib boriladi yoki restriksiyaning shunday sharoitida o'tkaziladi, parchalanish faqat bitta joyda kuzatiladi xolos, bitta saytda.

Restriktazalarning nomenklaturasi. 1973 yilda Smit va Natans restriktazalarning kuyidagi ma'lumotlarga asoslangan holda nomenklaturasini taqlif etishadi:

1) har bir fermentning nomi ushbu metilaza - restriktaza tizimini saqlovchi mikroorganizmning binar nomidan kelib chiqqan bo'ladi. Qoida bo'yicha tuziladi: avlodning nomini, birinchi katta harf bilan yoziladigan so'ziga, turning ikkita birinchi kichkina harf bilan yoziladigan nomi qo'shiladi. Masalan, *Streptomyces albus* - Sal, *Escherichia coli* - Eco;

2) kerak bo'lganda serotip yoki shtammning belgilashini qo'yish mumkin, masalan, Yeso B;

3) restriksiyaning turli sistemalari - bitta bakteriya hujayrasi bilan kodlangan modifikasiyalar rim raqamlar bilan belgilanadi: Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*).

4) restriktazalar R harfi bilan belgilanadi (R Hind III), metilazalar - M (M Hind III).

Yangi restriktazalar ochilishi bilan Roberts 1978 yilda fermentlarning rasional belgilashlarga qo'shimcha so'zlar kiritishga majbur bo'ladi: agarda qisqargan nomi bir necha fermentlar uchun bir xil bo'lsa, ikkita birinchi harflar shunday qoladi, uchinchi esa, tur nomining keyingi harflari olinadi: *Haemophilus parainfluenzae* - Hpa I yoki *Haemophilus parahaemolyticus* - Hph I. Ushbu restriktazalar DNK molekulasini turlicha parchalaydi. Birinchisi "to'mtoq" uchlar hosil qilsa, ikkinchisi - "yopishqoq" uchlar, ya'ni hosil bo'lgan fragmentlarning uchlarida bir zanjirli o'zaro komplementar, to'rtta nukleotid uzunligidagi qismlari bo'ladi. Bunday fragmentlar rekombinant DNK hosil qilishda juda qulay.

Restriktazalar ta'sirining mexanizmi. Nishonlar sifatida (tanish sayti) ko'pincha 46 juft asoslardan tashkil topgan palindromlar - restriksiya saytlari. Restriktazalar taniydigan nuqtalar 1800S aylanishga

nisbatan simmetrik joylashgan bo'ladi, ya'ni bitta zanjirdagi nukleotidlar ketma-ketligi chap tomondan o'nga qarab, boshqa zanjirdagi nukleotidlar ketma-ketligini o'xshash, faqat o'ng tomondan chappa qarab, masalan: 3'-GAATTC-5' ili 5'-CTTAAG-3' (rasm 62). Simmetrik deganda, metilirlanganlar DNKning ikkala zanjirida bo'lishi kerak. Natijada, sayt-nishon to'liq metilirlangan bo'lishi mumkin (ikkala zanjirlar modifisirlangan), yarimmetilirlangan faqat bitta zanjir metilirlangan) yoki metilirlanmagan bo'ladi.

Bevosita	$\overrightarrow{\text{ATGC}} \dots \overrightarrow{\text{ATGC}}$ $\overleftarrow{\text{TACG}} \dots \overleftarrow{\text{TACG}}$
Simmetrik	$\overleftarrow{\text{ATGC}} \dots \overrightarrow{\text{CGTA}}$ $\overrightarrow{\text{TACG}} \dots \overleftarrow{\text{GCAT}}$
Invertirlangan	$\overrightarrow{\text{ATGC}} \dots \overleftarrow{\text{GCAT}}$ $\overleftarrow{\text{TACG}} \dots \overrightarrow{\text{CGTA}}$
Bevosita komplementar	$\overrightarrow{\text{ATGC}} \dots \overrightarrow{\text{TACG}}$ $\overleftarrow{\text{TACG}} \dots \overleftarrow{\text{ATGC}}$

TAAT
ATTA

Palindrom

Rasm 63. Nukleotidlarning ketma-ketliklardagi takrorlanishlari quyidagilarga bo'linadi: bevosita, invertirlangan, simmetrik, bundan tashqari, palindromlar va bevosita komplementar palindromlar.

To'liq metilirlangan sayt restriksiya va modifikasiyaga uchramaydi. Yarimmetilirlangan sayt restriksiya fermenti bilan aniqlanmaydi, lekin metilaza yordamida to'liq metilirlanganga aylanishi mumkin. Bakteriyalarda metilirlanish odatda hosil bo'lgan modifikasiya holatini saqlashga qaratilgan bo'ladi. svyazano s soxraneniem imeyushegosya sostoyaniya modifikasii. To'liq metilirlangan DNKning replikasiyasi yarim metilirlangan DNKning hosil bo'lishiga olib keladi. Yarim metilirlangan saytlarni tanib olish in vivo sharoitida metilazaning funksiyasini bajarishini odatdagi etapi bo'lsa kerak. Metilirlanmagan sayt-nishon restriksiya yoki modifikasiya uchun in vitro sharoitda substrat vazifasini bajaradi. Hujayrada modifikasiyalanmagan DNK restrisiyaga uchrasa kerak.

Kesish reaksiyasi ikki pog'onada amalga oshadi. Oldin DNKning bitta zanjiri kesiladi, keyin ikkinchisi. Kesish saytlariga ikkala tomondan yaqin joylashgan xududlarda ekzonukleotik degradasiya jarayoni kuzatilishi mumkin. ATFning effektiv gidrolizi kuzatiladi, lekin uning vazifasi noaniq.

Savol tug'iladi, qanday qilib ferment bitta saytni taniydi, lekin boshqa, uzoqda joylashgan bo'lsa ham, saytni kesadi. Muhim bo'lgan voqea, DNK molekulasida bilan birinchi bo'lib bog'langan oqsil, undan hech qachon ajralmaydi. Agarda fermentni modifisirlangan va modifisirlanmagan DNKning aralashmasida inkubasiya qilinsa, ferment ko'proq modifisirlanmagan DNK kesadi. Demak, bog'lanish saytni tanib, kesish saytni aniqlash uchun oqsil metilirlanmagan DNKdan ajralmaydi.

Tanish va kesish saytlarni o'zaro bog'lanishlari borligi to'g'risida ikkita alternativ modellar tushuntiradi: bitta model bo'yicha, ferment DNK molekulasida bo'ylab harakatlanadi, ikkinchi modeli bo'yicha – DNK o'zi siljiydi. Agarda ferment harakatlangan, kesish saytni aniqlangandagina to'xtaydi. Agarda DNK siljisa, ferment tanish saytiga birikganicha qoladi, DNK esa, fermentdagi bog'lanish saytigacha yetib boradi. Bu jarayon davom etadi toki ferment kesish xududiga yetganicha. Elektron mikroskopik ma'lumotlar asosida xulosa qilish mumkin, DNK molekulasida ferment halqalar hosil qiladi, kesilgandan keyin ham tanish sayti bilan bog'langanicha qoladi; ushbu ma'lumotlar ikkinchi modelni tasdiqlaydi.

11.5. Rekombinant DNK konstruksiyasining hosil qilinishi.

Rekombinant DNK deganda, har xil biologik manbalardan olingan ikki yoki bir necha DNK fragmentlarini in vitro sharoitida (probirkada) o'zaro bog'lab hosil qilingan molekuladir. Asosiy so'zlar «DNK fragmenti» va "in vitro sharoitida qo'shish", genetik injeneriya usulini mazmunini yoritadi va gibrid (yoki ximer) organizmlarning hosil qilishning boshqa usullaridan, masalan, genetik seleksiya, embrional injeneriya va h.k., farq qilishi. DNK fragmentlarini, shunindек, tarkibida gen bo'lgan fragmentlarini restriktazalar yordamida hosil qilinadi. Restriktazalar hosil qilishi mumkin ham to'mtoq, ham yopishqoq uchlari bo'lgan fragmentlarni. Fragmentlarni bir biriga ulash, DNKning

fragmentlarini uchlari bog'liq, asosan uchta usul yorlamida olib boriladi.

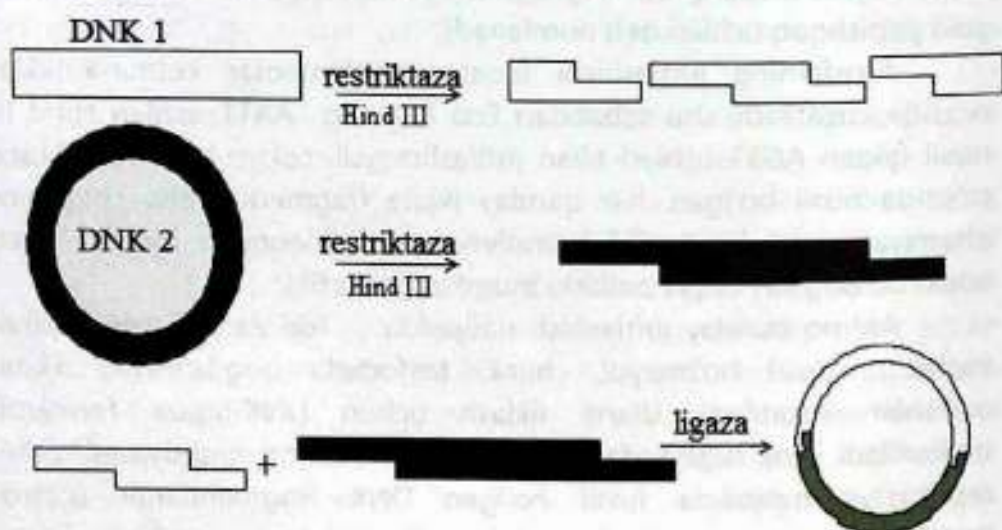
Restriksiya-ligaza usuli. "Yopishqoq" uchlari orqali bir biriga ulash. Ushbu usul eng keng tarqalgan usul hisoblanadi. Birinchi marta ushbu usul yordamida gibril DNK hosil qilgan olimlar S.Koen o'z kasbdoshlari bilan 1973 yilda. Ayrim restriktazalar, masalan Pst I, DNK zanjiriga simmetrik, bir biriga nisbatan qiyasiga joylashgan, tanish saytining markazidan bir xil masofada joylashgan va "pog'ona" hosil qilgan uzilishlarni DNK kiritadi (rasm 65). Bunday komplementar bo'lgan uchastkalarni, azot asoslarini juftlashishi tufayli, ya'ni assosiasiyalar hosil qilish moyilligi bo'lgan sababli, ular komplementar yoki yopishqoq uchlari deb nomlanadi.

Asoslarning juftlashishi faqat komplementar ketma-ketliklar orasida kuzatiladi, shu sababdan Eco RI nng AATT-uchlari Hind III hosil qilgan AGST-uchlari bilan juftlashmaydi. Lekin, bitta restriktaza ta'sirida hosil bo'lgan, har qanday ikkita fragment (kelib chiqishini ahamiyati yo'q) bir zanjirli komplementar nukleotidlar bir biri bilan vodorod bog'lari orqali birikishi mumkin (rasm 65).

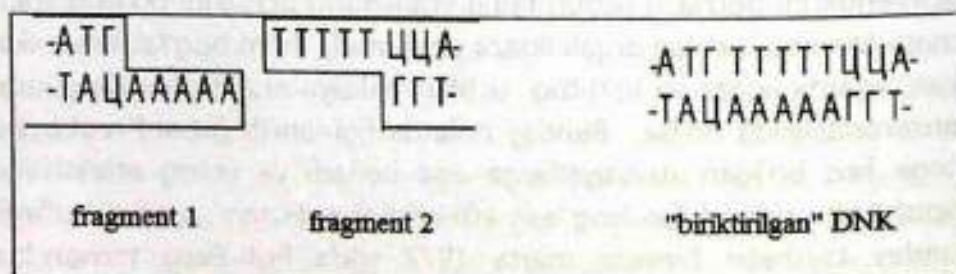
Ammo bunday juftlashish natijasida ikki zanjirli yahlit spiral molekula hosil bo'lmaydi, chunki fosfodiefir bog'lanishda ikkita uzilishlar kuzatiladi. Ularni tiklash uchun DNK-ligaza fermenti qo'llaniladi. Tirik hujayrada ushbu ferment o'zining funksiyasini, ya'ni replikasiya natijasida hosil bo'lgan DNK fragmentlarini o'zaro bog'laydi.

Konnektor usuli. "To'mtoq uchlari" bilan bog'lash. DNK fragmentlarini bog'lash uchun faqat yopishqoq uchlarni bo'lishi shart emas, to'mtoq uchlari orqali ligaza yordamida ham bog'lash mumkin ekan, agarda ligaza va to'mtoq uchlari reaksiya aralashmasida yuqori konsentratsiyada bo'lsa. Bunday holatda ligirlanish (tikish) reaksiyasi o'ziga hos bo'lgan xususiyatlarga ega bo'ladi va uning effektivligi, yopishqoq uchlari bilan bog'lash effektivligi nisbatan pastroq bo'ladi. Bunday tajribalar birinchi marta 1972 yilda Pol Berg tomondan Stenford universitetida AQSh o'tkazilgan. Yopishqoq uchlarni fermentlar yordamida DNKning molekulasini to'mtoq uchlari bilan birlashtirish mumkin. Buni uchun buzoqchani timusidan (ayrisimon bezi) ajratilgan uchli transferaza qo'llaniladi. Agarda in vitro rekombinasiya qilingan DNK fragmenlarini 3'-uchiga uchli

dezoksinukleotidiltransferaza yordamida bir zanjirli ma'lum uzunligidagi oligo (dA)-segmentlarni biriktirilsa, boshqa fragmentning uchiga xuddi shu uzunligidagi — oligo (dT)-segmentlar biriktirilganda, so'ng shu usul bilan hosil qilingan fragmentlar aralashiriladi, natijada ular bir biri bilan, ya'ni oligo (dA)- va oligo (dT) —ketma-ketliklar vodород bog'lari orqali bog'lanadi (rasm 66). Ikkita fragmentlarni kovalent bog'lash uchun DNK-ligaza qo'llaniladi. Bunday muolajalar umumiy rekombinant DNK molekulasini hosil qilish ikkinchi usuli amalga oshirish uchun asos bo'ladi.



Rasm 64. Restriktaza-ligaza usulining sxemasi



Rasm 65. "Yopishqoq" uchlari va DNK bo'laklarining birikishi

O'zaro komplementar bo'lgan bir zanjirli uzun uchlarni hosil qilish mumkin bo'lgan tufayli gibrid molekular yuqori effektivligi bilan hosil bo'ladi, shuning uchun mRNKning DNK-kopiyalarini

klonlashda, ularni miqdori chegaralangan bo'lgan sababli, konnektor usuli qo'llaniladi. Bunday biriktirish usulida fragmentlar orasiga AAAAA uchastkalar qo'shib qoladi. Qo'shimcha TTTT ketma-ketliklar bog'langan molekulalarini funksiyalariga ta'sir qilishi mumkin, shu sababdan DNKning rekombinant molekulalarni hosil qilishda, mumkin qadar, restriktazala yordamida hosil bo'lgan, yopishqoq uchlari bilan foydalaniladi, ya'ni turli nomli yopishqoq uchlari bo'lgan fragmentlarni o'zaro bog'lash. Agarda restriksiyaning har xil endonukleazalari yordamida hosil bo'lgan fragmentlarni bog'lash kerak bo'lsa, ya'ni fragmentlarning uchlari bir biriga komplementar bo'lmagan, unda linkerlar (perexodnik – o'tishga oid) qo'llanadi. Linkerlar – kimyoviy sintezlangan oligonukleotidlar bo'lib, restriksiya saytlari yoki ularning kombinasiyalaridir. Ushbu g'oyani birinchi bo'lib taqlif etgan olim Sheller o'z kasbdoshlari bilan (1977). Bunday linkerlarning soni juda ko'p. Tabiiyki, linkerlar bilan foydalanayotganda genetik informasiyanin qoidalariga rioya qilish kerakligi. Ko'pincha linkerning o'rtasiga boshqaruvchi genetik element joylashtiriladi, masalan, promotor yoki ribosoma bilan bog'langan qism. Bunday holatda linkerlar faqat genlarni yig'ishi vazifasidan tashqari, ularning ekspressiyasini ham boshqaradi. Shunday linkerlar borki "to'mtoq uchi – yopishqoq uchi"lariga genetik informasiyani o'tkazadigan. Kerakli bo'lsa, yopishqoq uchlarni to'mtoq uchlariga aylantirish mumkin. Bunga erishish mumkin, agarda faqat bir zanjirli DNK molekulasini parchalaydigan ferment endonukleaza S1 qo'llanilsa yoki yopishqoq uchlarni DNK-polimeraza I yordamida ikkinchi zanjirni sintezlash usuli yordamida.

11.6. Yangi genning hujayraga kiritilishi.

Rekombinant genni hujayraga kiritish mumkin ikkita usuli bilan: vektor konstruktsiya yordamida yoki to'g'ridan to'g'ri bevosita usuli bilan.

Marker – genlar. Vektor - DNK molekulasini bo'lib, ikki komponentdan tashkil topgan: vektor qismi (tashuvchi) va klonlangan begona gendan. Vektor vazifasi – tanlangan DNKni hujayra-resipientga yetqazish va genomiga kiritish, transformasiya qilingan hujayralarni identifikatsiya qilish, kiritilgan genning ekspressiyasini

stabil holatini ta'minlash. Shunday qilib, vektor uncha katta bo'lmagan, xo'jayin-hujayrasida o'z-o'zini tiklash (replikasiya bo'lishi), ko'p marta nusxa hosil qilish (amplifikasiyalanish), birikkan genni ekspressiyalash (tarkibida boshqaruvchi ketma-ketliklarni bo'lishi), tarkibida effektiv seleksiya uchun albatta bo'lishi kerak gibrid hujayralarni aniqlaydigan nishon-gen; organizm hujayrasiga o'ta oladigan qobiliyatiga ega bo'lish. Transformasiyalangan hujayralarni aniqlaydigan nishon genlarning ikkita guruhi ajratiladi: selektiv genlar antibiotiklarga (kanamisin, tetrasiklin, neomisin va boshq.) va gerbisidlarga (o'simliklarda) chidamlilik hosil qiladigan va substrati bo'yicha auksotrof genlar va h.k. Bunday nishonning ishlash prinsipi – transformasiyalangan hujayralarning selektiv ozuqa muhitda o'sishi. Bunday ozuqa muhitga transformasiyalanmagan, normal hujayralarning o'sishi va bo'linishini ingibitsiya ta'sir ko'rsatagan moddalar qo'shiladi Reporter genlar, hujayra uchun neytral oqsillarni kodlaydigan genlar bo'lib, to'qimalarda bo'lishini osongina aniqlash mumkin. Ko'pincha reporter genlar sifatida qo'llaniladi: β -glyukuronidaza (GUS), yashil flyuoessent oqsili (GFP), lyusiferaza (LUC), xloramfenikolasetiltransferazalarning (CAT) genlari. Xozirgi kunda ushbu genlar arsenalidan eng ko'p qo'llanadigan genlar GUS va GFP, kamroq - LUC va CAT genlar. Xozirgi kunda reporter gen sifatida qo'llaniladi GUS geni. Ushbu gen E. coli ning modifisirlangan geni bo'lib, molekulyar massasi 68 kD teng bo'lgan β -glyukuronidazani kodlaydi. GUS faol bo'ladi tashqi muhitning keng diapazon sharoitida, lekin optimum rN (5-8) va 37°S ga to'g'ri keladi. U keng spektrdagi tabiiy va sintetik glyukuronidlarni gidrolizlashi mumkin, natijada spektrofotometrik yoki flyuorimetrik yordamida fermentning faolligini aniqlash, kerakli bo'lgan substratlarni tanlash va to'qimalarni gistokimyo in situ bo'yashga (masalan, ko'k rangga) imqoniyat yaratiladi. Ferment yetarli darajada stabil: isitishga (hayotchanligi 55°S - 2 soat) va detergentlar ta'siriga chidamli. Muzlatish va muzdan tushirish jarayonida GUSning faolligi o'zgarmaydi. Gen injeneriya usullari yordamida hosil bo'lgan ximer oqsillarning tarkibida ham GUS o'z faolligini saqlaydi. Tirik hujayralarda ham GUS oqsili bir necha soatlardan to bir necha sutkalargacha stabilligi va falligini saqlaydi. GFP (green fluorescent protein - yashil flyuoessent oqsil, yoki yashil flyuoessensiyaning oqsili) Shimomura va hammualliflar bilan birga

1962 yilda lyuminessirlangan meduzada *Aequorea victoria* aniqlashgan. GFP geni 1992 yilda Prasher va hammualliflar tomondan aniqlanganadi va bir necha yildan so'ng reporter geni sifatida har xil pro- va eukariot organizmlar bilan ishlaganda faol qo'llaniladi. Xozirgi kunda GFP geni butun jahon bo'yicha yuzlab ilmiy izlanishlarda qo'llanib bormoqda. Bunday qo'llanishning keng tarqalishi, GFP oqsilning maxsus xossalari tufayli, chunki u flyuoessirlanish xususiyatiga ega bo'lib, uzun to'liqinli ultrabinafsha nurlari ta'sirida yashil rangda ko'rinadi. Mana shu flyuoessensiya bevosita oqsilga bog'liq bo'ladi va uning ko'rinishi uchun substratlar yoki kofaktorlarning bo'lishini talab qilmaydi. Ushbu xususiyati tufayli GFP geni kelajakda juda perspektiv reporter gen bo'lib, transgen organizmlarda har xil hayotiy (destruktiv bo'lmagan) izlanishlarni olib borish imqoniyatini yaratadi. GFP ko'p miqdordagi hosilalari umumiy atama bilan nomlanadi - AFP (autofluorescent proteins - avtoflyuoessent oqsillar). Dengiz anemonadan *Discosoma sp.* yaqinda yana bitta oqsil ajratilgan DsRed bo'ladi, oqsil qizil yorug'likda fluoessirlanadi. Yana bir necha shularga o'xshash fluoessirlanadigan oqsillar Rossiya olimlari tomonidan korall poliplardan Anthozoa ajratib olingan. Oqsil denaturatsiyaga uchrashi mumkin juda yuqori harorat, rN ning eng chetdagi ko'rsatgichlar va kuchli qayta tiklovchilar, masalan, Na₂SO₄ tipi ta'sirida. O'zining fiziologik muhitiga o'tganda GFP flyuoessensiya xususiyatini salmoqli darajada qayta tiklaydi. Gen injeneriya usullari yordamida hosil bo'lgan ximer oqsillarning tarkibida GFP o'z faolligini va tirik hujayralarda ham GFP oqsili stabilligini saqlaydi. CAT genlar xloramfenikolasetiltransferaza sintezga javob beradi (*Escherihia coli* dan ajratilgan). Ushbu ferment asetil guruhni asetil-KoAdan olib xloramfenikolga o'tkazish reaksiyasini katalizlaydi. Opredeleyaetsya Gistokimyoviy usul yordamida aniqlanadi: mos kelgan substat qo'shilganda to'qimaning rangi o'zgaradi. LUC - geni lyusiferaza (bakteriyalardan klonlangan) fermentni kodlaydi. Ferment transformirlangan hujayralarni nurlantiradi.

Bakterialardan olingan ferment ikkita subbirliklardan tuzilgan. Fermentlarning faolligini aniqlash uchun maxsus uskunalar kerak bo'ladi-fluorimetr va yorug'lik signal beruvchi amplifikatori bo'lgan, raqamlar bilan ifodalangan videokamera. Ferment o'z faolligini yo'qotadi detergantlar va yuqori harorat ta'sirida. Selektiv genlarning reporter

genlarga almashtirish transgen o'simliklarni tanlashda juda ma'qul, chunki reporter genlarni qo'llaganda atrof muhit va odam salomatligiga amaliy ta'siri bo'lmaydi. Lekin, reporter genlarning qo'llanish sohasi ancha keng, faqat transgenozni oddiy nazorat qilish emas. Boshqa muhim vazifasi, konkret genlarning (o'ziniki yoki begona kat'iy nazar) ekspressiya makon va zamon (imqoniyati boricha miqdoriy jihatdan) xususiyatlarini aniqlashdir. Rreporter genini prmotorga birlashtirish usuli yordamida uning transkripsiya jarayonida tekshirilayotgan genning ekspressiyasini boshqarishidagi roli aniqlanadi.

Genning oqsil kodlaydigan qismini, 5'-uchli tranlyasiya bo'lmagan mRNK ketma-ketligini saqlangan holda, reporteriga almashinishi shu ketma-ketlikning mRNKning yadrodan sitoplazmaga transporti va translyasiyaning inisiasiyadagi rolini aniqlashga imqoniyat yaratadi. Genning asosiy xususiyatlardan biri – bu ekspressiya xossasi. Bu xossaga javobgar bo'ladi, tarkibida gen bo'lgan, vektor molekulasiga kiritilgan har xil genetik elementlar.

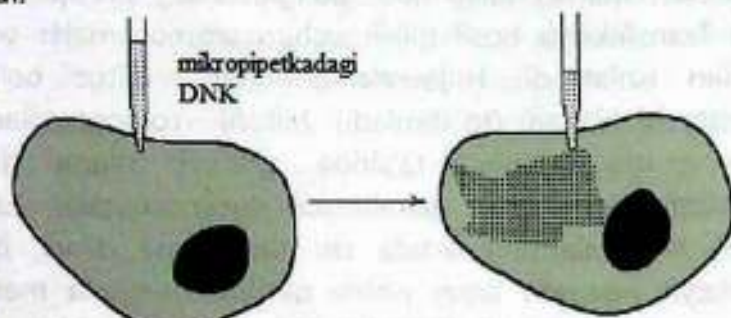
Hujayraga genning bevosita kiritish usullari. Genning hujayraga bevosita kiritishini bir necha usullari mavjud: transfeksiya, mikroin'eksiya, elektroporatsiya, «mini-hudayra» usuli, liposomalarga joylashtirish va elektron zambarak.

Transfeksiyada DNK adsorbuetsiya kalsiy fosfatning kristallarida adsorbsiya bo'ladi (Gresem Van der Eb, 1973), natijada kalsiy presipitat zarrachalari hosil bo'ladi. Ular fagositoz yo'li bilan hujayraga yemiriladi. Tarkibida seleksiya olib boradigan gen bo'lgan xususiy DNKga transformasiyasining effektivligini oshirish uchun nospesifik DNK-tashuvchi qo'shiladi. Odatda bunday maqsadga erishish uchun DNK buzoqchani timusidan yoki losos baliqning spermasidan olinadi. DNKning bir qismi membranaga birikadi, natijada hujayraga tushmaydi. DNK ni aksepsiya qilgan hujayralarning miqdori 15% dan to 90%gacha borishi mumkin. DNKning kiritishidan bir necha sutka o'tgach hujayralarning katta bo'lmagan qismi begona genlarning ekspressiyaga uchratadi, lekin keyin ekspressiya darajasi susayadi, faqat 10⁻³-10⁻⁵ miqdordagi hujayralar stabil transformasiyani o'tadi xolos. Transfeksiya uchun DNKni adsorbsiya qiluvchi polimer DEAE-dekstran qo'llanadi. Hujayraga kirish effekti va ekspressiya vaqti yuqori darajada kuzatilsa, lekin stabil transformasiyani amalga oshirish darajasi kalsiy presipitatning

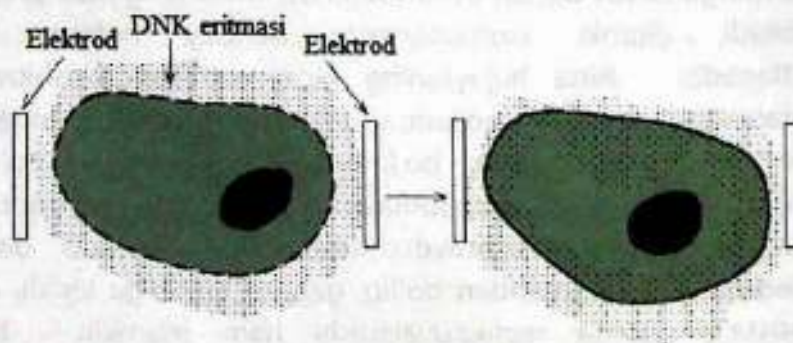
qo'llanishiga nisbatan pastroq bo'ladi. Transfeksiyani chastotasini "gliserin shoki" deb atalgan muhit (4 min 15% gliserin NEPES-buferdagi eritmasi) kuchaytiradi. Hujayraga har qanday genni kiritish mumkin, agarda u klonlangan selektiv nishon (marker) bilan oldindan bog'langan bo'lsa. Lekin keyingi izlanishlar natijasida aniqlanadi, hujayra tashqarisida bog'lash shart emas. Selektiv gen tarkibida bo'lgan hujayralar, kalsiy presipitatta bo'lgan boshqa DNKni ham fagositoz qilishi mumkin ekan. Demak, kotransformasiya usulidan foydalanib, har qanday klonlangan DNK segmentini sun'iy usulda o'stirilayotgan eukariot hujayralarga kiritish mumkin, agarda shu DNKni selektiv marker bilan hosil bo'lgan kalsiy presipitat eritmaga qo'shilsa. Transfeksiya hosil qilish uchun xromosomalar yoki uning fragmentlari ishlatiladi. Hujayralar-donorlar mitoz bo'linishning stadiyalarida bloklanadi (to'xtatiladi). Mitotik xromosomalar osmotik shok va gomogenizasiya ta'sirida ajraladi. Ularni differensial sentrifugirlash usuli bilan tozalanadi. Xromosomalar kalsiy xlor yordamida hujayralarning sirtida cho'qindi hosil qiladi. Bir necha soatdan keyin reagent bilan ishlov beriladi, natijada membranani teshish imqoniyati bo'ladi (masalan gliserin yordamida). Hujayra-resipientlarga ishlov berish uchun xromosomalarning toza preparatlari qo'llaniladi, chunki xromosomalar bunday holatda kamroq shikastlanadi. Bitta hujayraning xromosomalariga ishlov berish chegaralangan miqdorda bo'ladi, shuning uchun yaxshisi bitta hujayra resipientga 20 tadan ortiq bo'lmagan xromosomalar qo'llaniladi, chunki suzspenzyada xromosomalar konsentratsiyasi yuqori bo'lsa, ular agglyutiniyasi uchraydi. Resipient hujayrada donorning xromosomalarini fragmentlari bo'lib, genom tarkibiga kirishi mumkin va mustaqil holda replikasiyalanishi ham mumkin. Kiritilgan fragmentlarda ko'pincha delesiyalar kuzatiladi. Hamma hujayralar ham genom DNKning transformasiya xususiyatiga yuqori chastotada ega emas. Odamning fibroblastlari plazmidalarning DNKsini effektiv darajada kiritadi, ammo genomning DNKsini mutlaqo qabul qilmaydi. Sut emizuvchilarning hujayralariga DNK mikroin'eksiyasi mumkin bo'ldi, diametri 1-0.5 mikronga teng bo'lgan mikropipetkalarini sozlash asbobini va mikromanipulyatorni paydo bo'lishi bilan (rasm 67). Tarkibida herpes virusini fragmentlari va timidinkinazaning geni (TK) bo'lgan plazmidalar va plazmida rVR322 TK-hujayralariga in'eksiya

qilinadi, natijada aniqlandi, TK-geni yadrolarga kirib normal replikasiyalandi. DNK ni mikroin'eksiya yordamida kiritish usuli Anderson va Diakumakos tomondan 70-yillarning boshida ishlab chiqilgan. Agarda kerakli asbob va uskunalar bo'lsa bir soatda 500-1000 hujayralarga in'eksiya qilish mumkin va 50% hujayralarda in'eksiya qilingan genlarning stabil intergratsiya va ekspressiyasi kuzatiladi.

Ta'riflangan usulning afzalligi shundan iboratki, u har qanday DNKni har qanday hujayralarga kiritishga imkon beradi va hujayralarga kiritilgan genni saqlab qolish uchun selektiv bosim talab qilinmaydi.



Rasm 66. DNK ning mikroin'eksiyasi



Rasm 67. Elektroporatsiya usuli

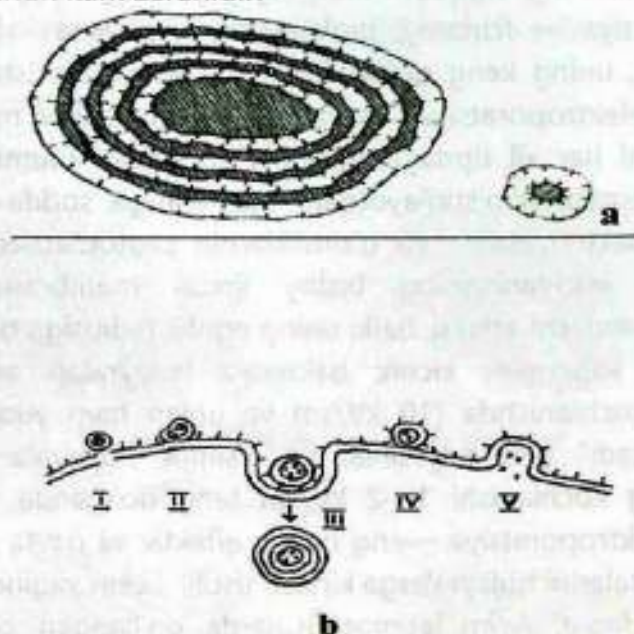
Elektroporatsiya usuli yuqori kuchlanishli impuls ta'sirida biomembranalarning qaytariladigan o'tkazuvchanligini kuchaytirishga asoslanadi. Elektroporatsiya uchun muhitga hujayralar va hujayraga kiritish uchun mo'ljallangan DNK fragmentlari qo'shiladi (rasm 66). Muhitdan yuqori vol'tli impulsni o'tkaziladi (kuchlanishi (200 – 350) V, impulsning davomliligi 54 m/s), natijada sitoplazmatik membranada poralar (teshikchalar) hosil bo'ladi. Teshikchalarning saqlanish vaqti va

razmeri, DNKga o'xshash makromolekulalar osmotik bosim ta'sirida tashqi muhitdan hujayraga kirishga yetarli bo'ladi. Natijada hujayra hajmi kattalashadi.

Saqlanib qolgan hujayralar DNK miqdorining qancha ko'p o'ziga olish uchun elektr maydonning kuchlanishi va ta'sir vaqti, transformasiyalanuvchi DNK va resipient hujayralarning konsentratsiyasi har bir hujayralar tizimiga tajriba usuli bilan aniqlanadi. Elektroporatsiyaning optimal sharoitida transformantlarning miqdori tirik hujayralarning 80% tashkil etadi. Elektroporatsiya — fizikaviy, biokimyoviy usul emas, shu sababdan bo'lsa kerak, uning keng qo'llanilishi. Ko'pgina izlanishlar natijasida aniqlandi, elektroporatsiya muvaffaqiyatli qo'llanishi mumkin DNK molekulalarni har xil tipdagi hujayralarga kiritish mumkin, masalan, hayvonlarning sun'iy o'stirilayotgan hujayralariga, sodda hayvonlarga, achitqi va bakteriyalarga va o'simliklarnin protoplastlariga. Yuqori razryaddagi kuchlanishning bisloy lipidli membranaga ta'sirini elektroporirlanuvchi effekti, balki uning egrilik radiusiga bog'liq bo'lsa kerak. Shu sababdan kichik bakteriya hujayralari ancha yuqori darajadagi kuchlanishda (10 kV/sm va unlan ham yuqori) DNKni effektiv "yutadi" yirik hayvonlar va o'simlik hujayralarga nisbatan (maydonning kuchlanishi 1—2 kV/sm teng bo'lganda ular effektiv "yutadi"). Elektroporatsiya — eng oddiy, effektiv va qayta qilaoladigan DNK molekulalarini hujayralarga kiritish usuli. Lekin yaqindagicha ham ushbu usul faqat ayrim laboratoriyalarda qo'llangan xolos, chunki seriyali asboblari — elektroporatorlar bo'lmagan. Bunday asboblarning paydo bo'lishi va takomillashishi tufayli genetik injeneriyada keng qo'llanadigan bo'ldi. «Mini-hujayralarni» hosil qilish mumkin donor hujayralarni mitoz jarayonida kolsemid ta'sirida bo'linishi to'xtatiladi, ya'ni bloklanadi. Hujayralarni uzoq vaqt davomida kolsemid bilan ishlov berilsa har bitta xromosomaning atrofida yangi yadro qobig'i shakllanadi. Sitoxalazin V bilan ishlov berilsa va so'ng sentrifugirlanganda mini-hujayralar hosil bo'ladi, to'g'rirog'i sitoplazmatik membranaga o'ralgan mikroyadrolar. Hosil bo'lgan mini-hujayralar har xil ta'sirotlarga o'ta sezuvchan bo'ladi, shu sababdan biriktirish uchun maxsus sharoitlar yaratiladi. Usul murakkab, effektivligi past - 10-6-10-7.

Lizosomalarga joylashtirish ekzogen genetik materialni restriktazalarning halokatli ta'siridan himoya qilish uchun qo'llaniladi.

Liposomalar – sferik shaklidagi fosfolipidlardan tuzilgan qobiqlar (rasm 67). Ular hosil qilinadi suv bilan lipidlar aralashmasini keskin silkitish yoki fosfolipidlarning suv emulsiyasini ul'tratovush bilan ishlov berish usullari yordamida. Fosfatidilserin va xolesterindan tuzilgan liposomalar hayvon va o'simlik hujayralarigi DNKning kiritishning eng qulay hisoblanadi. Liposomalar orqali o'tkazish tizimi hujayralar uchun kam zararlidir.



Rasm 68. (a) Liposomalar – bir qavatli (diametr 250-300 angstrom) va ko'p qavatli (5 - 50 mikrometr). Shtrix qo'yilgan qismlar – suvning joylashgan joyi, och rangli qism – bimolekulyar lipid qavatni, molekulalarning qavatning ichiga qaratilgan «dumlari». (b) Hujayra membranasi bilan liposomalarning o'zaro ta'sirining shakllari: liposoma membrananing o'tkazuvchanligini kuchaytirishi mumkin – qo'shimcha kanallar hosil qilib (I); membranaga birikish- adsorsiyalanish (II); o'zaro ta'sirining ahamiyatli shakli – liposomalar hujayraga kirishi (emirilishi), bunday munosabatda liposoma olib kelgan modda hujayraga bevosita tushadi (III); ayrim holatlarda hujayra membranasi va liposomalar lipidlari bilan almashinadi (IV), boshqa holatlarda esa, hujayra membranasi va liposomalar qo'shilib ketadi (V).

Biologik ballistik usuli (biolistika) yordamida o'simliklarning transformasiyasi amalga oshirilgan, ayniqsa bir pallalilarning o'simliklarni, va bugungi kunda eng effektiv usullaridan biri hisoblanadi. Usulning mazmuni shundan iboratki, diametri (0,6—1,2) mkm teng bo'lgan vol'framning mayda zarrachalariga transformasiya uchun kerak bo'lgan gen konstruksiyasini o'zida tutgan vektorning DNKsi changitib yuboriladi. DNK tarkibida bo'lgan vol'fram zarrachalari sellofandan tuzilgan mahsus idishga tushiriladi va biolistik pushkani ichiga o'rnatiladi. Odatda markazda joylashgan hujayralar vol'fram zarrachalarning miqdori va yuqori bosimi tufayli haloq bo'ladi, markazdan 0,6—1,0 sm narida joylashgan hujayralar eng muvaffaqiyatli transformirlangan bo'ladi. So'ng hujayralar eg'tiyotlik bilan mahsus muhitga sun'iy usulda o'stirish va regeneratsiya uchun o'tkaziladi. Biolistik pushka yordamida bir pallali o'simliklar, masalan, makkajo'huri, bug'doy, arpa va sholi transformirlangan bo'ladi. Natijada stabil o'simliklar-transformantlar hosil bo'ldi. Biolisticheskaya transformasiya yordamida transgen bir pallali o'simliklarni yaratilishdan tashqari, DNKning bevosita embrional changga o'tkazib, tezdagina transgen digaploidli o'simliklarni hosil qilish seleksiya ishlarida qo'llaniladi. Xozirgi kunda ushbu usul yordamida tamakining transformasiyasi amalga oshirildi, gaploid o'simliklarning regeneratsiyasidan so'ng stabil transformantlar hosil qilindi. Ballistik transfeksiyaning asosida organ va to'qimalarni o'qqa tutish jarayoni yotadi, shunga asoslangan holda tilla plazmidaning DNKsi bilan qoplanadi. Mikrozarachalar hujayra qatlamlaridan o'tib, genetik konstruksiyaning bevosita yadro hujayralariga yetkazadi. Shu maqsadda yaratilgan "gen pushkasi" (gene gun) tuzilishi jihatdan miltiqqa o'xshash. Mikrozarachalarning o'tish chuqurligi odatda katta emas - 1 mm gacha, shu sabbadan ushbu usul asosan teri yoki uni tagida joylashgan togay hujayralarning transfeksiya qilish uchun mo'ljallangan. Lekin, otishning maxsus sharoitlarida mikrozarachalar to'qimaga kirishi to 4-5mm chuqurlikgacha va genni ko'ndalang-targ'il muskullarning tolalarigacha yetqazish mumkin.

Bakterial hujayralari bilan genetik muolajalari. Bakteriya *E. coli* hozirgi kunda eng yaxshi o'rganilgan hujayra hisoblanadi. To'liq o'rganilgan faglarning ko'pchiligini xo'jayini *E. coli* bo'ladi.

E. coli ning protoplasti murein qopga o'ralgan bo'lib, tashqi membranaga birikadi. E. coli ekzogen DNKning yutish qobiliyatiga ega emas. Shu sabadan shunday sharoit yaratish kerak-ki hujayra qobig'idan o'tish imqoniyati mumkin bo'lishi. Oldin hujayralar izotonik eritmada lizosim bilan ishlov berilishi natijasida sferoplastlar hosil qilinadi. Grammanfiy bakteriyaning tashqi membranasining liposaxarid qavatini ikki valentlik kationlar bilan stabillashgan bo'ladi, shuning uchun E. coli ning tashqi membranasini yumshatish uchun etilendiamintetrasirka kislota (EDTA) qo'llaniladi, kislota ikki valentli kationlarni bog'laydi. EDTA bilan ishlov berilganda lipopolisaxaridning bir qismi hujayraning tashqi membranasidan ajralib chiqadi va lizosim murein qopgacha yetib borib, uni gidrolizlaydi. Natijada hujayra qobig'ining o'tkazuvchanligi kuchayadi. Sferoplastlarni E. coli dan hosil qilish va ularni transfeksiya usullarini takomillashishi tufayli har xil faglar DNK molekulasi transformasiyasini effektiv darajaga yetqazish imqoniyati yaratilgan bo'ldi. Zararlikning rivojlanishiga jiddiy ta'sir etadi faglar DNK molekulasi in vivo sharoitida olgan shakli. Halqa yoki chiziq shakldagi, lekin tez o'raladigan DNK adan tuzilgan faglar (lyamboid faglar) transfeksiyaning yuqori effektivligiga ega. Ichak tayoqchasi ustida olib borilgan muvaffaqiyatli tajribalar boshqa prokariot organizmlar bilan analogik ishlar olib borish uchun stimull bo'ladi. Yaxshi natijalar olindi Bacillus subtilis hujayralari bilan ishlaganda. B. subtilis - nopathogen tuproq mikroorganizmi bo'lib, faqat aerob sharoitida yashaydi. Basillalar toksinlar hosil qilmaydi va hayvonlar uchun ham, odamlar uchun ham nopathogen bo'ladi, lekin E. coli ning hujayra qobig'i tarkibida endotoksin bo'lishi tufayli uni gen injeneriyaning maxsulotlaridan ajratish qiyin. Bundan tashqari, basillalarning hujayra qobig'i oddiy tuzilishga ega bo'lib, bakteriyalar sekresiya hosil qilgan oqsillarni atrofidagi muhitga o'tkaza oladi. Masalan, 20 xil basillalar atrofidagi muhitga 40tadan ortiq fermentlar ajratadi. E. coli nisbatan kam oqsillar sekresiya qiladi va ularni ajratish va tozalash ham ancha qiyin. Basillalar tarkibida hozirgi kunda yaxshi o'rganilgan plazmidalar va faglar ham aniqlangan. Begona genlarni klonlashadi tashuvchi vektorlarda. Ushbu vektorlar bir necha xo'jayinlarda bir xil muvaffaqiyatli replikasiyalanadi, masalan, E. coli va B. Subtilis hujayralarida. Vektorlar hosil bo'lgan plazmidalarning

fragmentlarini in vitro sharoitida kombinatsiyasi natijasida. V. subtilis tarkibida bo'lgan E. soli ning genlari o'zining regulyator rayonlari bilan funktsiya bajarmaydi, shu sababdan B. Subtilis ning o'zining gomologik rayonlari qo'llaniladi.

Tarkibida ekspressiyaga uchratadigan gen bo'lgan rekombinant DNKni hosil qilish uchun quyidagi strategiyaga amal qilish kerak. Avvalambor kDNK sintezlanadi yoki klonotekdan genomini fragmentida kerakli geni bor bo'lgan hujayralar ajratiladi va mos bo'lgan vektorda klonlanadi. Genom DNKning fragmentlari modifikatsiyalanadi – ulardan kodlanmaydigan qismlari va qo'shni genlarning uchastkalari olib tashlanadi. Ko'pincha bu operatsiyani o'tqazish uchun DNKning shu fragmenti sekvenirlanadi. So'ng oraliq rekombinan DNK konstruksiya qilinib, ichiga bakterial boshqaruvchi elementlar (promotor, operator, ribosomalar bilan bog'langan nuqtalar) nazoratida turgan gen joylashtiriladi. Ushbu elementlar boshqaruvchi elementlar manbai sifatida konstruksiya qilingan gibril plazmidalardan ajratib olinadi. Hosil bo'lgan konstruksiya mos kelgan vektorga o'rnatiladi, masalan, pBR 322ga, va so'ng gen bakteriya hujayrasida ekspressiyalanadi. Lekin genni maxsus ekspressiya qilinadigan vektorga o'rnatish qulayroq bo'ladi, chunki vektor tarkibida rekombinant plazmidani bakteriya hujayrasiga kirganda faol ekspressiyani amalga oshiruvchi boshqaruvchi elementlar saqlanadi. Bunday effektiv regulyator uchastkalarga kiradi, masalan, R-laktamaza genining kuchli promotori (gen penisillinga chidamli bo'lib, plazmida pBR 322 tarkibiga kiradi).

Bir qator genlar, ularga insulin geni ham kiradi, genning struktur qismida joylashgan restriksiya Pst I saytiga kiritilgan bo'ladi. Shu genning promotori toki RNK-polimeraza o'rnatilgan genning terminatsiyasiga yetishigacha effektiv transkripsiyani amalga oshiradi.

Vektorning markirovka qilish misolida E. soli ning plazmidalaridan biri rBR322 insulin olish uchun Gilbert tomonidan o'tkazilgan birinchi tajribalarni olinadi. Plazmida pBR322 tarkibida ampicillin va tetrasiklinga chidamli 2 gen bo'ladi. Restriktaza PstI ampisillinga chidamlilik hosil qilgan genning o'rta qismida joylashgan plazmidani parchalaydi. Parchalangan plazmidaning uchlariga uchli transferaza yordamida guanin qoldiqlari bilan birga to'rtda nukleotiddan tuzilgan ketma-ketliklar ulanadi. So'ng, odatdagidek

ligazalar yordamida proinsulin geni "tikiladi", natijada rekombinant DNK hosil bo'ladi. Plazmidaga o'rnatilgan DNK fragmenti ampisillinni parchalaydigan fermentni sintezini buzadi, lekin tetrasiklinga nisbatan chidamlilikning ta'minlovchi genning faolligi saqlanadi. Shunday usul bilan transformasiyalangan *E. coli* hujayralari penisillaza va proinsulin ketma-ketliklarini saqlagan gibrid oqsil sintezlanadi, shuning uchun biologik faol bo'lgan insulin hosil qilinadi penisillaza va proinsulinni o'rta segmentini olib tashlash usuli bilan. Agarda begona DNKning fragmenti chidamlilik hosil qilgan genlarning bittasiga kirib qolgan bo'lsa, u inaktivasiya qilinadi. Demak, begona DNKning fragmentini chidamlilik hosil qilgan genlarga kiritib osongina hosil qilish mumkin bakteriyalarda antibiotikga chidamlilikni yo'qotish.

11.7. Sut emizuvchi hayvonlarning hujayralariga genlarning kiritilishi.

Sut emizuvchilarning hujayralari bilan o'tkaziladigan manipulyasiyalarni 2 katta guruhga ajratish mumkin: somatik hujayralari bilan o'tkaziladigan tajribalar va jinsiy hujayralarning transformasiyasi bo'yicha tajribalar Ikkinchi guruhdagi manipulyasiyalar natijasida transgen organizmlar hosil qilinadi.

Genlarning hayvon hujayralariga o'tkazish vektorlarning xarakteristikasi. Hayvon hujayralariga begona bo'lgan informatsiyani yaxshi olib utuvchilardan biri retroviruslar asosida tuzilgan vektorlardir, masalan, sichqonlarning virusini asosida. Ular yuqori effektiv darajada genlarni tashish va stabil holatda hujayralar-nishonlarga kiritishni ta'minlaydi. Hayvon hujayralarining transformasiyasi asosan retroviruslar yordamida (barcha transformasiyalarni 40%ni tashkil etadi) yoki DNK liposomalarga kiritiladi (25%), kamroq adenoviruslar qo'llaniladi, chunki ular kuchli immun javob hosil qilish mumkin, bundan tashqari, qayta kiritish mumkin emas. Begona DNKni in vitro yetqazish muammo emas, chunki uni har xil to'qimalarning hujayra-nishonlarga in vivo sharoitda yetqazish hal bo'lgan, asosan to'qimalar uchun xususiy bo'lgan reseptor oqsillarni, shuningdek antigenlarni yetqazadigan konstruksiyalar yaratilgan. Ammo vektor tizimlarning xususiyatlari (integratsiyaning stabiligi, boshqariladigan ekspressiya va xavfsizligi) to'liq hal bo'lmagan, integratsiyaning stabiligi. Xozirgi

kunga qadar genomga integratsiya hosil qilish faqat retrovirusli yoki adenoassosiirlangan vektorlar qo'llanilgandagina amalga oshar edi. Stabil integratsiyaning effektivligini kuchaytirish mumkin genlarning konstruksiyasini takomillashtirish yo'li bilan yoki stabil episom vektorlarning (DNK-strukturalar, yadro ichida uzoq davom etadigan persistensiyalash xususiyatiga ega bo'lgan) yaratilishi tufayli.

Oxirgi yillarda alohida e'tibor sut emizuvchilarning sun'iy xromosomalarining asosida (MAC - mammalian artificial chromosomes) vektorlar hosil qilishga qaratilgan. Oddiy xromosomalarning asosiy tuzilmaviy elementlari bo'lishi tufayli bunday mini-xromosomalar hujayrada uzoq vaqt davomida saqlanadi, bundan tashqari, ular genomning genlarini va genlarning kerakli to'qimada, kerakli vaqtda to'g'ri ishlashga zarur bo'lgan tabiiy boshqaruvchi zlementlarni tashish xususiyatiga ega bo'ladi. Bunday sun'iy xromosomalar achitqilar (YAK) uchun yaratilgan, chunki achitqilarning genomi to'liq xaritalangan. Modifisirlangan hujayralarning identifikatsiyasi uchun markerlar (nishonlar) kerak bo'ladi. Agarda somatik hujayralar transformasiyaga uchrasa, odatda selektiv markerlar qo'llaniladi.

Aksel' va uning kasbdoshlari (Kolumbiya universiteti) sichqon hujayralarining "genetik" defektini to'g'rilaydi. «ispravili» takim obrazom geneticheskiiy defekt kletok mishi. Olimlar herpes virusidan ajratib olingan timidinkinaza (TK) genini saqlaydigan DNK fragmentini olib, bir necha milligramm lososs spermasidan ajratilgan tashuvchi - DNK bilan aralashtiriladi va sichqonlarning L-hujayralari o'sayotgan timidinkinaza geni (TK-) bo'lmagan muhitga o'tkaziladi. 100000 hujayralardan bittasi TK geniniga ega bo'ladi, shu sababdan TK-hujayralari o'smaydigan muhitda, TK+-hujayralar o'sadi va normal ko'payadi.

Boshqa selektiv marker - digidrofolatreduktazani (DGFR) kodlaydigan gen bo'lib, sichqonlarning mutant bo'lmagan liniyalaridagi hujayralarining transformasiyasida qo'llash mumkin. Ushbu genning ko'p miqdorli kopyalarini ekspressiyasi tufayli, hayvon hujayrasi plazmidasi bilan birga fermentning yuqori konsentratsiyadagi ingibitorlariga chidamlilik hosil qiladi, natijada ingibitorning yuqori konsentratsiyalarida transformantlarni ajratib olish mumkin bo'ladi. Yana normal hujayralarda o'z funksiyasini

bajaradigan, marker genlarga ega bo'lgan ikkita universal vektorlar ishlab chiqilgan. Ularning tuzilishi bitta prinsipda amalga oshadi: transfesirlangan hujayralarning fenotipini ifodalovchi prokariotlarning genlari, eukariotlarning regulyator signallari bilan birlashtiriladi. Vektorlardan bittasi prokariotlarning antibiotik neomisinga chidamlilik hosil qilgan genidan tuzilgan bo'lib, SV-40 genomiga kiritiladi. Eukariot hujayralar neomisinga analogi bo'lmish G 418 ga sezuvchan bo'ladi, lekin gen maxsuloti ta'sirida sezuvchanligi yo'qoladi. Shunday qilib, transfesirlangan hujayralar G 418 bo'lgan muhitda yashash xususiyatiga ega bo'ladi.

Sut emizuvchilarning somatik hujayralarining genetik transformasiyasi. Sut emizuvchilarning transformirlangan hujayralarni har xil moddalarni sintezlash uchun qo'llaniladi. Hayvon hujayralari sun'iy usulda ko'pgina o'stirish mumkin bo'lsa ham, ekonomik jihatdan unchalik foydali emas, bakterialar va achitqilarga nisbatan. Lekin ular muhim afzallikga ega – sut emizuvchilarning geninig maxsulotini, ya'ni oqsilni mayda, ammo juda ahamiyatli modifikasiyalar hosil qilish xususiyatiga ega. Masalan, bir qator oqsillarning effektiv funkciyasini bajarish uchun ularga uglevodlar yoki lipidlar molekularining zanjirlari birikishi zurur. Bunday zanjirlarning hosil bo'lishi va birikishi sut emizuvchilarning hujayralari uchun oddiy jarayon hisoblanadi, bakteriya hujayrasi esa, shunga o'xshash modifikasiyalar qila olmaydi.

Sut emizuvchilarning somatik hujayralarini transformasiyasi hujayralar-produsentlar hosil qilishdan tashqari, genlar ekspressiyasining boshqarilishini nafis mexanizmlarini o'rganish uchun imqoniyat yaratadi va hayvon hujayralarini genetik apparatini maqsadli modifikasiyalash, kerak bo'lsa odamning ham, ya'ni tibbiy genetika uchun katta ahamiyatga ega.

Sut emizuvchilarning sun'iy usulda o'stirgan hujayralari hayvonlar va odamga vaksina hosil qilishda ayrim virus antigenlarini, ajratish manbai bo'lishi mumkin. Vaksinalar hosil qilish uchun bunday hujayralarni rekombinant DNK olish texnikasi va sut emizuvchilar bilan odam uchun tayyorlangan effektiv ekspressiya vektorlar yordamida amalga oshiriladi. DNK-vaksinalarni qo'llashda organizmga antigen yuborilmaydi, shu antigenni kodlaydigan gen yuboriladi. Gen plazmidaga kiritiladi, plazmida esa, organizmga oddiy in'eksii shaklida

yuboriladi. DNK-vaksinalarning hayvon xujaligida qo'llashda yaxshi natijalar olish mumkin.

Fiber – virus qobig'ining oqsili. Fiberning epitopi kodiruet sintez protektiv antitelalarning sintezini kodlaydi. Qushlarning kasalliklaridan biri –tuxum qo'yishning susayish sindromini virus chaqiradigan kasallikdir. Ushbu virusning DNKsidan fiberni kodlaydigan gen ajratiladi, so'kn klonlashtiriladi va plazmidaga kiritiladi. Rekombinant vaksina organizmga kiritilganda o'zi bilan birga fiberning DNKsini ham hujayraga olib kiradi, natijada virus oqsilini sintezlanishi xususiy antitelalarning (antitanachalar) sintezini amalga oshiradi, ya'ni immun javob hosil bo'ladi. Bunday vaksinalarning afzalligi shundan iboratki, birinchidan – kichik xajmi (bitta sichqonni immunizasiya qilish uchun 10-50 mkg, bitta sigir uchun - 200-300 mkg), ikkinchidan, organizmda bir yilgacha saqlanadi.

Xozirgi vaqtda mikoplazmalar, sil kasalligini chaqiruvchisi, salmonella va leyshmaniyalarga qarshi DNK-vaksinalar klinik sinovlarini o'tilmoqda.

Havfli o'smaning organizmda rivojlanishi odatda immunitetni susaytiradi. Demak, o'smalarga qarshi kurashda immun tizimining faoliyatini kuchaytirib, ta'sirini rak hujayralarga qarshi yo'naltirish kerak. Enn-Arbor tibbiyot maktabining izlanuvchilari (Michigan) rak kasalligiga qarshi usul yaratadi. Sichqonlarning yo'g'on ichagini o'sma hujayralariga boshqa sichqonlarning oqsillarini kodlaydigan genlari yuboriladi. Genlarni liposomalar yoki viruslar orqali yuborish mumkin. Hujayra membranasining tashqi tomonida ushbu oqsillar paydo bo'lsa, demak immun tizimi bunday hujayralarga qarshi kurashgan bo'ladi. 20 % kasallangan sichqonlar sog'ayib ketadi, 70% sichqonlarda o'smaning xajmi kamayadi, nazorat guruhida esa, sichqonlarning barchasi haloq bo'ladi. Limfositlar faqat "nishonlangan" o'smaning hujayralari bilan qurashdan tashqari, metastaz hujayralari bilan ham kurashgan bo'ladi, demak, immun tizimi "o'yg'ondi"ekan. Xozirgi vaqtda teri rak kasalligi bilan kasallangan bemorlar ustida tajribalar olib borilmoqda.

11.8. Genoterapiya.

Genlar yordamida kasalliklarning davolash genoterapiya deyiladi. Butun dunyo bo'yicha 400ga yaqin loyihalar genoterapiya davolash usulini ishlab chiqishga qaratilgan. Gen terapiya loyhasini ishlab chiqishdan oldin to'qima hususiylikga tegishli gen ekspressiyasini, birlamchi biokimyoviy defektning identifikasiyasi, uning oqsil mahsulotining struktura va funksiyasini, hujayrada Ushbu barcha ma'lumotlar tegishli tibbiy protokol tuzilganda e'tiborga olinadi.

Irsiy kasallikning genokorreksiyasini aprobasiyasi bemorlarning sun'iy usulda o'stirilgan (in vitro), ushbu gen normada funksional faol bo'lgan hujayralarida olib boriladi. Mana shu hujayralar modellarida ekzogen DNKni tanlangan o'tkazish tizimini effektivligi baholanadi, kiritilgan genetik konstruksiyaning ekspressiyasi, hujayra genomi bilan bo'lgan munosabati tag'lil qilinadi, bundan tashqari, biokimyoviy darajada korreksiya usullari ishlab chiqiladi. Hujayralarni sun'iy usulda o'stirib, rekombinant DNKni kerakli joyga yetkazish tizimini ishlab chiqish mumkin, lekin qanchalik ushbu tizim ishonchli darajada ishlashini faqat organizm darajasida aniqlash mumkin (in vivo). Shu sababdan, alohida e'tibor genoterapiyaga bag'ishlangan loyihalarida in vivo sharoitida tabiiy va sun'iy irsiy kasalliklar bilan kasallangan hayvonlar ustida izlanishlar olib boriladi.

Bunday hayvonlarda genetik defektlarni muvafaqqiyatli korreksiya qilish, va genoterapiyaning keraksiz qo'shimcha effektlarning bo'lmasligi klinik tajribalar o'tkazish uchun imqoniyat yaratiladi.

Shunday qilib, irsiy defektning genokorreksiyasini standart sxemasi bir qator ketma-ket kuzatiladigan etaplardan tashkil topgan bo'ladi. Eng oldin sifatli ishlaydigan, ya'ni ekspressirlanadigan, tarkibida oqsilni kodlaydigan va genning boshqaruvchi qismi bo'ladigan genetik konstruksiya tuziladi. Keyingi etapda vektorning muammosi hal qilinadi va iloji bo'lsa, hujayra nishonlarga genning yetqazish usuli aniqlanadi. So'ng transfeksiya (hosil bo'lgan konstruksiyani o'tkazish) hujayralar-nishonlarga o'tkaziladi, transfeksiyaning effektivligi va birlamchi biokimyoviy defektning korreksiya bo'lish darajasi in vitro va in vivo sharoitlarda baholanadi. Shundan keyin klinika sharoitida tajribalar o'tkazish mumkin.

Genoterapiyaning ikki tipi mavjud: o'rnini bosuvchi va korreksiya qilish. O'rnini bosuvchi genoterapiyada hujayraga shikastlanmagan gen kiritiladi.

Kiritilgan kopia funksiya jihatidan bemorning defekt genini o'rnini oladi. Hozirgi kunda barcha klinik sinovlar hujayraga qushimcha DNK kiritish usuli bilan amalga oshiriladi. Korreksiya usuli bilan o'tkaziladigan terapiyada defekt geni rekombinasiya natijasida normal genga almashtiriladi. Hozircha ushbu usul laborator sinovlarda qo'llaniladi, chunki uning effektivligi juda past.

Ekzogen DNKni pasient genomiga kiritish usuli in vitro (ex vivo) yoki in vivo sharoitda amalga oshirish mumkin.

Hujayra gen terapiyasi yoki terapiya ex vivo da pasientning xususiy tipdaga hujayralar ajratiladi va sun'iy usulda o'stiriladi, so'ng ularning tarkibiga begona genlar kiritiladi, undan keyin transfesirlangan hujayralar tanlanadi va o'sha pasientga reinfuziya qilinadi. Misol qilib olish mumkin, kombinasiyalangan immunodefisitning davolashishi. Kombinasiyalangan immunodefisit adenozindezaminaza genining defektini natijasi bo'lishi mumkin. Birinchi marta bunday bemorni genoterapiya usuli bilan davolashga urinishgan 1990 yilda AQShda.

Bemor boladan T-limfositlar ajratib olinadi, retrovirus vektori yordamida transformasiya qilinadi, so'ng adenozindezaminazaning sog'lom geni yuborilib, hujayralarni yana shu bemorga yuboriladi. Bemorga bir necha marta hujayralarni qayta yuborish kerak bo'ladi.

Suyak iligining o'zak hujayralarini transformasiyasi effektivliroq natija beradi.

in vivo sharoitdagi gen terapiyasi bemorning maxsuslashgan to'qimalariga klonlashgan va ma'lum shaklda joylashtirilgan DNK ketma-ketliklari to'g'ridan to'g'ri yuboriladi. Hozirgi vaqtda o'pka hujayralarni su'iy usulda o'stirishni hammabop usuli yo'q, shu sababdan o'pka kasalliklarida begona genni kiritishini bittagina usuli - genni o'zini to'g'ridan to'g'ri organizmg yuborish..

Mukovissidoz – oq tanlilar orasida keng tarqalgan irsiy kasallik, masalan, Markaziy yevropa aholisida 2500 tug'ilgan chaqaloqlarga bitta bemor to'g'ri keladi. Kasallikning kelib chiqishi defekt genga bog'liq, gen transmembran o'tkazuvchanlikning boshqaruvchi oqsilni

kodlaydi. Gening defektini asosiy ko'rinishi epiteliy hujayralarning shikastlanishi (o'pka, ichak, bezlar).

Asosiy muammo – kanday qilib genni shilimshiq modda bilan qoplangan hujayralarga yetqazish, chunki shilimshiq modda transformasiyaga to'sqinlik qiladi. "Kasallikning genini" shikastlanmagan kopiyasini adenovirusdan hosil bo'lgan vektor yoki liposomaga kiritiladi va aerosol shaklida bemorning nafas yo'llariga yuboriladi.

Progressiv mushak distrofiyada - Dyushenn distrofiyasi (gen X-jinsiy xromosomada joylashgan, resessiv tip bo'yicha nasllanadi) kuzatilgan o'zgarishlarni korreksiya qilish uchun ayrim olimlar distrofin oqsilini kodlaydigan normal genni mushak tolalariga ukol shaklida adenovirus vektori yordamida yoki faqat DNKning o'zi yuborilshadi. Boshqalari esa, bemorga genetik korreksiya qilingan mioblastlarni transplantasiya qilishadi, mutlaqo haraktsiz bemorda harakatla paydo bo'ladi.

Afsuski, barcha tajribalar faqat vaqtincha terapevtik effekt beradi, shu sababdan genni kiritishini bir necha marta taqrorlash kerak bo'ladi. Genlar bilan davolash harakat qilinmoqda yoki rejalashtirilgan irsiy kasalliklarning soni juda ko'p: bo'g'imlarning bod kasalligi, fenilketonuriya va gormonlarning yetishmovchiligi tufayli kelib chiqqan kasalliklar (insulin, eritropoetin, o'sish gormoni). Surunkali anemiyada, eritropoetin yetishmovchiligi tufayli kelib chiqqan kasallikda, olimlar hayvonlar ustida tajribalar o'tkazib, davolashni yangi usulini taqlif etadi. Bizning barcha hujayralarimizning genomi bir xil, shuning uchun teri fibroblastlarni, aslida ular normada eritropoetin sintezlamaydi, ushbu gormonni hosil qilishini majbur qilish mumkin. Bunga erishish uchun hujayra genomiga eritropoetin genini ekspressiyaga uchratadigan yangi boshqarish genetik elementlar yuboriladi, chunki fibroblastlarda ham eritropoetinni kodlaydigan gen mavjud, ammo nofaol holatda bo'ladi degan fikrda..

Genoterapiya faqat irsiy kasalliklarni davolashda qo'llanishdan tashqari OITS kasalligini davolashda ham qo'llanishi mumkin. Kasallikning chaqiruvchisi retrovirus bo'lib, T-limfosit va makrofaglarni shikastlaydi. Kasallikni yengish mumkin, agarda yangi genlar hosil qilinib, zararlangan limfositlarqa yuborilsa, viruslar ko'paymaydi. OITS

ga qarshi qurash uchun yangi genlarni kiritishga asoslangan ko'pgina usullar taqlif etilgan. Hammasi ham retrovirusning genomini tuzilishi va funksiyasi to'g'risidagi yangi ma'lumotlarga asoslangan bo'ladi. Masalan, bemorning mushaklariga tarkibida OITS ning ayrim genlari bo'lgan retrovirus vektorlari kiritiladi. Olimlarning fikri bo'yicha OITS genlari hujayinning xromosomalarini DNKsiga birikib, virusning oqsillarini sintezi to'g'risida informasiya yetqazadi, natijada ushbu oqsillar bilan bemor immunizasiya bo'ladi. Lekin hozirgacha ijobiy natijalar olinmagan, virus juda ham o'zgaruvchan.

Onkologik kasalliklarning davolashda genoterapiyaning istiqboli porloq. Olimlarning yillar davomida izlanishlari natijasida xulosa qilindi, rak- genetik kasallik bo'lib, rivojlanishi bir necha stadiyalardan davomida kuzatiladi va hujayrada genetik buzilishlar yig'ilishi natijasida kasallik kelib chiqadi. Demak, har bir genetik effekt genoterapevtik yondoshishi uchun xizmat qilishi mumkin.

Gen redaksiyasining CRISPR texnologiyasi. Bakteriya va arxealar hayvon va odamlarga o'xshab immun himoyasi bo'lmaydi, deb o'ylagan edik. Bizning organizmimizda immunitetga javobgar bir qancha hujayralar bo'lib, ular immun organlar bilan bitta murakkab tizimni tashkil etadi. Lekin, bakteriyalarda ham sodda tuzilishga ega bo'lgan, tashqi dushmanlar, fag va boshqa patogenlardan himoya qiluvchi immunitet bo'ladi. 1989 yilda yapon izlanuvchilar ichak tayoqchani genomida ko'p marta taqrorlangan qismni aniqlashadi va uni CRISPR-lokus deb nomlashadi, ingliz so'zidan «clustered regularly interspaced short palindromic repeats» – kalta palindrom guruhlar hosil qilib joylashgan taqrorlanishlar. Ularning strukturasi nukleotidlar ketma-ketliklarga identik edi, lekin oraliklar, ya'ni speyserlar (ing. «spacer»- ajratuvchi, qo'shmoq) har xil mumkin, ko'pincha faglar va plazmidalarning ketma-ketliklariga gomologik bo'ladi. Aslida, bunday qism (uchastok) – bu populyasiyaning genetik xotirasidir, ya'ni tashqi dushman bilan to'qnashib, omon qolgan bakteriya hujayrasi. Boshqa so'z bilan aytganda bunday oraliklarda (speyserlarda) bakteriofaglar to'g'risida informasiya saqlanadi, natijada bakteriyalar yagona himoya tizimi yordamida patogenlarning halokatli ta'siridan saqlanadi. Adaptiv molekulyar immunitet tarkibiga kiradi palindrom taqrorlar, speyserlar va maxsuslashgan nukleozalarning Cas (ing.

«CRISPR-associated protein» – CRISPR-assosiyalangan oqsil) genlari, shularning ichida Cas9 ham bor.

Savol tug'iladi: nima sababdan nukleaza 9 raqam bilan belgilangan? Haqiqatda ham bakteriya hujayrasida nukleazalar soni o'ntadan ortiq, lekin krispersistemaning funksiyasini bajarishiga mos keladigani Cas9 bo'lib chiqdi. Uning makromolekulasini o'zi ikkita kritik domendan tuzilgan – RuvC va HNH, har bittasi faqat DNKning bitta zanjirida uzilish hosil qiladi. Agarda bakteriya hujayrasiga fag kirgan bo'lsa, uning genomida fagning "izi" saqlanadi, natijala fagning haloq bo'lish xavfi yuqori darajada kuzatiladi. Ushbu tizim (sistema) 40% sekvenirlangan bakteriyalar va 95% – arxeylar genomida aniqlangan.

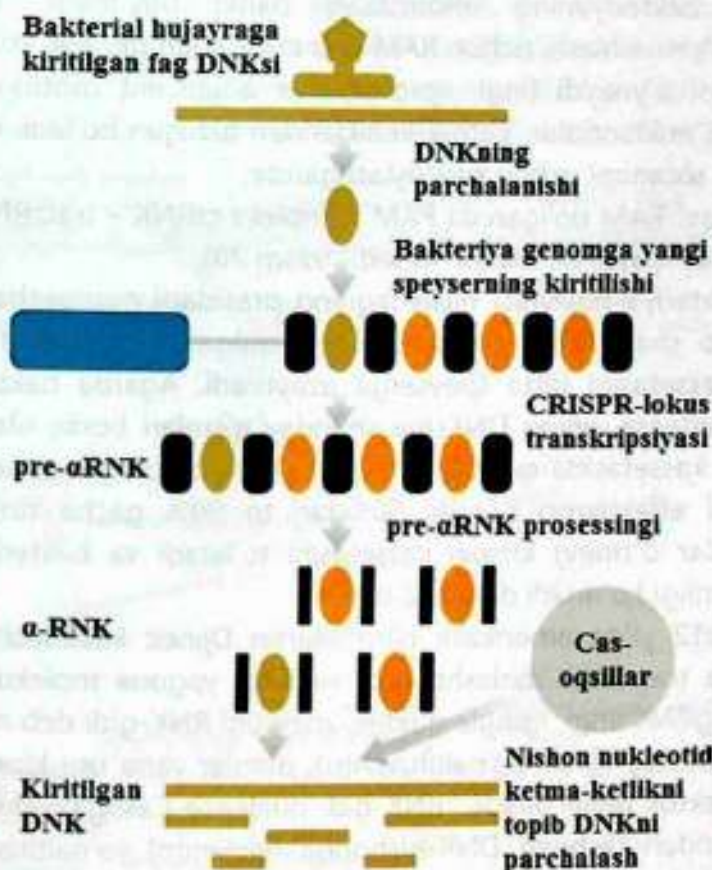
2012 yilda hayvonlar va odam genomini redaksiyasi uchun CRISPR/ Cas9 qo'llash texnologiyalarning birinchi tasvirlari ilmiy maqolalarda paydo bo'ladi, ilmiy adabiyotda «krispersistema» deb nomlanadi. O'sha vaqtdan beri shu mavzu bo'yicha maqolalar soni ko'payib bormoqda. Aniqlandi, krisper-sistemaning komponentlarini boshqa genomlarga ham adaptasiya qilish, eukariotik hujayralarga kiritish mumkin bo'ladi, tizim qanday programma berilgan bo'lsa, o'sha programma bo'yicha ishlaydi. Masalan, odam genomida 3,2 mlrd juft nukleotidlar bo'ladi, mana shu uzunligidagi ikki zanjirli DNKni ma'lum joyida kesish mumkin yoki "shigastlangan" genni olib, o'rniga "sog'lom" yoki "davolangan" genni kiritish mumkin bo'ladi.

CRISPR/Cas9 tizimi qanday tuzilgan? Har bir ma'lum lokusdagi barcha palindrom taqrorlar tuzilishi jig'atidan tuzilishi jihatidan bir xil bo'lib, 24tadan to 35 juft nukleotidlardan tashkil topgan, ular faqat nukleotidlar ketma-ketliklari bo'yicha farq qiladi. CRISPR-lokusga birikkan bo'ladi lider nukleotidlarning ketma-ketligi va Cas-nukleazaning kodlovchi genlari (rasm 69).

Lider ketma-ketligi CRISPR-lokusning transkripsiya jarayonini amalga oshiruvchi promotor vazifasini bajaradi. Transkripsiya natijada hosil bo'ladi pre-crRNK (CRISPR-RNK), Cas9-nukleaza yordamida kesilgandan keyin - oddiy crRNK.

Har bir uchastkada taqrorlanishlar va speysierlarning qismi bo'ladi. Ikki zanjirli DNKning kesilishi Cas9-nukleaza yordamida va crRNK va tracrRNK nazorati ostida amalga oshadi (RNKning yana bitta uncha katta bo'lmagan roli - Cas9 oqsilni faolliqini ta'minlash va shu

bilan CRISPR-Cas9 kompleksni katalitik funksiyasini saqlash. Kompleks crRNK – tracrRNK – Cas9 bakteriyalarning himoya "immun" tizimining asosiy quroli hisoblanadi.



Rasm 69. Bakteriya genomiga yangi speyserni kiritilishi va bakteriya hujayrasining himoya tizimida qo'llanishi.

DNKning ikki zanjirli molekulasini uzish uchun Cas9 fermenti va RNKning ikkita fragmentlardan tuzilgan kompleksini: crRNK va tracrRNK faolligi yetarlidir.

Bakteriofagning DNKsida joylashgan speyser uchastqalar tufayli crRNKni nukleotidlarining ketma-ketliklari fiksajlanadi, so'ng faollashgan Cas9-nukleazalar ularni parchalaydi. Aslida crRNK va

trackRNK Cas9 uchun DNK fagning nukleotidlar ketma-ketliklar "dengiziga" tushish uchun yo'l ko'rsatuvchi rolini bajaradi. Fagning DNKsi degradasiyasidan keyin, uning fragmenti speyser sifatida bakteriyaning CRISPR-tizimiga o'tadi, ya'ni krisper-kassetta uzayadi, natijada bakteriyaning informatsiya banki boyitiladi. Tizimning muvaffaqiyatli ishlashi uchun RAM deb ataladigan genetik komponent muhim rol o'ynaydi (ingl. «protospacer adjacent motif») – kalta, o'rtacha 3 nukleotidlar ketma-ketliklaridan tuzilgan bo'ladi. U maxsus bakteriya shtammi uchun xususiylashgandir.

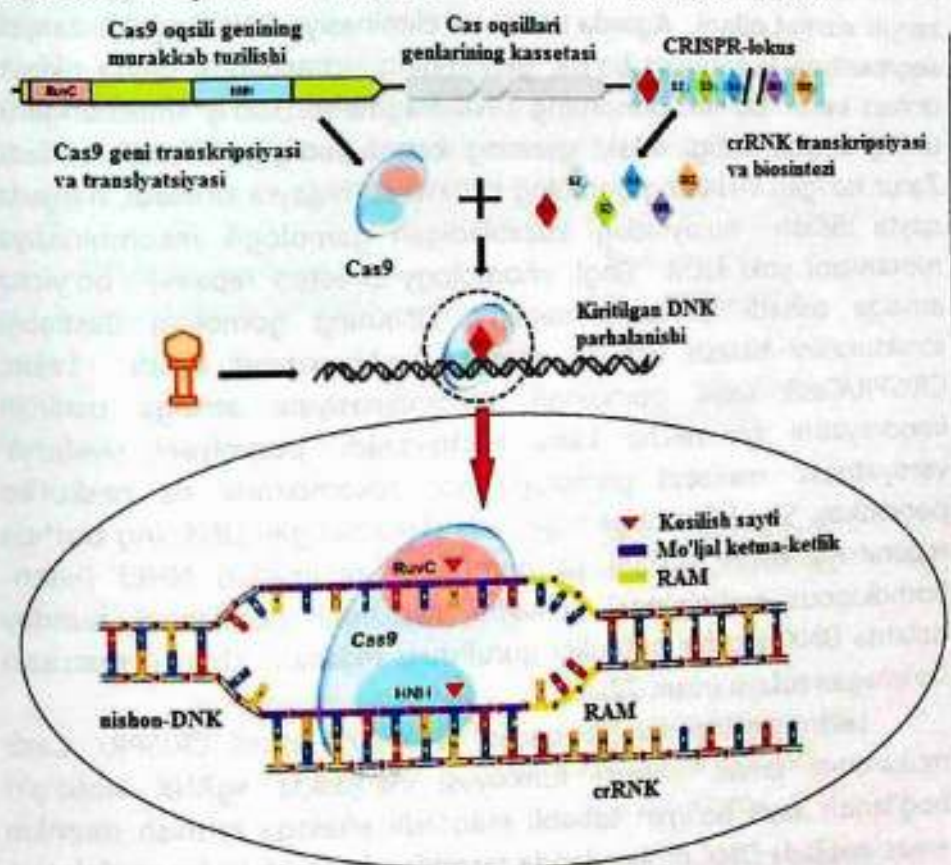
Faqat PAM bo'lganida PAM kompleks crRNK – tracrRNK – Sas9 nishonni aniqlaydi va DNKni "kesadi" (rasm 70).

Bakteriya hujayrasi bilan fagning orasidagi munosabatini yana bir ajoyib shakli bor: faqat 3% tirik qolgan bakteriyalar o'zining krisper-kassetasini bitta speyserga uzaytiradi. Agarda bakteriya fag bilan zararlansa, uning DNKsida shunday qismlari borki, ular qisman bakterial kassetasida qaysidir speyser bilan gomologik bo'ladi, uning to'latilishi effektivroq boradi: 50%dan to 90% gacha tirik qolgan bakteriyalar o'zining krisper-kassetasini to'latadi va bakteriyalarning hayotchanligi ko'rinarli darajada ortadi.

2012 yilda amerikalik olim Martin Djinek kasbdoshlari bilan crRNK va tracrRNK birlashtiriradi va bitta yagona molekulani hosil qiladi – sgRNK (ingl. «single guide», xozir uni RNK-gidi deb nomlanadi yoki RNKning ximer yo'naltiruvchisi), olimlar yana uni klonlashtirish uchun vektor taqlif qiladi. RNK-gidi nukleaza Cas9ga juda o'xshash bo'lib, undan tashqari DNK-nishonga fermentni yo'naltirish xossasi yuqori darajada kuzatiladi guyo tabiiy srRNK va tracrRNK larga o'xshab. Amaliyotda kompleks «RNK-gid + Cas9 + vektor» Ye.coli tarkibida molekulyar klonlanadi so'ng bakteriyadan ajratilib, genomida redaksiya qilinadigan genlar bor bo'lgan hujayraga transfeksiya amalga oshiriladi.

2013 yilda ishlab chiqilgan bunday modifisirlangan genoinjener yondoshish mikroorganizmlar, hayvonlar va odam genomlarining redaksiya qilishda ZFN- va TALEN-texnologiyalarga nisbatan yuqori effektiv natija beradi va solishtirganda muhim ustunlikka ega. Ularning ichida asosiysi, krispersistemadagi nishonini nukleotidlar ketma-ketliklarni aniqlash uchun javob beradi RNK gidini uncha katta bo'lmagan, DNK-nishonning 20 nuklein asoslarga teng

bo'lgan qismi, ZFN va TALEN nukleazalar esa, ularning makromolekulalar tarkibida bo'lgan domenlar yordamida ayrim nukleotidlarni aniqlashadi. Bundan tashqari, ZNF va TALEN geteropolimerlar sifatida o'z funksiyasini bajarishadi va ikki zanjirli DNKni jufti qismida kesadi, Cas9 esa, DNK-nishonni birdaniga ikkala zanjirini yoki ikkalasidan birini kesadi. Cas9 DNK-nishonni bitta joyida kesadi, agarda domenlardan birini RuvC yoki NHH faolligi bostirilgan bo'lsa. Bunday holatda ferment Cas9-nikaza deb nomlanadi.



Rasm 70. Bakteriya DNKsi kesishining CRISPR/Cas9-majmuasi tomonidan nazorat qilinishi sxemasi.

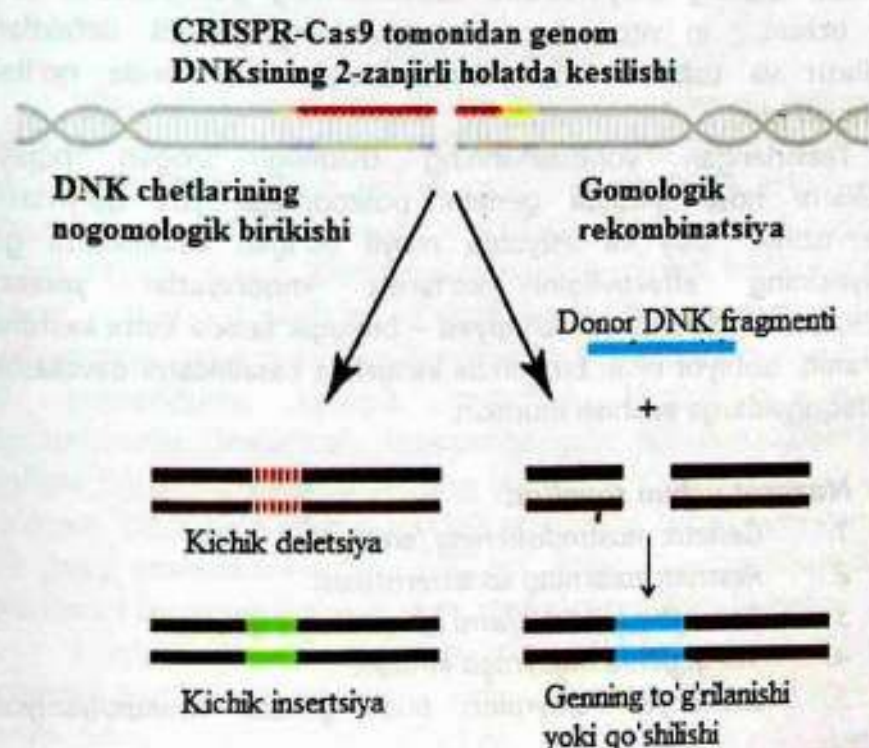
2015 yilda krisper-tizimni tasviri to'g'risida ilmiy maqola nashr etilgan. Maqolada krisper-tizim ikki zanjirli DNK ni kesganda to'rttoq uchlar hosil qilmasdan, balki yopishqoq uchlar hosil qilishi to'g'risida ma'lumotlar keltirilgan, natijada reparatsiya mexanizmlar yordamida genomlarning redaksiyasi osonlashadi.

Qanday qilib gendagi defektini yoki butunlay defekt genini eliminiyasiyadan so'ng DNK uchastkasidagi nukleotidlar ketma-ketliklarni qayta kerakli bo'lgan tartibda hosil qilish mumkin? Bu yerda bir necha variantlar bo'lishi mumkin. Agarda DNKning bitta ipida uzilish kuzatilgan bo'lsa (ma'lum sharoitda Cas9-nikaza yordamida amalga oshishi mumkin), hosil bo'lgan bo'sh joylar replikativ reparatsiyaning fermentativ tizimi yordamida komplementarlik prinsipi bo'yicha tiklanadi, matrisasi bo'lib, DNKning ikkinchi tegilmagan to'g'ri zanjiri xizmat qiladi. Agarda uzilish va eliminasiya DNKning ikki zanjirli segmentida kuzatilgan bo'lsa, genomning uchastkasini qayta tiklash uchun kerak bo'ladi donorning DNK fragmenti (sun'iy sintezlangan), uning ketma-ketligi intakt genning ketma-ketligiga identik bo'ladi. Zarur bo'lgan DNKning gomolog uchastkasi hujayra kiritiladi, natijada qayta tiklash hujayradagi kuzatiladigan gomologik rekombinasiya mexanizmi yoki HDR (ingl. «homology-directed repair») bo'yicha amalga oshadi. Shikastlanmagan DNKning gomologi dastlabki strukturasi tiklash uchun matrisa bo'lib xizmat qiladi. Lekin, CRISPR/Cas9 usuli gomologik rekombinasiyani amalga oshirish imqoniyatini bir necha karra kuchaytiradi. pozvolyaet uvelichit' veroyatnost' realizasii gomologichnoy rekombinatsii na neskol'ko poryadkov. Shu bilan birga hujayrada shikastlangan DNKning boshqa reparatsiya tizimi bo'ladi va gomologik bo'lmagan NHEJ («non-homologous endjoining») uchlarini ulash deb nomlanadi, bunday holatda DNKning bir butunligi quruluşsiz tiklanadi, chunki matrisasi bo'lmagan tufayli (rasm 72).

Lekin, xozirgi kunga qadar redaksiya tizimi CRISPR/ Cas9 mukammal emas, chunki funksiyasi natijasida sgRNK noto'g'ri bog'lanish xavfi bo'lgan sababli maqsadli effektga erishish mumkin emas, natijada DNK molekulasida tasodifan kesilgan joylar va delesiya va insersiyalar paydo bo'ladi, ya'ni qo'shimcha xatoliklar. Ko'pchilik laboratoriyalarning maqsadi xatoliklarni kamaytirish va gomologik rekombinasiyalarni amalga oshirish.

Biologik fanning rivojlanishi krispr-tizimini qo'llash irsiy kasalliklarning muammosi hal qilishda tasodifan imkoniyatlar yaratadi. Irsiy kasalliklarni o'rganishda olimlar, bitta yengib bo'lmaydigan qiyinchilik bilan to'qnashadi: patologiy jarayonni modelini hosil qilish. Hayvonlar ustida o'tkazilgan tajribalar kasal odamda kuztilgan genetik

va fenotipik xususiyatlar kompleksini aks ettirmaydi. CRISPR usuli odam populyasiyasi uchun irsiy kasalliklarni modelini yaratishda foydali bo'lishi mumkin. Krisper tizimi yordamida poligen kasalliklarning modellarini yaratilishi, qaysi genlar hujayrada fenotipik o'zgarishlarga olib kelishini, qanday qilib hujayralardan har xil genetik jihatidan to'qimalarning rivojlanishi va patologik jarayonning rivojlanishida qanday molekulyar o'zgarishlarni aniqlash mumkin. Shunday ma'lumotlar asosida butun organlarning hosil qilish dasturlar shakllanadi.



Rasm 71. Genom DNKning defekt geni joylashgan joyida kesilishi va DNKning redaksiya qilingan uchastkasini tiklanishi.

CRISPR/Cas9 yordamida bajaradigan boshqa vazifa – virus infeksiyalarning davolash usulini ishlab chiqish, masalan, OITS virusini HIV-1, natijada hujayralar HIV-1ga nisbatan sezuvchanligini yo'qotadi, mutasiyalar tufayli kelib chiqqan har xil irsiy kasalliklarni

(mukovissidoz, Dyushen miodistrofiyasi, gemofiliya, o'roqsimon anemiya va boshq.) korreksiya qilish imqoniyati yaratiladi.

Mutasiyalarni korreksiya qilish uchun (kasalliklarning sabablari) odamning indusirlangan plyuropotent o'zak hujayralari qo'llaniladi. Ularni irsiy kasallik bilan kasallangan bemorning har qanday somatik hujayrasidan hosil qilish mumkin. Plyuropotentlikni induksiyasidan so'ng ushbu hujayralarning mutasiyalarini to'g'rilash (redaksiya qilish) yoki har xil yo'nalishda differensiyalash mumkin bo'ladi, ya'ni organizmning har qanday hujayrasiga aylantirish. Boshqa so'zlar bilan aytganda, bizning ihtiyorimizda kasalliklarning patogenezi tahlil qilish uchun, in vitro sharoitida modelning genetik defektlarni to'g'rilash va ushbu ma'lumotlarni davolash usullarida qo'llash imqoniyati bor.

Tasvirlangan yondoshishning ustunligi izogen hujayra modellarni hosil qilishda genetik polimorfizga yo'l qo'ymaslik. Krisper-tizimi irsiy va irsiyotga moyil bo'lgan kasalliklarni gen terapiyasining effektivligini ko'tarish imqoniyatlar yaratadi. CRISPR/Cas9 redaksiya texnologiyasi – biologik fanida katta kashfiyot hisoblanib, tibbiyot bilan birgalikda kelajakda kasalliklarni davolashda muvaffaqiyatlarga erishish mumkin.

Nazorat uchun savollar:

1. *Genetik muxandislikning fermentlari.*
2. *Restriktazalarning xarakteristikasi.*
3. *Rekombinant DNKlarni konstruksiya qilish.*
4. *Yangi genni hujayraga kiritishi.*
5. *Bakteriya hujayralari bilan genetik manipulyasiyalar o'tkazish.*
6. *Sut emizuvchilarning hujayralariga genlarni kiritishi.*
7. *Genoterapiya.*
8. *CRISPR ning genlar tahriri texnologiyasi*

BOB 12. MOLEKULAR GENETIKADA QO'LLANADIGAN LABORATOR TEKSHIRISH USULLARI.

12.1. Sitogenetik tekshiruvlar.

Sitogenetik tekshirish - bu xromosomalarning mikroskopik tahlili bo'lib, uning natijalari turli kasalliklarning patogenetik asosini ilmiy tekshirish, tasniflash, tashxis qo'yish, davolash uchun juda muhim ahamiyatga ega. Xromosomalar morfologiyasi hujayra sikli bosqichiga qarab o'zgarib turadi. Xromosomaning mikroskopik tahlilini o'tkazish uchun diskret tuzilishda ko'rilishi kerak. Bu ayniqsa, mitozning prometafaza bosqichida, qaysikim, har bir xromosoma xuddi ikkita bir xil xromatiddek, ayniqsa, metafaza bosqichida, qachonki xromosomalar maksimal' kondensirlangan va biri ikkinchisidan alohida hujayra markazida yagona ekvatorial' chiziqda joylashganligi ko'rinadi. Odamning normal somatik hujayralari 22 juft autosom va bir juft jinsiy xromosomalardan: ayollarda ikkita X – xromosomalar va erkaklarda bir nusxadan jinsiy xromosomalardan (X va Y) iborat.

Tibbiy sitogenetika odam patologiyasi bilan xromosomalarning o'zgarish bog'liqligini tekshiradi. Odam sitogenetikasi rivojlanayotgan zamonaviy genetikaning bir sohasidir.

Xromosoma anomaliyalari diagnostikasi turli mutaxassisdagi shifokorlar (genetik, akusher – ginekolog, pediatr, onkolog, gematolog, nevropatolog, endokrinolog va boshq) amaliyotida juda muhim. Hamma rivojlangan davlatlarning ko'p tarmoqli zamonaviy shifoxonalarida sitogenetik laboratoriyalar mavjud.

Klinik amaliyotda sitogenetik usulni qo'llashning ahamiyati:

- Indivudning jinsiy mosligini fenotipik belgilarida bahsli holatlarda yechim topishda;

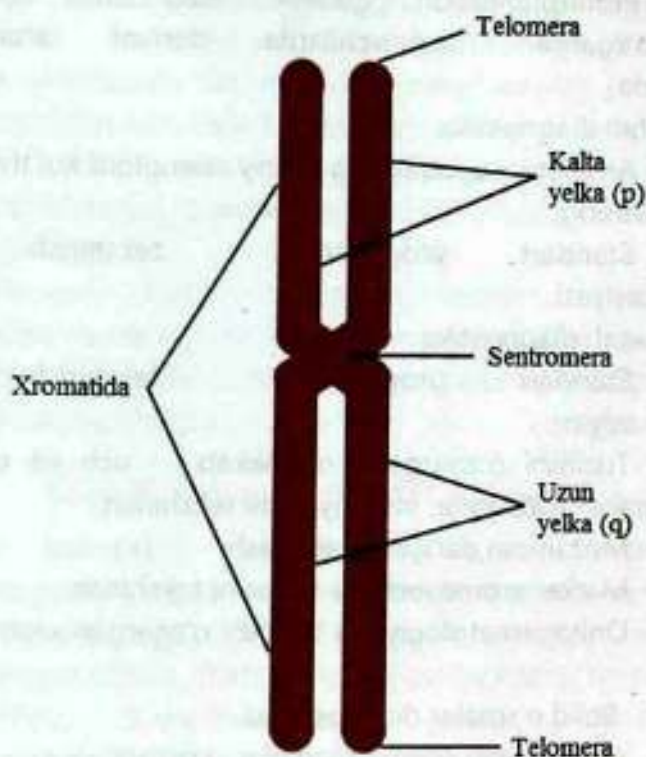
- Kariotipda xromosomal va genomli o'zgarishlarni aniqlash;
- Xromosomalarning tuzilishidagi o'zgarishlarni kelib chiqishini aniqlash va ularni to'g'ri tasniflash;
- Butun xromosomalardagi yoki uning qismlaridagi disbalans oqibatida kelib chiqqan sindromlarni aniqlash;
- Onkologik kasalliklar rivojlanishida o'sma hujayralaridagi xromosomalarning markerli o'zgarishini aniqlash;
- O'sma hujayralaridagi markerli sitogenetik o'zgarishlarni saqlanish darajasiga asoslanib, o'smaga qarshi terapiya samaradorligini nazorat qilish;
- Irsiy onkologik kasalliklar bor bemorlarda xromosomalar o'zgarishi haqidagi ma'lumotlarni yig'ish;

Zamonaviy shifokor bemordagi xromosoma patologiyasi diagnostikasiga bilimli yondashib, nafaqat sitogenetikaning nazariy asoslarini, balki u yoki bu xromosoma buzilishlari bilan bog'liq klinik ahamiyatini, xromosoma tahlillarining zamonaviy usullarini, xromosoma patologiyasini oldini olish usullarini va zamonaviy tibbiyot ilmi va amaliyotida sitogenetikaning ahamiyatini ham bilishi lozim. Bu ijtimoiy ahamiyatga ega bo'lgan kasalliklarni diagnostika va davolash muamollarini, nafaqat kasallik tasnifi va etiologiyasi, balki davolash samaradorligini zamonaviy darajada nazorat qilishga yordam beradi. Sitogenetik usullarni oila qurishda va prenatal diagnostikada qo'llash xromosoma patologiyasi bilan bog'liq tug'ma kasalliklarni va sindromlarni chastotasini pasayishiga va populyasiyada genetik patologiyaning kamayishiga sabab bo'ladi.

Tibbiy texnologiya tavsifi.

Sitogenetik tekshirishlar quyidagi asosiy bosqichlardan iborat:

1. Periferik qondagi limfositlardan tayyorlangan metafazadagi xromosomalar namunalari. Sitogenetik tekshirishlar maqsadidan kelib chiqqan holda uning ob'ekti sifatida quyidagilardan foydalanish mumkin.....
2. Namunalarni bo'yash.
3. Mikroskopik va natijalarni statistik tahlili.



72- rasm Xromosomaning sxematik surati va qismlarining nomlanishi.

12.2. Molekulyar-sitogenetik usul. (Fluoressént gibrizásiya in situ–FISH).

Fluoressént gibrizásiya in situ, yoki FISH usuli – sitogenetik usul bo'lib, deteksiyani va metafazali xromosomalardagi DNKdagi maxsus o'zgargan sohani aniqlash uchun qo'llaniladi yoki interfazali yadrolarda in situ maxsus fluoressent zondlardan foydalaniladi.

FISH usuli preimplantasion, prenatal' va postnatal' genetik diagnostikada, onkologik kasalliklar diagnostikasida, retrospektiv biologik dozimetriyada ishlatiladi.

Preimplantasion genetik diagnostika

- Preimplantasion genetik skrining (13,15,16,17, 18,21,22,X,Y aneuploidiy xromosomlarni aniqlashda)

- Preimplantasion genetik diagnostika (xromosoma tuzilishi o'zgargan tashuvchilarda derivat xromosomlarni tekshirishlarda)

Prenatal' diagnostika

- Amniotik suyuqlikning asosiy aneuploid kul'tivirlanmagan hujayralar skriningi.

- Standart sitogenetik tekshirish natijalari tahlili/verifikasiyasi.

Postnatal diagnostika

- Standart sitogenetik tekshirish natijalari tahlili/verifikasiyasi.

- Tuzilishi o'zgargan murakkab - uch va undan ortiq murakkab translokatsiyalar, insersiyalarni tekshirish.

- Mozaisizm darajasini aniqlash.

- Marker xromosomalar tabiatini tekshirish.

- Onkogematologiyada tuzilishi o'zgargan xromosomalarni tekshirish.

- Solid o'smalar diagnostikasi.

- Aneuploidiy spermatozoidlar skriningi.

- Murakkab xromosoma buzilishiga jalb bo'lgan xromosomalar identifikasiyasi.

- Anomal' xromosomalar buzilish nuqtasini aniqlash.

- Bemorda kichik foizlarda anomal' hujayralar bo'lganda murakkab xromosomalar mozaisizmini aniqlash.

Tibbiy texnologiyalar tavsifi.

Birinchi bosqichda zondlarning konstruirovasiyasi yuz beradi. Gibrizasiya maxsus saytda yuz berishi uchun zond o'lchami keragicha katta bo'lishi kerak, gibrizasiya jarayoniga xalaqit bermasligi uchun uning o'lchami (1 ming p.o. gacha) bo'lishi maqsadga muvofiqdir. Maxsus lokallar aniqlanganda yoki butun xromosomalar bo'alganda, DNK namunalarni noyob takrorlanuvchi DNK ketma-ketligi bilan gibrizlanish aralashmasiga etiketlanmagan DNK takrorlanishini qo'shib blokirovka qilishi kerak. Agar DNK-zond ikki zanjirli DNK bo'lsa, gibrizasiyadan oldin uni denaturatsiyalash lozim.

Keyingi bosqichda yadrolar interfazasi yoki xromosomalar metafaza preparatlari tayyorlanadi. Hujayralar buyum oynasiga

substratlarda fiksasiyalanadi, so'ngra DNK denaturatsiyalanadi. Xromosomalar morfologiyasi yoki yadrolar denaturatsiyasini formamida yordamida saqlanadi, bu denaturatsiya haroratini 70 °C gacha pasayishiga olib keladi. Keyin preparatlarga zondlar qo'shiladi va 12 soat davomida gibridizasiyalanadi. So'ngra gibridizasiyalanmagan zondlardan xalos bo'lish uchun bir necha marotaba yuviladi.

Bog'langan DNK – zondlarni ko'rish uchun fluoressent mikroskopdan foydalaniladi. Fluoressent signal intensivligi ko'pgina omillarga bog'liq - zond etiketka samaradorligiga, zond turiga va fluoressent bo'yog'i turiga.

12.3. Molekulyar genetik tadqiqotlar.

Reaktivlar, fermentlar, biologik mahsulotlar, uskunalar. Ishda quyidagi reagentlar, fermentlar va biologik mahsulotlar qo'llaniladi: akrilamid, bis-akrilamid, EDTA, 5% gliserin eritmasi, proteinaza K («Sigma» firmasi AQSh), TEMED, dodesilsul'fat natriy, trisHCl («Serva», firmasi FRG), 2-merkaptotanol («Ferax», firmasi FRG), dezoksinukleotidtrifosfatlar, didezoksinukleotidtrifosfalar, triton X100, magniy xlorid, natriy xlorid, ammoniy sul'fat, ammoniy persul'fat, restriksiya fermentlari: BstU1 («Sibenzim»), termostabil DNK-polimeraza *Thermus aquaticus* (NPO «Bioteks»), amplifikatsiya uchun uskuna "AppliedBiosystems" firmasi (SShA), oligonukleotid praymerlari (NPO «Sibenzim», Novosibirsk sh.).

12.3.1. Genom DNKni periferik qon limfositlaridan ajratib olish.

Limfositlar yadrosini va keyinchalik DNKni ajratib olish Sambrook J., 1989 yildagi usulga muvofiq, ba'zi o'zgarishlar bilan amalga oshirilgan. 10 ml periferik qonga 3 ml glyugisir tikoagulyant, 20 g ikki o'rnini to'ldiruvchi Na gidrositrat va 1 lga 30 g glyukoza) o'shilgan.

Sitratlangan qon teng miqdordagi bufer (4 ° C) bilan aralashtirilgan, tarkibi: 0,32 M saxaroza; 5mM MgCl₂; 1% Triton X-100; 0,01M TrisHCl pH 7,5. 4 ° Cda 3000 ob/minga sentrifugalangan. Yadro cho'kmasini 400 mkl proteinaza K uchun bufer bilan qayta suspenziya qilindi, tarkibi quyidacha: 10mM TrisHCl, pH 10.5; 0,5M NaCl; 1mM

EDTA. SDS («Serva»,FRG) 0,5% yakuniy konsentratsiyasigacha qo'shilib, Proteinaza K («Serva», FRG yoki «Sigma», AQSh) ishtirokida 37oS da 16 soat davomida 250 mkg / ml konsentratsiyada inkubasiya qilinadi. 400 mkl fenol qo'shiladi (Sambrook et al., 1989), 10 daqiqa davomid etiyotlik bilan aralashtiriladi va 5000 aylanada 5 daqiqa davomida sentrifuga qilinadi. Keyin yuqori faza boshqa naychaga o'tkaziladi, 400 mkl fenol: xloroform aralashmasi (1: 1) qo'shiladi. 5 daqiqa davomida aralashtiriladi, so'ngra sentrifuga qilinadi. Fenol teng hajmli xloroform bilan yuqori suvli fazadan chiqariladi. 40 mkl 3M natriy asetat va 800 mkl sovutilgan 96% etanol DNK eritmasiga ketma-ketqo'shiladi. Aralashtiriladi va 14000 aylanada 15 daqiqa davomida sentrifugalanadi, 1 ml 70% etanol eritmasida cho'kindi suvi yuviladi. Qayta sentrifuga qilinadi, cho'kma quritiladi va DNK TE buferida (10 mM TrisHCl pH 7.4; 1mM EDTA pH 8.0) xona haroratida 12 soat davomida eritiladi. DNK konsentratsiyasi TEga qarshi optik zichlikni 260 nm va 280 nm o'lchash orqali aniqlanadi. OD260/OD280 nisbati 1,8 ga teng bo'lishi kerak. 1 mg / ml genom DNK eritmasi 20 p.u. ga teng. DNK TEda -20 ° C da saqlanadi.

12.3.2. Polimeraza zanjirli reaksiyasini o'tkazish (PZR).

25 mkl aralashmaga 250 ng genom DNK namunasi qo'shiladi, aralashma 200Sda 0,67mM tris-NSI (Serva, FRG) rN 8,8, 16,6mM ammoniy sul'fat (Serva, FRG); 6,7mM MgCl₂ (Serva, FRG); 6,7mM EDTA (Serva, FRG); 10mM 2-merkaptotanol (Ferax, FRG), 170mkg BSA (Sigma, USA), har biri 0,8 mM konsentratsiyada eng asosiy to'rtta dNTP aralashmasi, termostabil DNK polimerazasi 0,2 bir / mkl va har bir oligopraymerning 0,001 optik birligini o'z ichiga oladi.

Tadqiqot texnologiyasi polimeraza zanjirli reaksiyasi (PZR) yordamida, o'zgaruvchan genetik markerlarni amlifikasiya qilishga asoslangan. Polimeraza zanjirli reaksiya tahlil qilish uchun zarur bo'lgan har qanday DNK ketma-ketligini ajratib olish va ko'paytirish imkonini beradi, bu asl nusxadan o'nlab yoki hatto yuzlab million marta ko'pdir. Bunday yuqori darajali nazariy jihatdan yagona DNK molekulalari bilan ishlashga imkon beradi, shuning uchun tekshirish uchun mavjud bo'lgan juda oz miqdordagi biologik material yo'qolgan taqdirda ham, molekulyar genetik tiplash

imkoniyati ochiladi. Bundan tashqari, PZR yuqori darajada buzilgan, degradasiyaga uchragan DNKni tahlil qilishda juda samarali.

DNKda bu kabi xususiyatlarning polinukleotid zanjirlarini ajratish qobiliyati va azot asoslarini komplementar bir-biriga bog'lashni prinsipi mavjudligi har bir DNK zanjiri komplementar ikkinchi zanjirni qurish uchun matrisa bo'lib xizmat qilishi mumkinligini anglatadi, ya'ni DNKdagi asoslar ketma-ketligini ko'paytirish uchun zarur bo'lgan ma'lumotlar uning juft spiral shaklida joylashtirilgan. Natijada ikkita molekula hosil bo'lganda, bitta zanjir asl ota-ona zanjiridan, ikkinchisi esa uning asosida sintez qilinadigan DNK sintez mexanizmiga yarim konservativ deyiladi.

Yarim konservativ sintez murakkab fermentativ jarayondir. Yangi zanjir sintezi uchun javob beradigan asosiy ferment DNK polimerazadir. Ushbu ferment DNK zanjirini uzaytirish xususiyatiga ega, ketma-ket bitta nukleotidni 3'-uchiga bog'lab (6-rasm), 5'-3' yo'alishda sintez qiladi. DNK polimerazasi mustaqil xolda bitta zarjirli DNKda sintez qila olmaydi; buning uchun ikki zarjirli DNKning ozgina qismi kerak. Uni yaratish va sintezni boshlash uchun DNK matrisasiga DNK-zatravka yoki praymer deb nomlangan bitta zarjirli DNKning qisqa bo'lagi (taxminan 20 b.p.) qo'shiladi. DNK-zatravkasining nukleotidlar ketma-ketligi DNK- matrisasining ma'lum bir qismiga komplementar bo'lishi kerak. DNK sintezining boshlang'ich sababchilari va reaksiya uchun energiya manbai bu reaksiya davomida ikkita oxirgi fosfat guruhini yo'qotadigan nukleozidtrifosfatlar (dNTP) hisoblanadi. Zanjirga qo'shiladigan nukleotidni tanlash asoslarni komplementar bir-birini to'ldirishi asosida aniqlanadi. 1985 yilda yarim konservativ DNK sintezi asosida Myullis berilgan DNK ketma-ketligini sintez qilishning universal usulini kashf qildi, bu polimeraza zarjirli reaksiyasi usuli deb nomlandi (PRZ – Polimeraza zarjirli reaksiya). PZR - bu DNK polimeraza ishtirokida amalga oshiriladigan siklik jarayon va mavjud DNK ketma-ketligini amplifikatsiyasi (nusxalash)ni ta'minlaydi. Reaksiya davomida bu ketmaketlik eksponent bo'yicha yig'iladi va reaksiya oxiriga kelib ularning soni millionlab nusxada o'lchanadi. Amplifikatsiyalangan DNK qismining chegaralari o'rganilgan ketma-ketlikning 3'-uchiga komplementar bo'lgan ikkita praymer bilan aniqlanadi.

Amplifikasiya sikli uchta bosqichdan iborat: harorat o'zgarishi bilan kechadigan denaturatsiya, otjik va qurilish. Birinchi bosqichda yuqori harorat ta'sirida (taxminan 94-95 ° S) DNK yakka zanjirli molekulalar hosil qilish uchun denaturatsiya qilinadi. Ikkinchi bosqichda harorat pasayadi va DNK matrisa qismlariga komplementar bo'lgan praymerlar otjigi sodir bo'ladi.

Praymerlarni otjigi uchun zarur bo'lgan harorat praymer asoslarining tarkibiga bog'liq va odatda 50-70 ° S ni tashkil qiladi. Past haroratlarda, boshlang'ich matrisa DNKning renaturatsiyasi va o'ziga xos bo'lmagan reaksiya mahsulotlari paydo bo'lishi mumkin. Uchinchi davrda DNK polimeraza ishtirokida matrisaga komplementar bo'lgan zanjir sintezi yoki qurilishi sodir bo'ladi. Harorat odatda 70-75 ° S oralig'ida o'zgarib turadi. Natijada, sikl oxiriga kelib, ma'lum bir ketma-ketlikka ega bo'lgan DNK miqdori ikki baravar ko'payadi.

Keyingi sikllarda harorat fazalari takrorlanadi, shu bilan birga nafaqat asl DNK molekulalari, balki avvalgi sikllarda sintez qilingan zanjirlar DNKning matrisasi bo'lib xizmat qiladi. Nazariy jihatdan, 30-chi amplifikasiya siklining oxiriga kelib, bitta DNK molekulasida asosida 109 ta kerakli ketma-ketlik sintez qilinadi.

PZR usulining dastlabki bosqichlarida polimeraza sifatida E. Coli ning Klenov DNK polimeraza I bo'lari ishlatilgan. Ushbu ferment DNK denaturatsiyasi haroratida faol bo'lmaganligi sababli uni har bir siklga zanjirni qurilish bosqichida qo'shish kerak edi. Ushbu noqulaylik termostabil polimeraza (Taq polimeraza) 70-75 ° S haroratda issiq buloqlarda yashaydigan *Thermus aquaticus*, bakteriyalaridan ajratilganidan keyin bartaraf etildi. Ushbu polimerazani PZR vaqtida ishlatish amplifikasiya jarayonini avtomatlashtirishga imkon berdi, bu uning DNK tadqiqotida keng qo'llanilishini ta'minladi.

Tadqiqotning birinchi bosqichida DNK namunasining o'rganilayotgan polimorf ketma-ketligi polimeraza zanjirli reaksiya usuli yordamida amplifikasiya o'tkaziladi. Tadqiqot tashhis va individual test sinovlari uchun multipleks amplifikasiya tizimlari yordamida amalga oshiriladi. Sinov tizimi to'plamiga reaksiya muxiti, o'ziga xos praymerlar, DNK polimeraza va ledder.

Tadqiqotning keyingi bosqichida PZR mahsulotlari denaturatsiyalanadi va elektroforezga uchraydi, natijada allel profil paydo bo'ladi - o'rganilayotgan DNK namunasining genotipi.

Polimeraza zanjirli reaksiyasining mahsulotlari avtomatlashtirilgan apparat-dasturiy kompleksli sekvenatorlarda tahlil qilinadi. Genom DNKning amplifikasiyalangan bo'laklarining o'lchamlari molekulyar og'irlikning tashqi standartlari yordamida komp'yuter interpretasiyasi, shuningdek, maxsus reaktivlar to'plamlaridan foydalanilgan holda aniqlanadi. Elektroforegrammani qayta ishlash natijasida maxsus komp'yuter dasturi yordamida har bir allelning grafik tasviri olinadi (allel – bu genning mumkin bo'lgan alternativ holatlaridan biridir). O'nbeshta lokuslar oralig'ida har bir ob'ekt uchun bu allel raqamlarning maxsus to'plami raqamli jadval shaklida keltiriladi. Gomozigot namunasini o'rganish holatida bitta raqam ko'riladi geterozigot namunasida esa ikkita.

PZR bo'laklarini gidrolizi. Amplifikasiyalanga DNK bo'laklarini gidroliz qilish ishlab chiqaruvchilarning tavsiyalariga muvofiq amalga oshiriladi. PZR mahsulotlari 5 mkl amplifikat, 8,5 mkl suv, 1,5 mkl 10 baravar buferni (ishlab chiqaruvchi tomonidan har bir restriktaza uchun tavsiya etilgan) va 5-10 bir. (0.25-1.0 mkl) restriktazalardan tarkib topgan 15 mkl reaksiyon aralashmani 16 soat davomida 37*S haroratda endonukleaza restriktazalari bilan gidrolizlanadi (2.5-jadval). Gidrolizning to'liqligini PAAG yoki agaroz gelida elektroforez natijalari bilan baholanadi. 12.3.3 PAAG-da elektroforez va natijalarni vizualizasiya qilish.

DNK elektroforez - bu DNK bo'laklarini o'lchamlari (uzunligi) bo'yicha ajratish uchun ishlatiladigan analitik usul. Namunalarga qo'llaniladigan elektr maydon kuchlari DNK bo'laklarini gel orqali harakatlanishiga olib keladi. DNK molekulalarining saxarofosfat qoldiqlari manfiy zaryadlangan va shuning uchun DNK zanjirlari manfiy zaryadlangan katoddan musbat anodga harakatlanadi. Uzunroq molekulalar sekinroq harakatlanadi, chunki ular gelda qoladi, qisqa molekulalar tezroq harakat qiladi.

Elektroforezda DNK uchun agaroz (nisbatan uzunroq DNK molekulalari uchun) va poliakrilamid (qisqa DNK molekulalarining yuqori aniqligi uchun, masalan, sekvenirovaniya) gellardan foydalaniladi. Bo'linishdan keyin (ba'zida bo'yoq eritilgan agarozaga kiritiladi) turli xil uzunlikdagi DNK bo'laklari DNK bilan maxsus o'zaro ta'sir qiladigan flyuoesent bo'yoqlar yordamida tasvirlanadi, masalan, agaroz qellari odatda dupleksning azotli asoslari va UB

nurlarida flyuoresentlanadigan etidiy bromid bilan bo'yaladi. O'lchamlari ma'lum uzunlikdagi chizikli DNK bo'laklarini o'z ichiga olgan ishlab chiqarilgan markerlar yordamida (DNA ladder, "chiziq") taqqoslash usuli orqali aniqlanadi.

Belgilangan marker chizig'ining joylashgan joyiga va noma'lum o'lchamdagi DNK bo'lagining chizig'iga qarab uning uzunligi belgilanadi. Hozirgi vaqtda o'rganilayotgan DNKni fraksiyalash va sekvens o'tkazish uchun avtomatlashtirilgan apparat-dasturiy komplekslardan-sekvenator va reaktivlar to'plamidan foydalangan holda poliakrilamid gelda elektroforez (qisqartirilgan PAAG-da elektroforez; angl. PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis) qo'llaniladi.

Zamonaviy sekvenatorlarni elektroforez turiga ko'ra kapillyarlilarga va bo'linishi gel plastinkalarida yuz beradiganlarga qarab ajratish mumkin. Oxirgisi deteksiya qiladigan bo'yoqlar soniga qarab ham farq qilishi mumkin: bitta, ikkita, to'rt yoki beshta. Poliakrilamid gel elektroforezi jarayonida lazer nuri ma'lum bir joyda bo'yoq fluoressentni qo'zg'atadi, va detektor hozirgi vaqtda gel orqali qaysi nukleotid yoki fragmentni xarakterlanayotganini aniqlaydi. Kapillyarli elektroforezni amalga oshirishdan oldin, DNKning spesifik bo'limlari to'rt yoki besh xil fluoressent bo'yoqlari bilan nishonlaydi va PZRni polilokus shaklida amalga oshiriladi. Amplifikat va restriksiya mahsulotlari vertical elektroforez apparatida Tris-borate buferida (TBE) tayyorlangan 7,5% denaturativ bo'lmagan poliakrilamid gelida ajratiladi.

Akrilamidning 30% eritmasini olish uchun 29 g akrilamid 1 g N,N-metilenbis-akrilamid bilan aralashtiriladi va aralashma 100 ml distillangan suvda eritiladi. 10 karra TBE eritmasi 0,5 g distillangan suvda 54 g Tris, 27,5 g bor kislotasi va 20 ml 0,5 m EDTA rN8.0 eritib tayyorlanadi. Tayyorlash uchun 20 ml 7,5% poliakrilamid geli, 5 ml 30% akrilamid, 2 ml 10 karra TBE, 13 ml distillangan suv, 200 mkl 10% ammoniy persulfat eritmasi va 25 mkl tetrametiletildiamin aralashtiriladi. Tayyorlashdan oldin eritma yaxshilab aralashtiriladi. Namunalarni ko'radigan buferda 0,25% bromofenol ko'k, 0,25% silensianol va 15% fikol mavjud. Namunalarlar gelga kirmasidan oldin va lunkalardan taxminan 1 sm masofani bosib o'tgunga qadar 120 V kuchlanishli elektr maydonida 1 baravar TBEda elektroforez amalga

oshiriladi. Shundan so'ng, kuchlanish 180-200 V ga ko'tariladi. Belgilangan (bromfenol) gelni tark etishdan oldin 3-7 sm qolganda elektroforetik ajratish to'xtatiladi. Gel ultrabinafsha nurida ko'riladigan etidiy bromidining (0,5 mkg / ml) suvli eritmasi bilan elektroforez moslamasida bo'yaladi «UVT-1» («Biocom», Rossiya).

Agaroza gelida elektroforez va natijalarni vizualizatsiya qilish. Amplifikasiyalangan o'ziga xos DNK qismlari etidiy bromid ishtirokida tris-borat buferida (TBE) tayyorlangan agaroza gelida elektroforez usuli yordamida gorizontel elektroforez apparatida amalga oshiriladi («DNKtexnologiya» Rossiya). Etidium bromid to'lqin uzunligi 290-330 nm bo'lgan UB nurlari bilan gel nurlanganda DNK qismlari bilan barqaror birikmasini hosil qilib, yonuvchi chiziqlar ko'rinishida namoyon bo'ladi. PZR natijasida paydo bo'lgan amplikonlarning hajmiga qarab, tarkibi 1,5% dan

3,0% gacha bo'lgan agaroza geli ishlatiladi. Agaroza gelini tayyorlash uchun agaroza aralashmasini mikroto'lqinli pechda yoki suv hammomida eritiladi, bufer va suvni (agaroza to'liq erimaguncha), etidiy bromid eritmasini qo'shiladi. 50-60 ° S gacha sovutilgan aralashmani 4-6 mm qalinlikda qolipga quyiladi va namunani qo'llash uchun maxsus taroq yordamida cho'ntaklar tayyorlanadi. Taroqlar cho'ntaklarning pastki qismi va gelning tagligi o'rtasida 0,5-1 mm gacha bo'lgan agaroza qatlami qoladigan tarzda o'rnatiladi. Gel qattiqlashgandan so'ng, taroqlar ehtiyotkorlik bilan chiqariladi. Shakl bilan birga gel elektroforez buferi bilan to'ldirilgan elektroforez apparati ichiga joylashtiriladi. Bufer gelni taxminan 1-2mm bilan qoplashi kerak. Gel qotib qolganidan keyin amplifikat 5-15 mkl miqdorida cho'ntaklarga quyiladi. Nazorat va tajriba namunalariga parallel ravishda 5 mkl miqdorida DNK parchalari uzunligi markerlarini aralashmasi qo'shiladi. Bunday namunani o'tkazish nazorat va tajriba namunalarida amplikon uzunligini tekshirish imkonini beradi.

Namunalar kiritilgan gel bufer bilan to'ldirilgan gorizontel elektroforez jixoziga o'tkaziladi. Kamera quvvat manbaiga ulangan va kuchaytiruvchi mahsulotlarni elektroforetik ajratish 30-45 minut davomida 100-200 kuchlanishli elektr maydonida amalga oshiriladi V (15 V/smdan ko'p bo'lmagan). Shunga ko'ra DNK ijobiy elektrodga o'tadi. Reaksiya aralashmasining bir qismi bo'lgan bo'yoqning old qismi kamida 3 sm dan o'tishi kerak.

Elektroforez yakunlangandan so'ng gel transillyuminatorning oynasiga o'tkaziladi va ultrabinafsha nurida ko'rib chiqiladi. Natijani hujjatlashtirish uchun gel komp'yuterga ulangan video tizim yordamida yozib olinadi.

12.3.4. Sikvens tahlilini o'tkazish.

Nukleotidlar ketma-ketligini polimorfizmini o'rganish texnologiyasining yana bir varianti o'rganilayotgan ketma-ketlikni sekvens o'tkazish usuli yordamida to'g'ridan-to'g'ri aniqlashdir. Sekvens o'tkazish usuli odatda yadro va mitoxondrial DNKning polimorfik qismlarini o'rganish uchun qo'llaniladi, ular bitta odamning hujayralarida yagona ketma-ketlik shaklida mavjud.

Tadqiqotning birinchi bosqichida tahlil qilinayotgan DNK namunasining polimorf qismi polimeraza zanjirli reaksiyasi usuli yordamida amalga oshiriladi. Shundan so'ng, PZR mahsulotlari denaturlanadi va matrisa sifatida bitta zanjirli DNK yordamida ikkinchi DNK zanjirini sintezining to'rtta varianti amalga oshiriladi.

Variantlarning har birida zanjir sintezi uchun zarur bo'lgan barcha tarkibiy qismlar reaksiya aralashmaga, shuningdek to'rtta turidan biri bo'lgan 2',3'-didezoksinukleozid trifosfatlar kiritiladi.

Didezoksinukleotid o'sayotgan zanjirga kiritilganda, uning sintezi to'xtatiladi. To'xtatuvchi nukleotidni kiritish ehtimoli katta bo'lganligi sababli, ushbu reaksiyalar natijasida hajmi bir nukleotid bilan ajralib turadigan bir qator bo'laklar hosil bo'ladi.

Sikvens qilishning oxirgi bosqichida sintez mahsulotlari elektroforezga o'tkaziladi. Ma'lum bir o'lchamdagi bo'laklarga to'g'ri keladigan chiziqlar faqat to'rtta yo'lning bittasida ko'rinadi. Bu ushbu holatda DNK zanjirida joylashgan nukleotidni aniqlash imkonini beradi. Bir tasmadan boshqasiga (kattaroq) o'tishda, nukleotidlarning butun ketma-ketligini "o'qishingiz" mumkin.

Tadqiqotning ishonchligini oshirish uchun boshlang'ich DNKning har ikkala zanjirini mustaqil tahlil qilish mumkin. Keyinchalik sekvens natijalari birlashtirilib, komplementarlik mavjud bo'lmagan va xatolar bo'lishi mumkin bo'lgan barcha joylar aniqlanadi. Ushbu joylarning nukleotidlar ketma-ketligi qo'shimcha tadqiqotlar yordamida aniqlanadi.

Ifloslanishning uchta asosiy mumkin bo'lgan manbalari mavjud:

1. Genom DNK bilan ifloslangan uskunalar va ish muhiti.
2. DNKni ajratish yoki PZRni qo'yish paytida namunalarning o'zaro ifloslanishi.
3. Oldingi tadqiqotlardagi PZR mahsulotlari.

Ifloslanishni oldini olish uchun, ekspert laboratoriyalarida qabul qilingan biologik ob'ektlar bilan ishlashning umumiy qoidalariga qo'shimcha ravishda (ob'ekt bilan ishlashdan oldin va keyin etil spirti bilan asboblarni artib olish; bir martali ishlatiladigan steril naychalarni, pipetkalar uchlarini ishlatish; har bir ob'ektdan keyin uchini o'zgartirish va hokazo), ifloslanishga qarshi qo'shimcha maxsus tadbirlarni o'tkazish.

Laboratoriya maydoni uchta katta ishchi hududlarga bo'linishi kerak: tekshiriladigan ob'ektlar bilan ishlash va DNKni ekstraksiya qilish hududi, PZR o'tkazish hududi (toza hudud), amplifikasiyalangan DNK bilan ishlash hududi va bo'laklarni tahlil qilish va sekvens o'tkazish hududi zonasi. Har bir xonada PZR mahsulotlarini amplifikasiya reaksiyasidan oldin ish maydoniga kirishiga yo'l qo'ymaslik uchun alohida chiqish joyi bo'lishi kerak. Ushbu hududlarning har birida tegishli hudud vazifalarini bajarish uchun zarur bo'lgan to'liq jihoz va asboblarga ega bo'lishi kerak.

Tadqiqot ob'ektlari bilan ishlash hududi faqat tadqiqot ob'ektlari bilan ishlash uchun mo'ljallangan (tekshirish, tadqiqot uchun material tayyorlash). Ushbu hududda quyidagilar kerak:

- obyektlarini o'zaro ifloslanishiga yo'l qo'ymaslik uchun qo'lqoplarni doimiy ravishda almashtiring. Ularni ifloslangan hollarda va hududdan chiqqanda tashlab yuboring;
- har bir ob'ekt uchun toza vositalar va toza ish yuzasini ishlating;
- DNK - potensial ifloslanish manbalari paydo bo'lishining oldini olish uchun katta miqdordagi materialni iste'mol qilishdan saqlaning.

DNK ajratish hududi. DNK ni ajratish, kerakli reaktivlarni tayyorlash va ajratilgan DNKni saqlashga mo'ljallangan bo'ladi. Bu hududda quyidagilar lozim:

- ob'ektlarni o'zaro ifloslanishini oldini olish maqsadida DNKni ajratish o'z ichida katta miqdorda DNK saqlovchi ob'ektlardan (masalan, butun qon), va kichik miqdorda DNK saqlovchi ob'ektlardan (kichik hajmli

qon izlari, yagona soch tolalari va h. k.) alohida-alohidan amalga oshiriladi;

- ko'p miqdordagi ob'ektlarni bir vaqtda DNKsini ajratmaslik;
- ob'ektlarini o'zaro ifloslanishini oldini olish maqsadida muntazam ravishda qo'lqoplarni o'zgartirish; agar qo'lqoplarga DNK tekkan bo'lsa, shuningdek hududdan chiqishdan oldin qo'lqoplarni yechish;
- krossinker qurilmasida ultrabinafsha nurlari ostida sterilizasiya qilish, avtoklavga uchraydigan eritmalar (lisis qiluvchi eritma, EDTA, NaCl, SDS, tris-HCl, deioniz suv);
- reagentlarni alikvotlarga ajratib saqlash. Butun eritmani ifloslanishini oldini olish maqsadida, faqat bir alikvot bilan ishlash;
- sachrab ketishni oldini olish. Ba'zi turdagi probirkalarni qopqoqlari ochilishi qiyin bo'lganligi sababli ularni ochish vaqtida sachrab ketishi mumkin. Probirkalarni qopqoqlarini ochishdan oldin sentrifuga yordamida devorlaridagi suyuqlikni cho'ktirish. Qopqoqlarni ochish qurilmasidan foydalanish; reaktivlarni ifloslanishini aniqlash maqsadida har bir ajratiladigan DNK ob'ekt uchun nazorat DNK ni qo'yish, (reagentga o'rganilayotgan ob'ektni qo'shmasdan);
- faqat DNK ajratish hududiga mo'ljallangan laborator xalatlardan foydalanish.

PZRga tayyorlash hududida faqat amplifikasiyali naychalarga PZR va DNK reagentlarini kiritish uchun mo'ljallangan. Quyidagilar bo'lishi kerak: ushbu hududda

- avtomatik pipetkalar uchun filtrli bir martalik uchliklardan foydalanish;
- qo'lqop va toza xalat bilan ishlash. Agar DNK tegkan bo'lsa, qo'lqoplarni almashtirish;
- sinov naychalariga DNK namunalarini oxirida qo'yish;
- DNK qoldiqlarini uchidan «chiqarib yubormang» - bu boshqa DNK namunalarini ifloslantirishi mumkin bo'lgan aerazol hosil bo'lishiga olib keladi;
- yana bir DNK namunasini qo'shgandan keyin oldingi naychani qopqog'ini yopish;
- barcha naychalarga DNK qo'shib bo'lgandan so'ng naychalarini (DNKsiz reagentlar) yopish. salbiy nazorat

Amplifikasiyalangan DNK bilan ishlash hududi avvalgi hududlardan alohida bo'lishi kerak. Bu hudud PZR mahsulotlarini tahlil qilish bilan bog'liq bo'lgan barcha operatsiyalar va amplifikasiyalar uchun mo'ljallangan. Ushbu hududda quyidagilar kerak:

- qo'iqop bilan ishlash; agar DNK ularga tekkan bo'lsa, shuningdek, hududdan chiqib ketganda ularni tashlab yuborish;
- naychalarni PZR mahsulotlari bilan ehtiyotkorlik bilan ochish, tarkibni sachrab ketishini oldini olish;
- amplifikatordan faqat PZR mahsulotlarini amplifikasiyalash va denaturatsiya qilish uchun foydalanish. Amplifikatorni DNKni inkubatsiya qilish uchun termostat sifatida ishlatmaslik;
- elektroforez yordamida amplifikasiyalanmagan DNKni baholash uchun ushbu hududga DNKning zaruriy alikotalarini kiritish;
- amplifikasiyalangan DNKni faqat shu hududda saqlash.

Ish maydonini va vositalarini tayyorlash.

Ish joyi va vositalarni *tayyorlashda* quyidagi qoidalarga rioya qilish kerak:

1. Kontaminatsiyani oldini olish maqsadida, barcha muolajalar PZR kamerasida yoki laminar-javonda amalga oshirilishi kerak.
 2. Laboratoriya yuzalari, DNK ajratish uchun foydalaniladigan barcha avtomatik pipetkalar va shtativlar, ishlatishdan oldin 7 mM NaOSida tozalanadi va yaxshilab quritiladi. PZR kamerasi (laminar javon) UB nurda (kamida 15 daqiqa, UB lampalardan 30-40 sm masofada) tozalanadi.
 3. Barcha vositalarni, qoshiq va tortish uchun idishlarni foydalanishdan oldin, 7 mM NaOSI, steril distillangan suv va 96% etanol bilan tozalanadi. Yaxshilab quritiladi.
 4. Kontaminatsiyani oldini olish maqsadida mikrosentrifuga naychalarini UB nurlarida (15 daqiqa UB lampalardan 30-40 sm uzoqdan), lizis buferi va TE buferini 50 ml naychalarini (30 daqiqa UB lampalardan 30-40 sm uzoqdan) zararsizlantiriladi.
- ESLATMA:* UB nurlatishdan oldin lizis buferiga proteinaza Kni qo'shish mumkin emas.
5. Sentricon 30 (100) konsentratlarini kontaminatsiyasini oldini olish maqsadida PSR kamerasida yoki laminarda to'planishi kerak.

6. Ekstraksiya uchun ishlatiladigan hech qanday reagentlar, ishlatiladigan materiallar yoki uskunalar amplikonlar bilan ishlaydigan xududdan chiqishi ham kirishi ham mumkin emas.

7. Har qanday asbob-uskunalar va vositalarni post-amplifikasion hududdan amplifikasiyadan oldingi hududga kiritishdan oldin, postamplifikasion va amplifikasiyadan oldingi hududdan chiqarishdan oldin 7 mM NaOS1da strelilizasiya qilib ishlatiladi

ESLATMA: reagentlar hech qachon post-amplifikasion hududdan amplifikasiyadan oldigi hududga kiritilishi mumkin emas.

8. Rezina qo'ldoplarni har bir yangi ekstraksiyada almashtirish kerak.

9. Bir vaqtning o'zida faqat bitta namunani zararsizlantirish.

DNKni ajratib olish usullari.

O'rganilayotgan biologik ob'ektlardan DNK izolasiyasi genotiposkop tekshirishning birinchi va eng muhim bosqichidir. DNKni tekshirishning keyingi barcha bosqichlarining muvaffaqiyati uning bajarilish sifatiga bog'liq. DNKni ekstraksiya qilish usulining noto'g'ri tanlanishi yoki noto'g'ri bajarilishi, ifloslangan DNK hosil bo'lishiga, tadqiqot uchun yaroqsiz bo'lgan DNK hosil bo'lishiga yoki DNK yo'qotilishiga olib kelishi mumkin. DNKni ajratib olish muolajasi DNK izolasiyasi uchun mo'ljallangan alohida maxsus javonlarda amalga oshirilishi kerak. Amplifikasiion DNK bilan manipulyasiyalar amalga oshiriladigan hududda DNKni ajratish taqiqlanadi.

GLOSSARIY

Avtoradiogramma — yupqa parda ustida (ya'ni plenkada) nishonlangan DNK fraksiyalarining joylashgan joylari nurlangan qismlar bo'lib ko'rinishi.

Aberratsiyalar (xromosom) – xromosomalar tuzilishini o'zgarishi (delesiya, duplikasiya, inversiya, translokatsiya).

Allellarning geterogenligi – bitta genning bir necha allellarini bo'lishi.

Amplifikasiya – DNK molekulasining bir qismini bir necha nusxasini hosil bo'lishi.

Aneuploidiya – xromosomalarning diploid to'plamini bir necha xromosomalarga o'zgarishi ($2n + 1, 2, 3$ va h.).

Antikodon – sintezlanayotgan oqsilda bitta aminokislotani joyini aniqlab beruvchi tRNKdagi nukleotidlar tripleti, mRNKdagi kodonga komplementar.

Antimutagenез – mutasiyalar hosil bo'lish jarayoniga qarshi jarayon.

Antisipasiya – har bir keyingi avlodda kasallik belgilarini erta kuzatilishi va og'irroq kechishi.

ATF-sintetaza – adenozintrifosfat kislotasinti smniezini frmenti.

Adenin, guanin, siozin, timin, urasil – nuklein kislotalarning azot asoslari.

Autosomalar – erkak va ayollarda o'xshash xromosomalar, masalan, odamda – 22 juft, ya'ni 44 autosoma.

Autosom-dominant nasllanish – autosomalarda joylashgan dominant gen orqali belgini nasllanishi.

Autosom-reessiv nasllanish – autosomalarda joylashgan reessiv gen orqali belgini nasllanishi. Bunday gen yuzaga chiqishi uchun ikkala ota-onadan nasllanishi kerak, ya'ni faqat gomozigota holatda yuzaga chiqadi.

Vektor (genetik) – irsiy informasiyani hujayraga o'tkazuvchi modda. Ko'pincha plazmida, transpozon va viruslar qo'llaniladi.

Vektor (klonlash uchun) – yot, begona DNKning plazmida, fag yoki hayvonning DNK tutuvchi virus tarkibiga kiritish.

Gameta – jinsiy hujayra.

Gaploid to'plam – xromosomalarning juft to'plamini yarmi (n).

Gaplotip – bitta xromosomada joylashgan ma'lum allellarning kombinatsiyasi.

Gemizigota – organizmining juft gomologik xromosomalardan bittasini yetishmovchiligi yoki nafaol holati. Masalan, erkaklarda jinsiy X-xromosomalardan faqat bittasi bor, shu sababdan erkaklar jinsiy X-xromosomalardan bo'yicha gemizigota deyiladi.

Gen – DNK molekulasini bir qismi bo'lib, bitta polipeptiddagi aminokislotalar tartibi to'g'risida ahborot saqlaydi.

Gen – regulyator – boshqa genlarning faoliyatini boshqaruvchi gen.

Gen – operator – operonning funksiyasini boshqaruvchi gen.

Gen ekspressiyasi – gen funksiyasini faollashishi.

Genetik marker – DNKning ma'lum polimorf qismi bo'lib, uning har xil allellari tuzilishi jihatidan har xil bo'lgan xromosomalarni aniqlashga imqoniyat yaratadi.

Genetik geterogenlik – har xil genotiplarni bir xil yoki juda o'xshash fenotip hosil qilish.

Genetik xavf – ma'lum bir irsiy kasallikning rivojlanish ehtimoli.

Genetik injeneriya (muhandislik) – hujayra yoki organizmdagi irsiy ahborotni ma'lum maqsadga muvofiq sun'iy yo'l bilan o'zgartirilishi.

Genetik izolyasiya (alohidalanish) – bitta populyasiyaga kiruvchi individlar o'rtasida erkin chatisha olmaslik.

Genetik kod – oqsil strukturasi to'g'risidagi irsiy ahborotni nuklein kislotalarda nukleotidlar tripletining ketma-ketligi shaklida saqlanishi.

Genetik xarita — xromosomada genlarning ketma- ketligi bo'yicha joylashishi.

Genetik yuk – populyasiyada genlarning mutatsiyalari tufayli salbiy ta'sirotlarining umumiy miqdori.

Genlarning birikish guruhi – bitta xromosomada joylashgan genlar bitta birish guruhini hosil qiladi. Birikish guruhlar soni xromosomalarning gaploid soni teng. Masalan, ayollarda – 23, erkaklarda – 24.

Genlar dreyfi – kichik populyasiyalarda mutant allellarga ega bo'lgan individlarning tez va tasodifiy o'zgarishi.

Genlar daktiloskopiyasi — genning DNK izchiligi va genlar spektriga binoan noma'lum shaxsni aniqlash usuli.

Genom – organizm hujayrasida joylashgan irsiy moddasidir, ya'ni xromosomalar gaploid to'plamidagi genlarning yig'indisi.

Genomika – genomning struktura va funksiyasining xarakteristikasi.

Genotip – organizmning barcha genlarini yig'indisi yoki bir juft allel genlarning yig'indisi.

Geterozigot organizm – allel genlari bitta belgini har xil fenotipini yuzaga chiqaradi, o'zaro chatishtirilganda belgilar ajraladi va har xil gametalar hosil qiladi.

Geteroplazmiya – hujayrada normal va mutant mitoxondrial DNK kuzatilishi.

Geteroxromatin – xromosomating genetik nafaol qismi bo'lib, bo'yalganda to'q rangda qo'rinadi, DNK molekulasini spirallashgan qismi.

Golandrik nasllanish – jinsiy Y-xromosomaga birikib nasllanish.

Gomozigot organizm – allel genlari bitta belgini bir xil ko'rinishini (fenotip) yuzaga keltiradi, o'zaro chatishtirilganda belgilar ajralmaydi va bir xil gametalar hosil qiladi.

Gomologik xromosomalar – tuzilishi jihatidan bir xil bo'lgan xromosomalar. Gomologik xromosomalar juft xromosomalar ham nomlanadi. Har bir tur hayvon yoki o'simlik organizmida xromosomalar soni juft bo'lib, diploid to'plam deb ataladi ($2n$).

Gomoplazmiya – hujayrada normal yoki mutant mitoxondrial DNKning kuzatilishi, ya'ni faqat bitta shakli

Gradient konsentratsiyasi — moddalar konsentratsiyasini farqi.

Deletsiya – xromosomaning ma'lum bir qismining tuo'ib qolishi. Xromosoma aberratsiyalarning bir shakli.

Denaturatsiya – oqsil yoki DNKning nativ shaklini yo'qotishi. DNK qo'sh zanjirli bir polipeptid zanjirli bo'lishi.

Dizigot egizaklar – ikkita otalangan tuxumdan rivojlangan avlodlar.

Diploid to'plam – xromosomalarning juft to'plami ($2n$).

Diminuitsiya – biror narsaning (masalan, xromosomani) qismining yo'qolishi

Disomiya – avlod kariotipda ota-ona xromosomalaridan faqat bittasini 2ta nusxada bo'lishi.

Diskordantlik – egizak organizmlarda ma'lum belgi bo'yicha farqlanishi.

Dismorfogenez – organ yoki uning qismining morfologik tuzilishini patologik o'zgarishi.

Disentrik – tuzilishi jihatidan anomal xromosoma bo'lib, ikkita sentromeraga ega.

DNK-zond. — radioaktiv nishonlangan maxsus nukleotidlar ketma-ketligidan tuzilgan kalta DNK molekulasini

DNK-polimeraza – DNK molekulasini ikki xissa ortishini ta'minlovchi ferment.

Domen – ma'lum funksiyaga ega bo'lgan aminokislotalar tartibining oqsildagi bir qismi.

Dominant belgilar – gomozigot organizmlarning mono-, di- va poliduragay chatishtirilganda 1-chi avlodda yuzaga chiqadigan belgilar, ya'ni gomozigota va geterozigota holatdagi organizmlarda yuzaga chiqadigan belgilar.

Duplikatsiya - xromosomaning bir qismini qayta taqrorlanishi.

Initsiatsiya – jarayonning boshlanishi.

Imprinting (gen, xromosoma, genom) - molekulyar-genetik jarayon bo'lib, bunda ota-ona genlarining allellari modifikatsiyaga (yoki markirlanishiga) uchraydi, natijada belgini yuzaga chiqishi monoallel ekspressiya tipda amalga oshadi.

Inbriding – yaqin qarindoshlar o'rtasidagi nikohlar.

Inversiya – xromosomaning bir qismi uzulib, 180° ga burilib so'ng yana o'z joyiga kelib birikilishiga aytiladi.

Ingibitor genlar – boshqa genlarning faoliyatini yuzaga chiqarmaydigan genlarga aytiladi.

Induktor — oqsil repressor bilan bog'lanib, operon yoki transkripton ishini to'xtatadigan modda.

Intron — eukariotlarning struktur genlarini genetik nafaol qismlari, ya'ni oqsil strukturasi to'g'risidagi irsiy ahborot saqlamaydigan i-RNKning qismi.

Kariotip – organizmga xos bo'lgan xromosomalarning diploid to'plami.

Klon – bitta organizmning (hujayra, bakteriya) avlodi.

Kodon – sintezlanayotgan oqsilda bitta aminokislota joyini aniqlovchi mRNKdagi nukleotidlar tripleti.

Kodominantlik – allel genlar ikkalasi ham dominant, lekin bir biri ustidan ustunlik qilmaydi, ammo ikkalasini genotipda bo'lishi belgini boshqa xilini yuzaga keltiradi. Masalan, gen IA - II-chi qon guruhini ifodalaydi, IB-III-chi, IA IB esa, IY-chi qon guruhini. Demak, IY-chi qon guruhini kelib chiqishi kodominantlik deb ataladigan genetik xodisaga asoslangan.

Komplementarlik – ikkita allel bo'lmagan va birikmagan genlar birgalikda bitta belgini yuzaga chiqarishda ishtiroq etadi.

Koferment – ikki komponentli fermentning oqsil emas qismi.

Krossingover – xromosomalarning gomologik qismlari bilan almashinishi. Meyoz bo'lishining 1-chi profazasida kuzatiladi.

Ko'p allellik - allel genlarning ikkitadan ortiq holatlarda bo'lishi. Bunday holatlar bir genning har xil darajada mutasiyaga uchraganligi oqibatida yuzaga keladi.

Konkordantlik - egizak organizmlarda ma'lum belgi bo'yicha

Kosmida — plazmida va λ fagdan tuzilgan sun'iy konstruksiya (tuzilma).

Lokus - genning xromosomada ma'lum joyda joylashishi.

Mezosomalar — prokariot hujayralarning plazmolemmasini ichiga botib kirgan qismlari bo'lib, organoidlar vazifasini bajaradi.

Molekulyar genetika – genetika fanining bir tarmog'i bo'lib, organizmning genomini struktura va funksional birligi bo'lmish - gen tuzilishi va funksiyasi o'rganadi. Organizm irsiyatining molekulyar asoslarini o'rganuvchi genetika faninig tarmog'i.

Mutagen – mutasiya hosil qiluvchi omil.

Mutatsiyalar – irsiy modda va tuzilmalarda (DNK, gen, xromosoma) strukturaviy o'zgarishlarni hosil bo'lishi:

- **genom mutatsiyalar** – xromosomalar sonini o'zgarishi (gaploidiya, geteroploidiya yoki aneuploidiya, poliploidiya);
- **xromosoma aberratsiyalari** – xromosoma strukturasini buzilishi (delesiya, duplikasiya, inversiya, translokatsiya);

gen mutasiyalari – gen tuzilishini o'zgarishi (nuqtali mutasiyalar, tranzisiya, transversiya, missens va nonsens mutasiyalar).

Muton - genning mutasiya qila oladigan qismi.

Nozern-blotting – DNK-zond yordamida duragaylashgan RNK molekulalarni aniqlash usuli.

Nukleosoma — xromatinning struktura birligi bo'lib, 8 molekul giston oqsillardan tuzilgan. Nukleosomalar DNK zanjiri bilan birikadi va nukleosoma zanjirini hosil qiladi.

Nukleoid —prokariotlarning genetik apparati.

Nukleotid – nuklein kislotalarning monomeri bo'lib, azot asosi, pentoza va fosfat kislotasini qoldig'idan tashkil topgan.

Oqsil-repressor — boshqaruvchi genning mahsuloti – oqsil bo'lib, operon ishini boshqaradi.

Oligonukleotid – kalta bir polipeptid zanjirli DNK yoki RNK (taxminan 16-30 nuklotidlardan tuzilgan).

Operon — oqsil biosintezining struktura birligi.

Panmiksiya – erkin chatishish.

Penetrantlik – genning yuzaga chiqish chastotasi.

Plazmidalar – xromosomalar tarkibidagi DNK molekulalaridan tashqari hujayra sitoplazmasida joylashgan DNK-zarrachalari. Prokariot va tuban eukariotlarda qo'shimcha xromosomalar deb ataladi.

Pleyotropiya – bir juft genning bir necha belgi bilan yuzaga chiqishi, ya'ni genning ko'p tomonlama ta'siri.

Poligen nasllanish — bitta belgini bir necha genlar (polimer genlar) orqali ifodalanishi.

Polimeriya – bir necha juft genlarning bitta belgini yuzaga chiqarishida ishtiroq etishi.

Poliploidiya – hujayra yoki organizmda xromosomalarning gaploid to'plamini bir necha marta ortishi ($2n+n$, $2n$, $3n$ va h).

Populyatsiya – bir turga mansub bo'lgan, ma'lum muhit sharoitiga moslashgan va nisbatan boshqa populyasiyalarning individlaridan farqlanuvchi individlar yig'indisiga aytiladi.

Praymerlarning duragaylari — polimeraza zanjirli reaksiyaning ikkinchi etapi bo'lib, DNK zanjirlari praymerlar bilan duragaylar hosil qilishi.

Prokariotlar – yadrosi shakllanmagan hujayralardan tuzilgan organizmlar (bakteriyalar, ko'k-yashil suv o'tlari- sianobakteriyalar).

Promotor – transkripsiya jarayonida boshqaruvchi genning RNK-polimeraza bilan bog'lanuvchi qismi.

Proteom – genom kodlaydigan barcha oqsillarning yig'indisi.

Protoonkogen – normal gen bo'lib, hujayraning bo'linishi va proliferatsiyalarida ishtiroq etadi, lekin mutasiya tufayli onkogenga aylanib qolishi mumkin.

Processing (RNK) – iRNKdan intronlarni olib tashlab mRNKga aylanish jarayoni.

Rekon – genning rekombinasiya qila oladigan eng kichik qismi.

Rekombinant DNK – har xil organizmlardan DNK qismlari olinadi va sun'iy usulda ularni qo'shib, bitta DNK molekulasini sintezlanadi.

Rekombinatsiya – krossingover tufayli allel genlarning yangi kombinatsiyalarini hosil qilish jarayoni.

Reparatsiya – DNK molekulasidagi shikastlangan joylarini qayta tiklash.

Restriktaza – DNK molekulasini ikkala zanjirini ajratib, ayrim qismlarga bo'ladigan ferment.

Restriksiya saytlari — restriktazalar tomonidan aniqlovchi nuklein kislotalarning maxsus joylari-saytlari. Har bir fermentning o'ziga xos joylari – saytlari bo'ladi.

«Yopishqoq uchlar» — nuklein kislotalarning fragmentlarini boshqa qismlariga birikish xususiyatiga ega bo'lgan molekula qismlari.

Retroviruslar – RNK-tutuvchi viruslar bo'lib, ko'payishi teskari transkriptaza yordamida RNKdan DNKning hosil bo'lishi.

Retrotranspozon – mRNK matrisa asosida o'z nusxasini sintezlab boshqa joyga ko'chib o'tadigan DNK molekulasini.

Retsessiv belgilar - - gomozigot organizmlarning mono-, di- va poliduragay chatishtirilganda 1-chi avlodda yuzaga chiqmayadigan belgilar, ya'ni faqat gomozigota holatdagi organizmlarda yuzaga chiqadigan belgilar.

Ribosoma – RNK va oqsildan tuzilgan, oqsil biosintezini amalga oshadigan hujayra organoidi.

RNK-polimeraza – DNK matrisasida RNK sintezini amalga oshiruvchi ferment.

Sayt - DNK molekulasini ma'lum joyi:

restriksiya sayti – restriktaza "aniqlaydigan" ma'lum tartibda joylashgan nukleotidlar ketma-ketligi (4-10 nukleotidlar);

splaysing sayti – intron va ekzon orasidagi ma'lum tartibda joylashgan nukleotidlar ketma-ketligi bo'lib, splaysing jarayonini normal ketishini ta'minlaydi.

Segregasiya – meyoz bo'linishida gomologik xromosomalarning bir biridan ajralishi.

Sikvenslash – DNK molekulasida nukleotidlar yoki oqsilda aminokislotalar ketma-ketligini joylashini aniqlash jarayoni

Splaysing – iRNKdan intronlarni olib tashlash va qolgan ekzonlarni bir biriga "ulash" jarayoni, ya'ni mRNKni iRNKdan hosil qilish.

Sinteniya – uzoq turlarning xromosoma qismlarini gomologiyasi.

Sporadik – tasodifan paydo bo'lish, masalan, kasallik nasldan naslga o'tmagan, tasodifan kuzatilgan.

Stop-kodon – translyasiya jarayonini to'xtashini aniqlovchi kodonlar: UAG, UGA, UAA.

Transversiya – purin asosini pirimidin asosiga almashinishi

Transduksiya – DNK molekulasining bir qismini virus orqali bitta bakteriyadan ikkinchi bakteriyaga o'tishiga aytiladi.

Transzitsiya – bitta purin asosin ikkinchi purin asosiga yoki bitta pirimidin asosini ikkinchi piridin asosiga almashinishi.

Transkriptsiya – oqsil strukturasiidagi irsiy ahborotni DNKdan RNKga nukleotidlar tartibi shaklida ko'chirilishi.

Translyatsiya – oqsil strukturasiidagi irsiy ahborotni mRNKdan sintezlanayotgan oqsilning aminokislotalar tartibi shaklida o'tishi.

Transpozitsiya – DNK segmentinin g bitta joydan boshqa joyga, resiproq almashinuvisiz o'tishi.

Transpozon – qo'chib yuruvchi genetik elementlar.

Trisomiya – organizmda qaysidir juft xromosomaga yana bitta xromosomaning qo'shilishi.

Transgen – gen terapiyasida vektor tarkibida hujayraga kiritilgan gen.

Transgen organizmlar – gen injeneriyasi yordamida irsiyoti o'zgargan organizmlar.

T-DNK – agrobakterium Ti – plazmidasi tarkibidagi shish hosil qiluvchi DNK bo'lagi.

Transpozon – qo'chib yuruvchi genetik elementlar.

Transkripton — eukariotlarda transkripsiya birligi.

Translokatsiya - xromosoma aberratsiyasi bo'lib, bir qismi uzulib boshqa juft xromosomaga birikishiga aytiladi.

Translokatsiya (Robertson) – ikkita akrosentrik xromosomalar o'rtasida kuzatiladi, xromosomalar sentromeralari sohasi bilan birikadi, kalta yelkalari esa, tushib qoladi.

Triploid (organizmlar) – 3p xromosomalar to'plamiga ega bo'lgan organizmlar.

Trisomiya – diploid xromosomalar to'plamiga ega bo'lgan organizmda qaysidir juft xromosomasida ikkitaning o'rniga uchta xromosomaning bo'lishi.

Telomera – xromosomaning oxirgi qismi, uchi. Odamda telomeralari kuyidagi nukleotidlar ketma-ketligi bilan tugaydi: (TTAGGG) n .

Teratogen - tug'ma nuqsonlarni rivojlantiruvchi omil.

Teskari transkripsiya – bir zanjirli RNK molekulasidan qo'shaloq zanjirli DNK molekulasini sintezlanishi.

Ti – plazmida - agrobakterium hujayrasidagi o'simliklarda o'sma (shish) hosil qiluvchi plazmida.

O'zgaruvchanlik – o'z belgilarini o'zgartirish, yangi belgilarga ega bo'lish, avvalgi belgilarni yo'qotish tirik organizmlarning xossasi. O'zgaruvchanlik bo'ladi: fenotipik va genotipik, irsiy yoki irsiy bo'lmagan, modifikasion va mutasion, muayan va nomuayan.

Fazmidalar —duragay vektorlar bo'lib, ham fag, ham plazmida shaklida rivojlanishi mumkin

Farmakogenetika – tibbiy genetikaning bir tarmog'i bo'lib, irsiyotning dori-darmonlarga ta'sirini o'rganadigan bo'lim.

Fenokopiya – belgilari bo'yicha irsiy kasallikning klinik manzarasiga o'xshash, lekin kasallikning kelib chiqishi irsiyotga bog'liq emas.

Fenotip – organizmning belgilarini yig'indisi.

Filogenetik daraxt — daraxt shakldagi sistematik guruhlar o'rtasidagi qarindosh va tarixiy bog'lanishlarni ifodalovchi sxema.

Fitogemaglyutinin — veshество, kotoe primenyayut dlya stimulyasii mitozu v sitogeneticheskom metode.

Ximera – genetik har xil zigotalardan olingan hujayralardan tashkil topgan individ.

Xromatida – xromosomaning uzunasiga joylashgan ikkita subbirliklari.

Xromosoma aberratsiyasi (mutasiyasi) – xromosomaning tuzilishini o'zgarishi.

X- xromosomaga birikkan nasllanish – belgini yuzaga keltiradigan gen jinsiy X-xromosomada joylashgan bo'lsa, unga birikib nasllanadi. Demak, belgini yuzaga chiqishi jinsga, dominant yoki resessivligiga va ota-onaning qaysi birida bo'lishiga bog'liq.

Sentromera – xromosomadagi bo'linish dukning iplari birikadigan joy, ya'ni ikkita xromatida birikkan joyi.

Sentrosoma yoki hujayra markazi – hujayra bo'linishida ishtiroq etadigan organoid bo'lib, xromosomalarni teng miqdorda ikki qarama karshi qutblarga ajratadi.

Sentromera indeksi (SI) — xromosomaning kalta yelkasini butun uzunligiga nisbati, foizda o'lchanadi.

Sitogenetika – genetika fanining bir tarmog'i bo'lib, xromosomalarning darajasida irsiyot va o'zgaruvchanlikni o'rganadigan bo'lim.

Sistron – genning funksional qismi.

Sitologik xromosomaning genetik xaritasi — xromosomaning tuzilishida genlar joylashish tartibi ko'rsatilgan bo'ladi.

Ekzon – iRNK tarkibida oqsil strukturasi to'g'risida informatsiya saqlaydigan qismi, ya'ni genetik faol qismi.

Ekspressivlik - fenotipning yuzaga chiqish darajasi.

Elongatsiya —translyasiya jarayonini alohida etapi bo'lib, oqsil molekulasi aminokislotalar biriktirib uzayishiga aytiladi.

Embrional induksiya — embrionning bir guruh hujayralari boshqa joyda joylashgan hujayralarga ta'siri.

Episoma – plazmada birikkan xromosoma.

Epistaz - noallel genlarning o'zaro ta'siri bo'lib, bir juft gen boshqa juft genlarning ta'sirini yuzaga chiqarmaydi.

Eukariotlar – yadrosi shakllangan hujayralardan tashkil topgan organizmlar.

Euxromatin – xromosomalarning genetik faol qismlari, despiral holatda bo'ladi va yadro bo'yoqlari bilan yaxshi bo'yalmaydi.

ADABIYOTLAR

ASOSIYLAR:

1. Генетика под ред. Иванова В.И. –Учебник для ВУЗов, Москва, ИКЦ «Академкнига», 2006.
2. Gurbachan Miglani. Essentials of Molecular Genetics. / 2015. - Publisher: Copublished by Alpha Science Internatio. – 457 p.
3. Jack J. Pasternak. An Introduction to Human Molecular Genetics. / Second Edition. – 2017. – 631 p.
4. Применение молекулярных методов исследования в генетике: Учебное пособие / Л.Н. Нефедова. - М.: НИЦ Инфра-М, 2012. - 104 с.:
5. Практический курс общей генетики [Электронный ресурс] : учеб. пособие для студентов биологических специальностей педагогических высших учебных заведений / В. И. Нахаева. - 2-е изд., стереотип. - М. : ФЛИНТА, 2011. - 210 с.
6. Молекулярные основы современной биологии: учебное пособие / Г.М. Дымшиц, О.В. Саблина; М-во образования и науки РФ, Новосиб. гос. ун-т, Фак. естеств. наук, Каф. молекуляр. биологии, Специализир. учеб.-науч. центр, Каф. естеств. наук. Новосибирск: [Новосибирский государственный университет], 2012. - 250 с.
7. Молекулярная биология клетки: рук. для врачей / Джеральд М. Фаллер, Деннис Шилдс ; пер. с англ. под общ. ред. акад. И.Б. Збарского.- Москва : Бином-Пресс, 2006. - 256 с.
8. Медицинская биология и генетика. Учебник / К.Н.Нишабаев, П.Р.Алимходжаева, Д.Х.Хамидов: Ташкент: Ўзбекистон Миллий энциклопедия", 2008.- 429с.
9. Методы медицинской генетики. Учебное пособие / П.Р. Алимходжаева, Н.М.Туйчибаева, А.А.Абдувалиев, М.С.Гильдиева: Ташкент: "Илм Зиё", 2015-238с.
10. Umumiy va tibbiy genetikadan masalalar va topshiriqlar toplami. Oguv qollanma. / P.R. Alimxodjeva, D..M.Tuychbayeva. Toshkent, 2017. 170 bet.

QOSHIMCHA:

1. Молекулярная биология: учеб. для студентов вузов, обучающихся по специальности 032400 "Биология" / А.С. Конищев, Г.А. Севастьянова. - М.: Академия, 2005. - 396 с.
2. Sandy B. Primrose, Richard Twyman. Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7th Edition. / Wiley-Blackwell. - 2006. - 672 p.
3. Tom Strachan, Andrew Read. Human Molecular Genetics. / Garland Science Publishing, 2018. - Textbook - 770 p.
4. Сборник задач по генетике / [Г. В. Максимов, В. Н. Василенко, О. И. Кононенко и др.]. - Москва: Вузовская книга, 2010. - 141 с.
5. Браун, Т.А. Геномы / Т.А. Браун. - Москва: Институт компьютерных исследований, 2011. - 944 с.
6. Применение молекулярных методов исследования в генетике: учебное пособие / Л.Н. Нефедова. - Москва: НИЦ Инфра-М, 2012. - 104 с.
7. Геномика. Роль в медицине / С. Примроуз, Р. Тваймен. - Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2014. - 276 с.
8. Введение в генетику: учебное пособие / В.А. Пухальский. - Москва: НИЦ Инфра-М, 2014. - 224 с.
9. Хроматин: упакованный геном / С.В. Разин, А.А. Быстрицкий. - Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2012. - 176 с.
10. Мир белковых молекул: учебное пособие / А.В. Смирнов. - Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2013. - 124 с.
11. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / К. Уилсон, Д. Уолкер. - Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2013. - 848 с.

Internet resurslari:

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. <http://highwire.stanford.edu/>
3. <http://elibrary.ru/defaultx.asp>
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/book/genomic>

Alimxodjaeva P.R., Tuychibaeva N.M., Abduvaliev A.A., Boboev Q.T.

MOLEKULAR GENETIKA

DARSLIK

Bosh muxarrir *O. Kozlova*
Badiy muxarrir *J. Hamdamov*
Kompyuterda sahifalovchi *F. Abdusattorov*

NASH.lits. AA № 8798
«TIBBIYOT NASHRIYOTI MATBAA UYI» MCHJ
Toshkent shahri, Olmazor tumani, Shifokorlar, 21



TIBBIYOT NASHRIYOTI MATBAA UYI

Hajmi – 14,74 n.l. Tiraji – 50. Formati 60x84. 1/16. Buyurtma № CBUN-2021.

Chop etildi «TIBBIYOT NASHRIYOTI MATBAA UYI» MCHJ

100109. Shifokorlar 21, tel: (998 71)214-90-64, e-mail: rio-tma@mail.ru

№ GUVOHNOMA: 7716

