

Современные технологии в селекции растений. Начальный уровень. 6 февраля, 2023

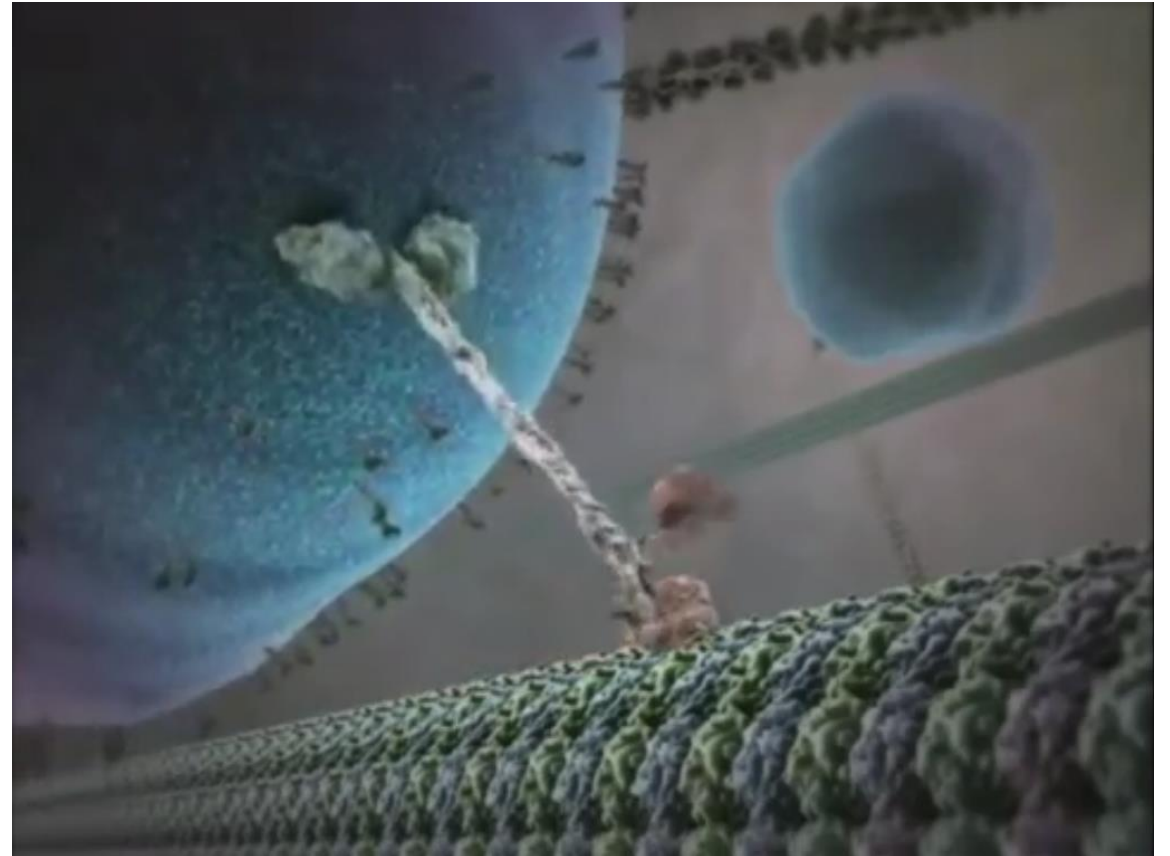
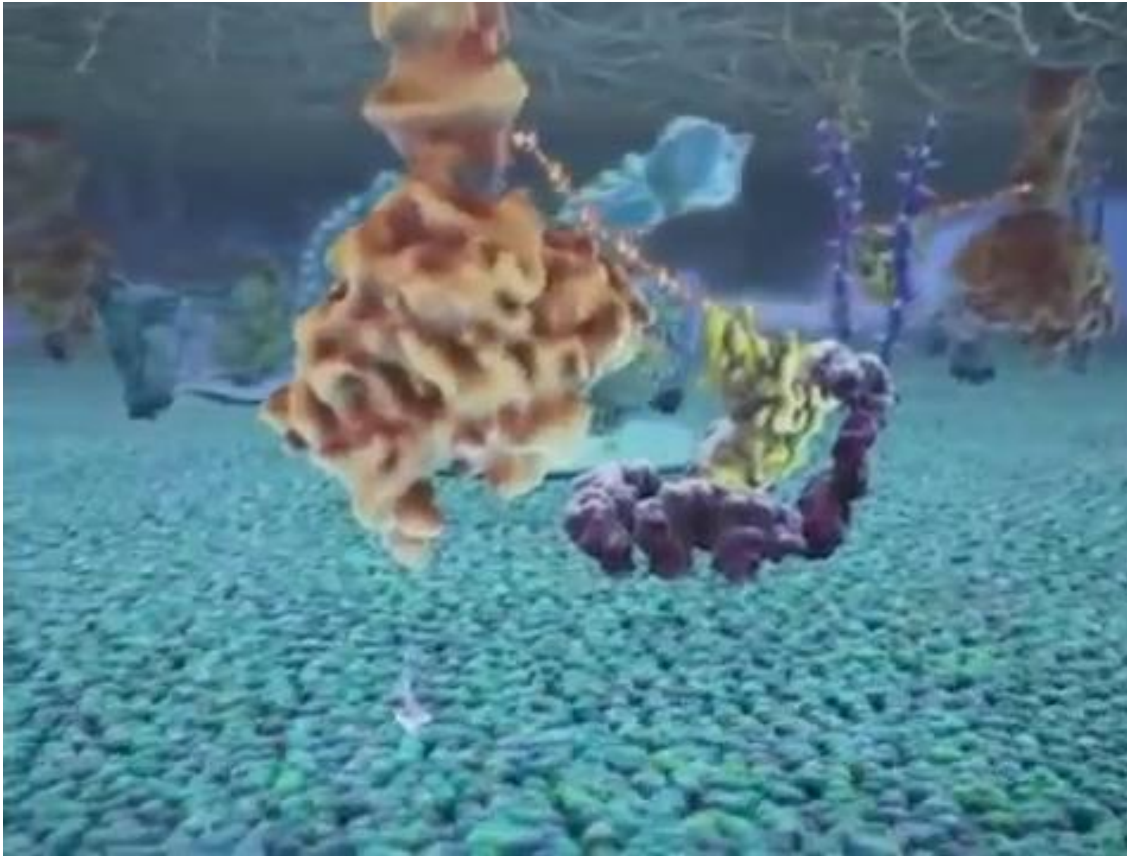
Молекулярные механизмы изменчивости признаков

Анализ наследования качественных признаков

- Молекулярные механизмы изменчивости признаков
- Наследование дискретных признаков. Статистическая проверка гипотез. Генетическое сцепление.
- Генетические последствия самоопыления и панмиксии
- Методы ускорения селекционного процесса: молекулярные технологии

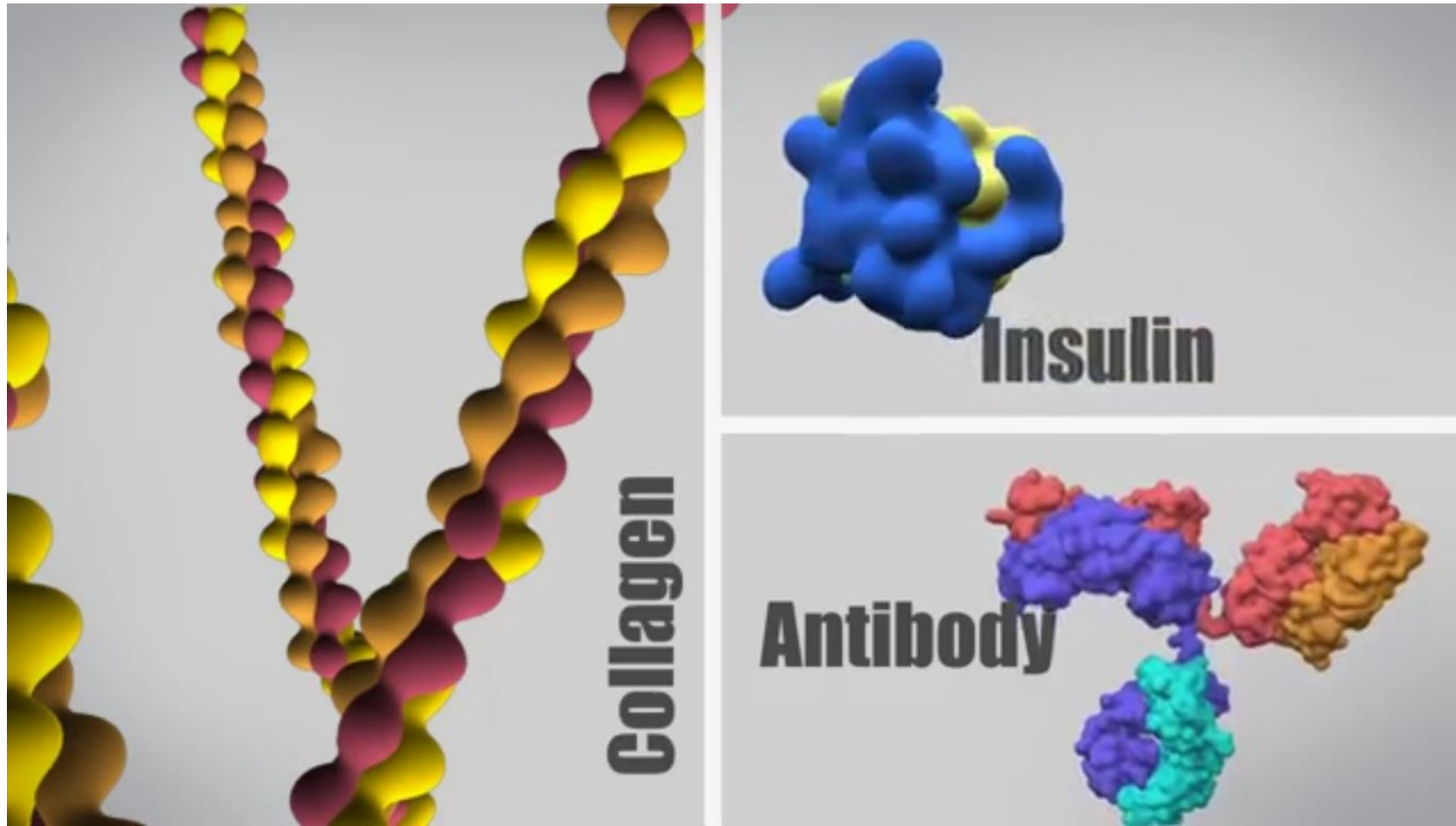
Изменчивость качественных признаков обусловлена молекулярным полиморфизмом небольшого числа генов, изменяющих функции кодируемых белков

”Жизнь – есть форма существования белковых тел...” (Энгельс, 1883)



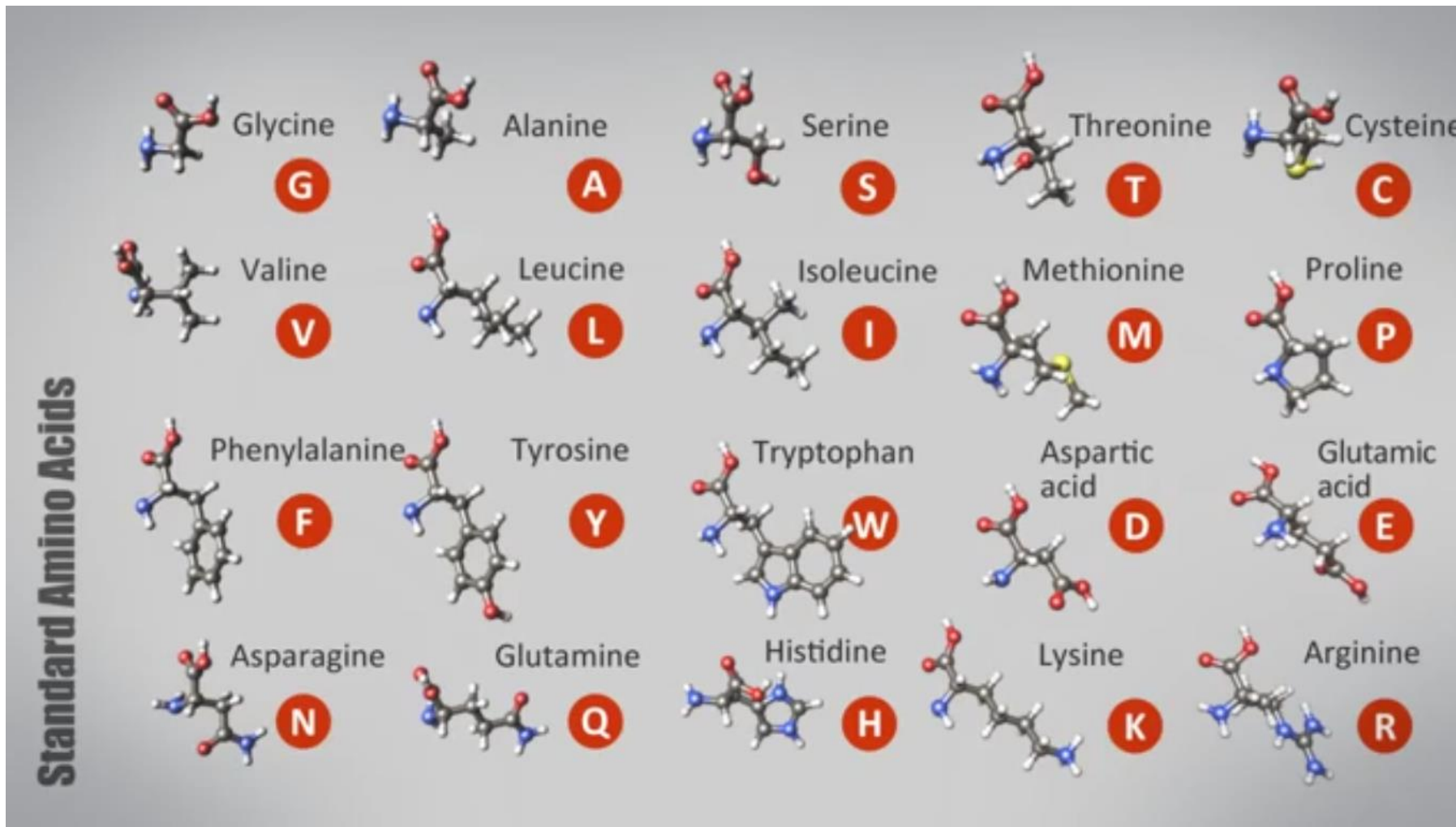
The video: <https://xvivo.com/inner-life-of-the-cell/>, YouTube: Жизнь клетки Inner Life Of A Cell Full Version Русская озвучка

Белки выполняют бесчисленные функции в клетках живых организмов



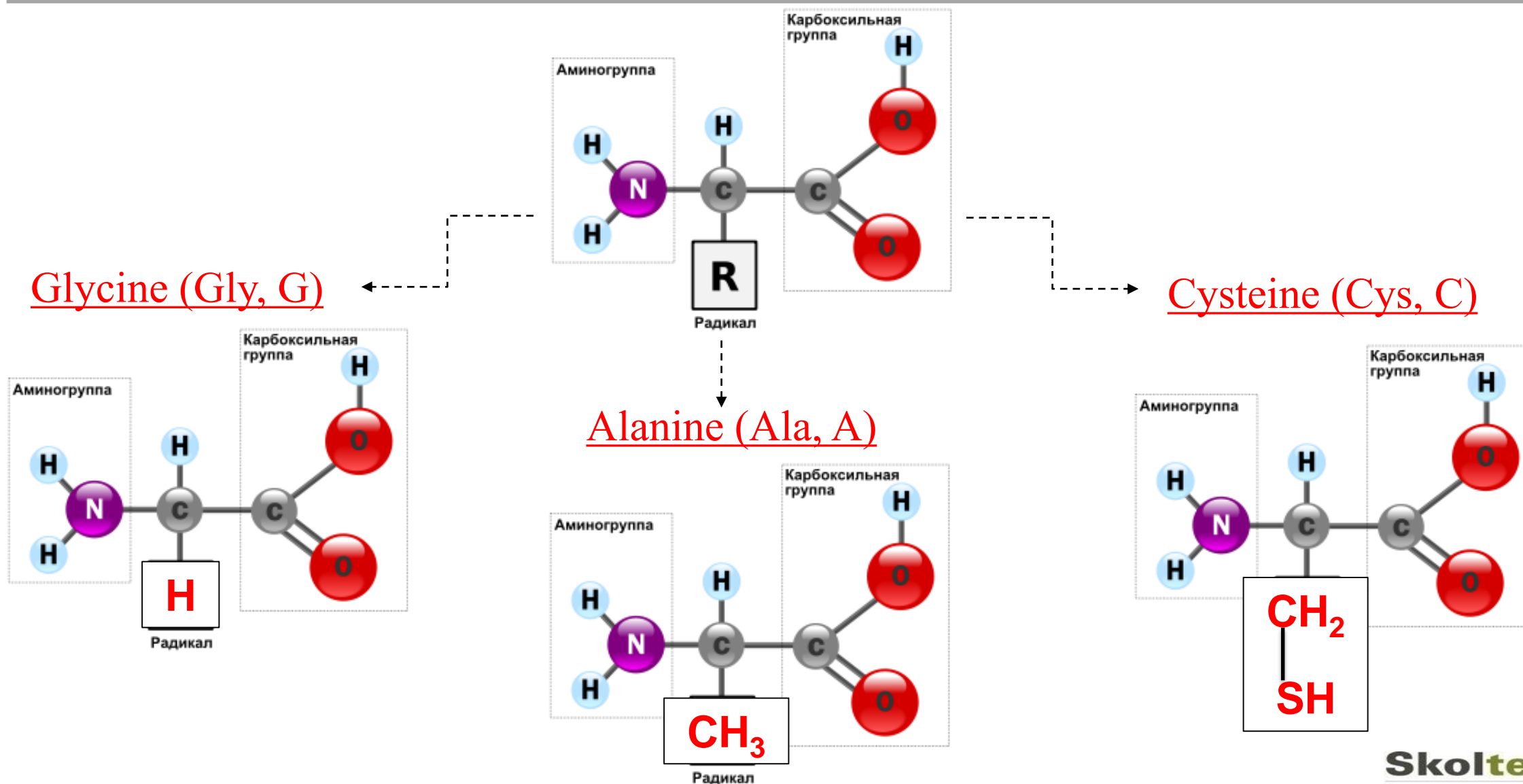
The video: <http://pdb101.rcsb.org/learn/videos/what-is-a-protein-video>, YouTube: wvTv8TqWC48

Несмотря на многообразие выполняемых функций, все белки представляют собой полимеры, собранные из одних и тех же мономеров - 20 аминокислот

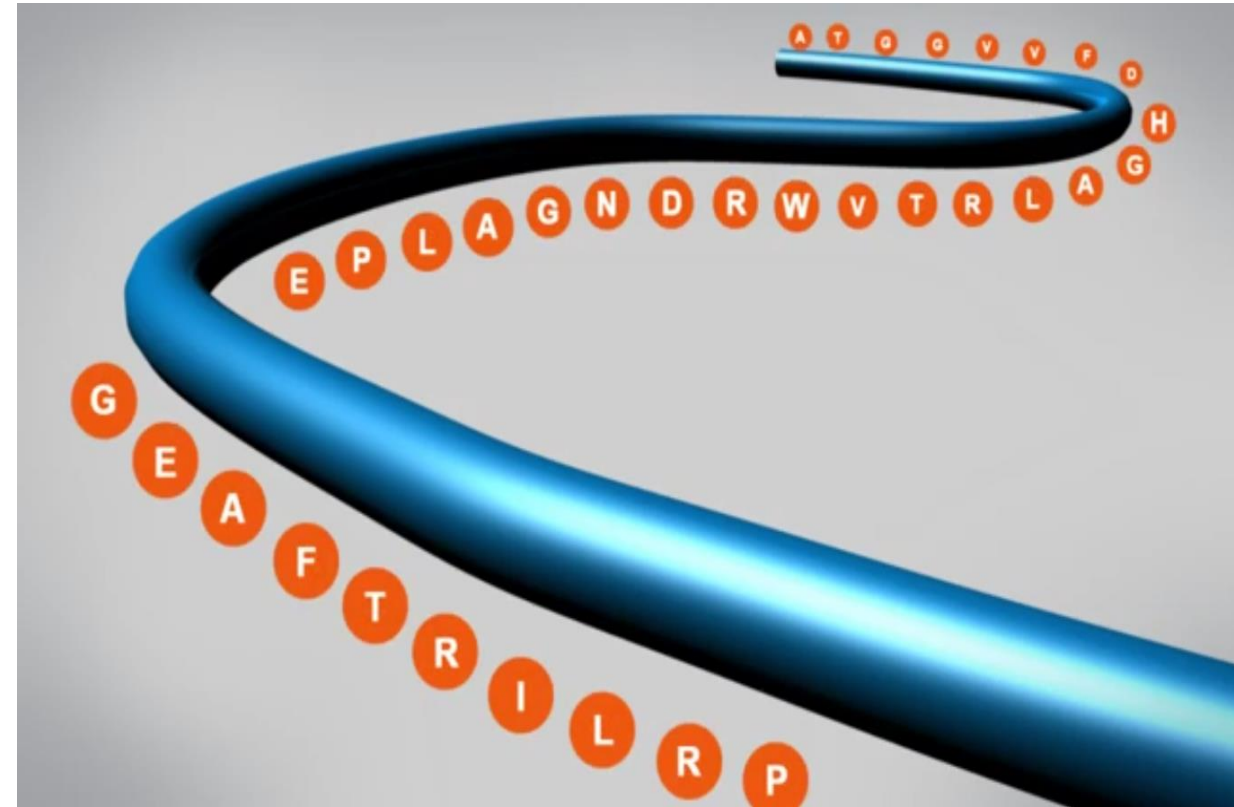
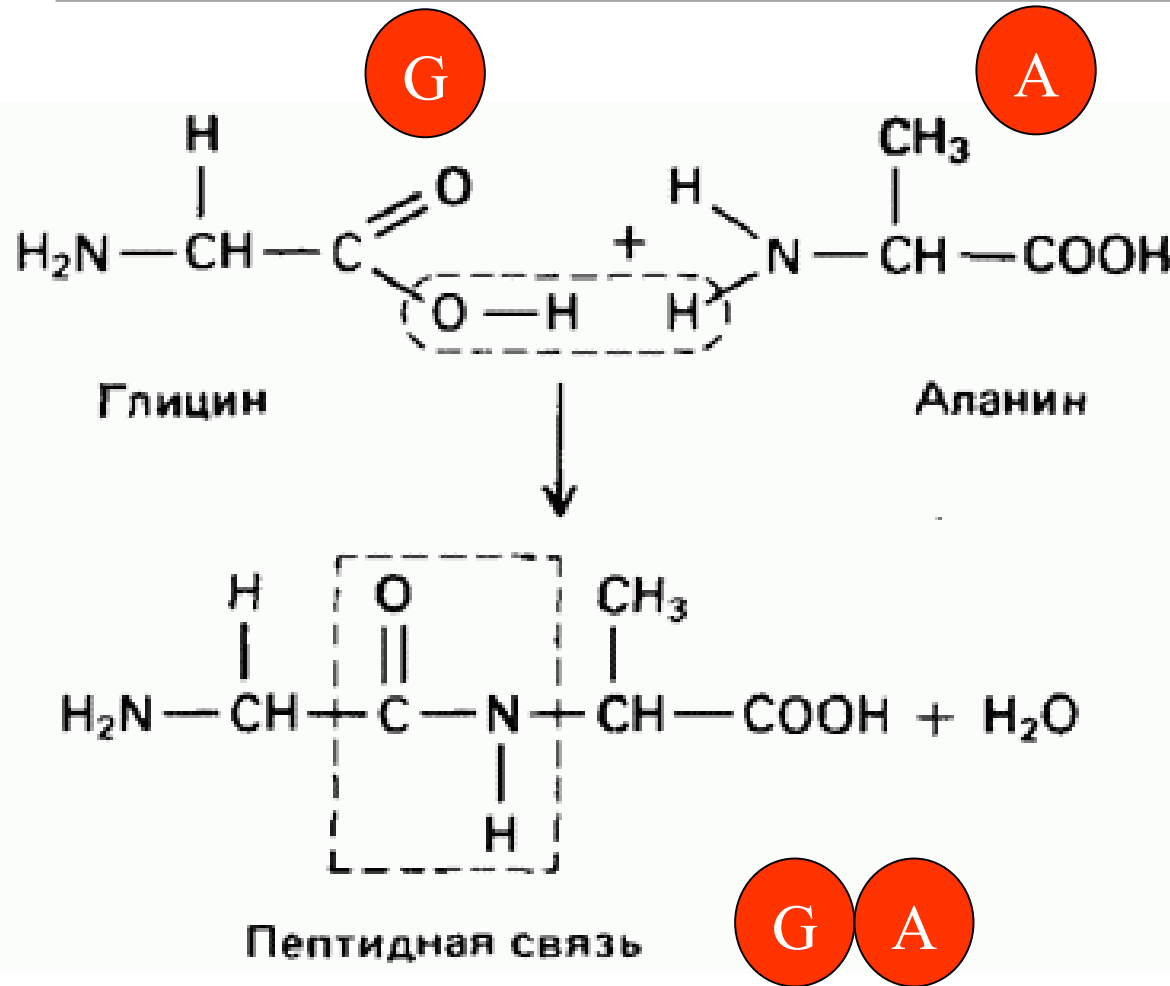


The video: <http://pdb101.rcsb.org/learn/videos/what-is-a-protein-video>, YouTube: wvTv8TqWC48

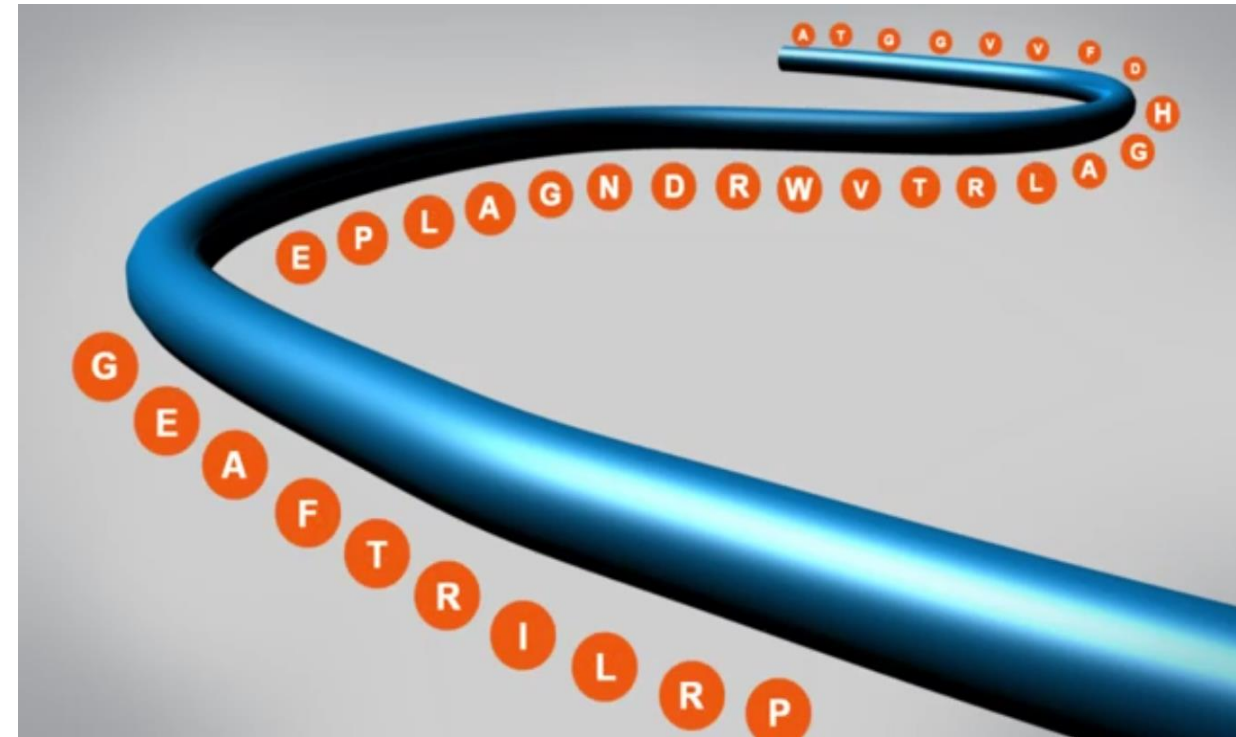
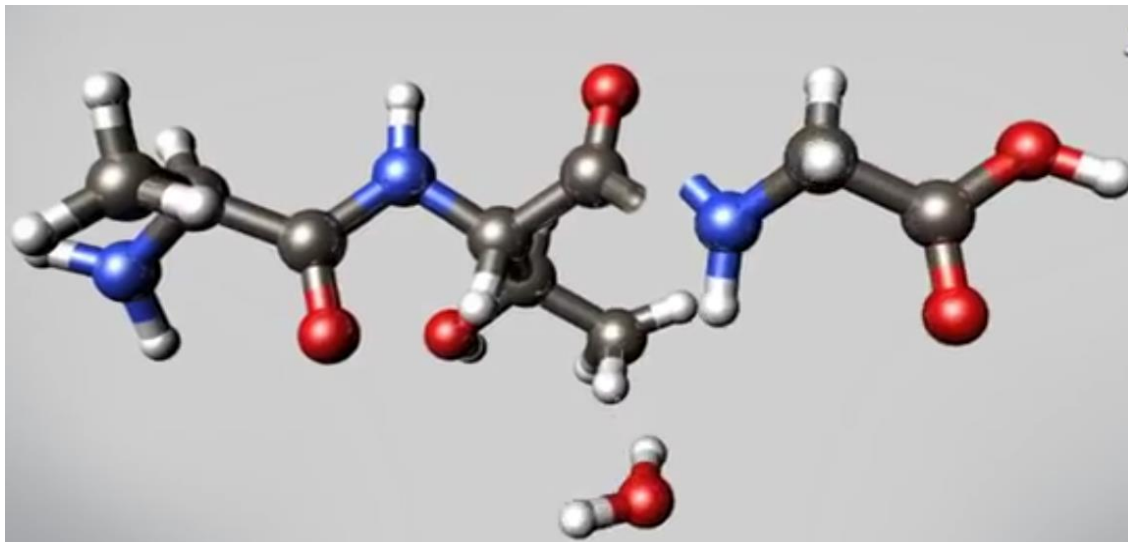
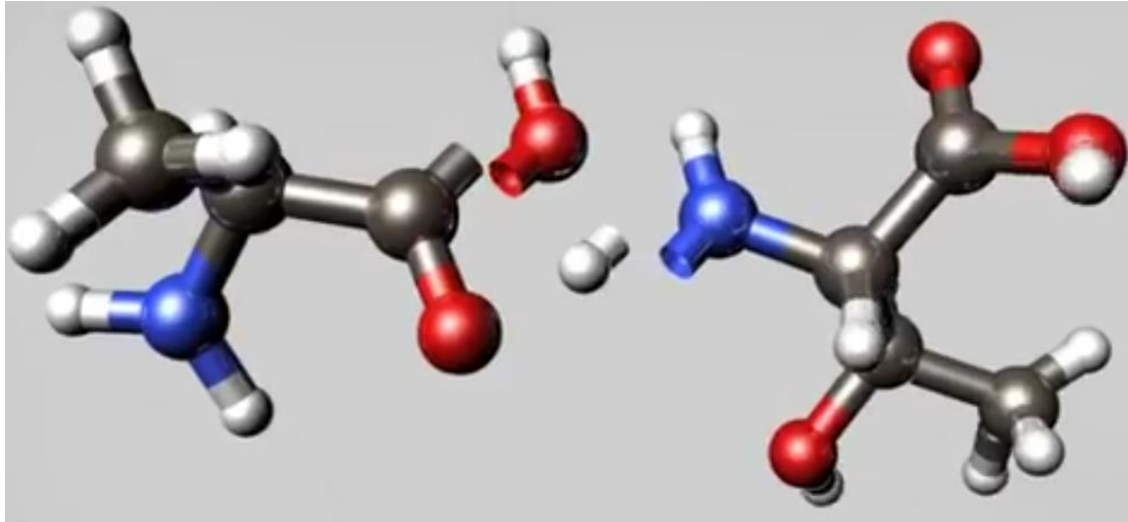
20 аминокислот сходны по строению и различаются между собой лишь своим «радикалом» (**R**).
Именно радикал определяет структуру и свойства конкретной аминокислоты



Аминокислоты соединяются между собой пептидными связями, образуя полипептидную цепь – первичную структуру белковой молекулы

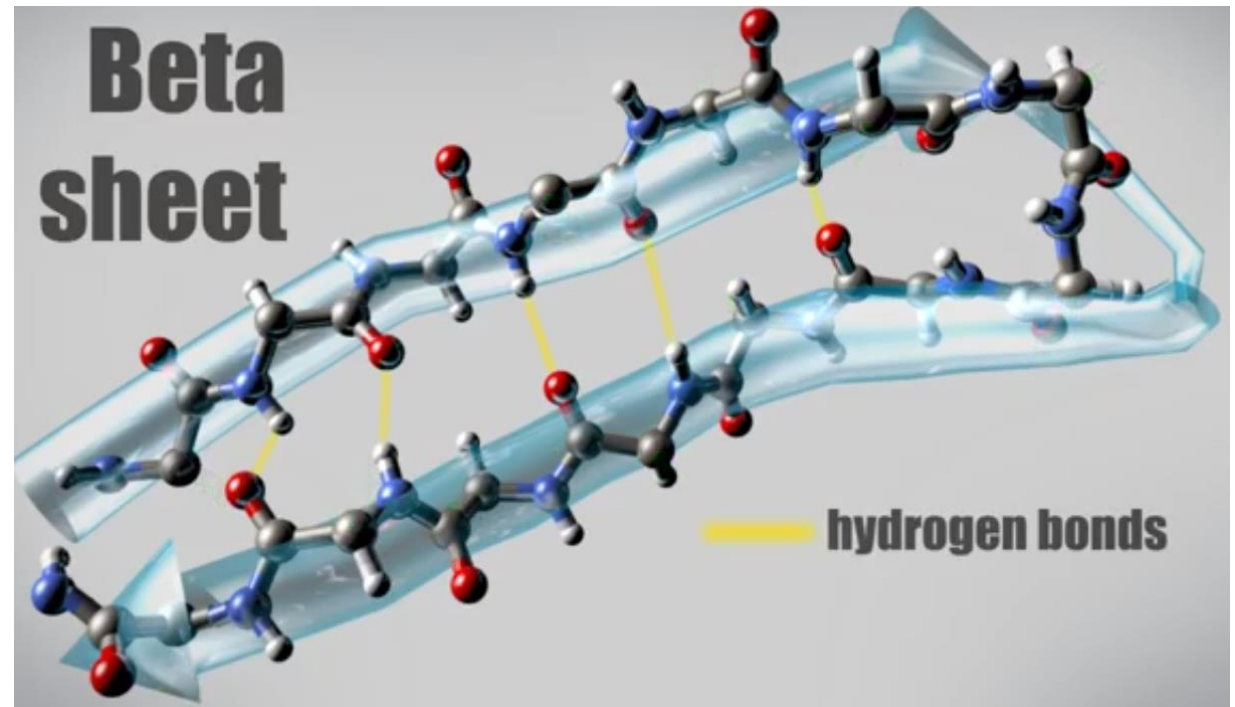
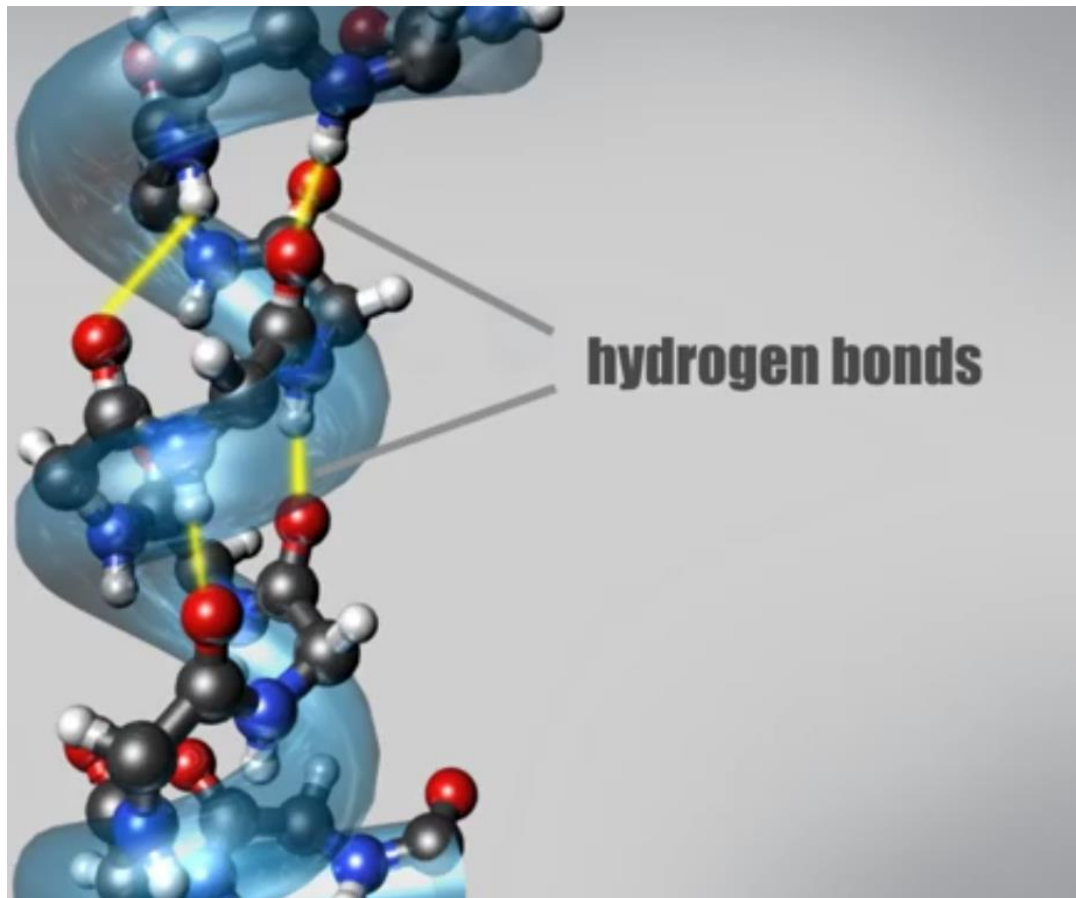


Аминокислоты соединяются между собой пептидными связями, образуя полипептидную цепь – первичную структуру белковой молекулы



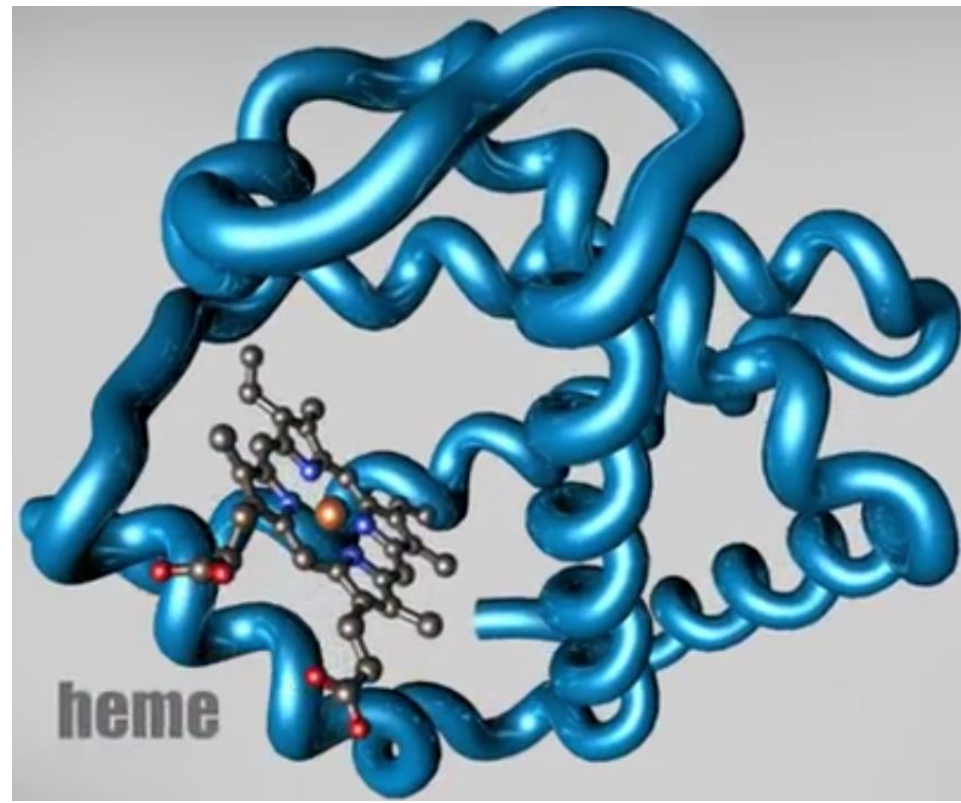
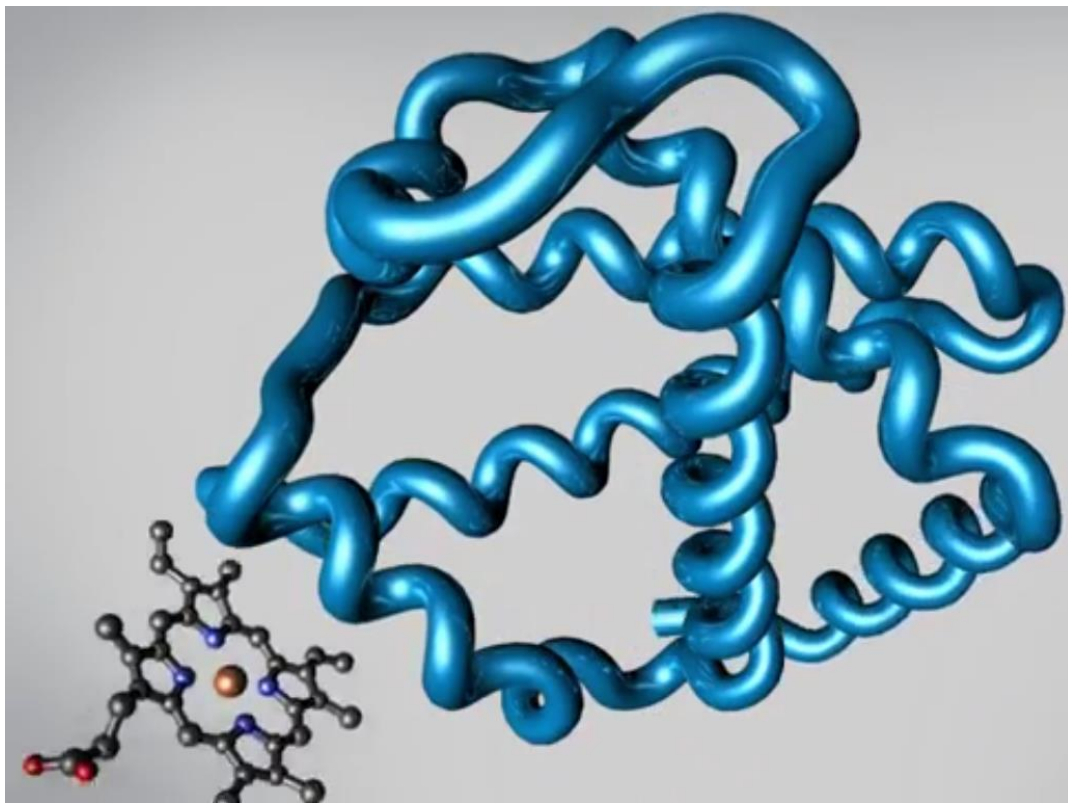
The video: <http://pdb101.rcsb.org/learn/videos/what-is-a-protein-video>

Последовательность аминокислот в полипептидной цепи определяет вторичную структуру белковой молекулы...



The video: <http://pdb101.rcsb.org/learn/videos/what-is-a-protein-video>

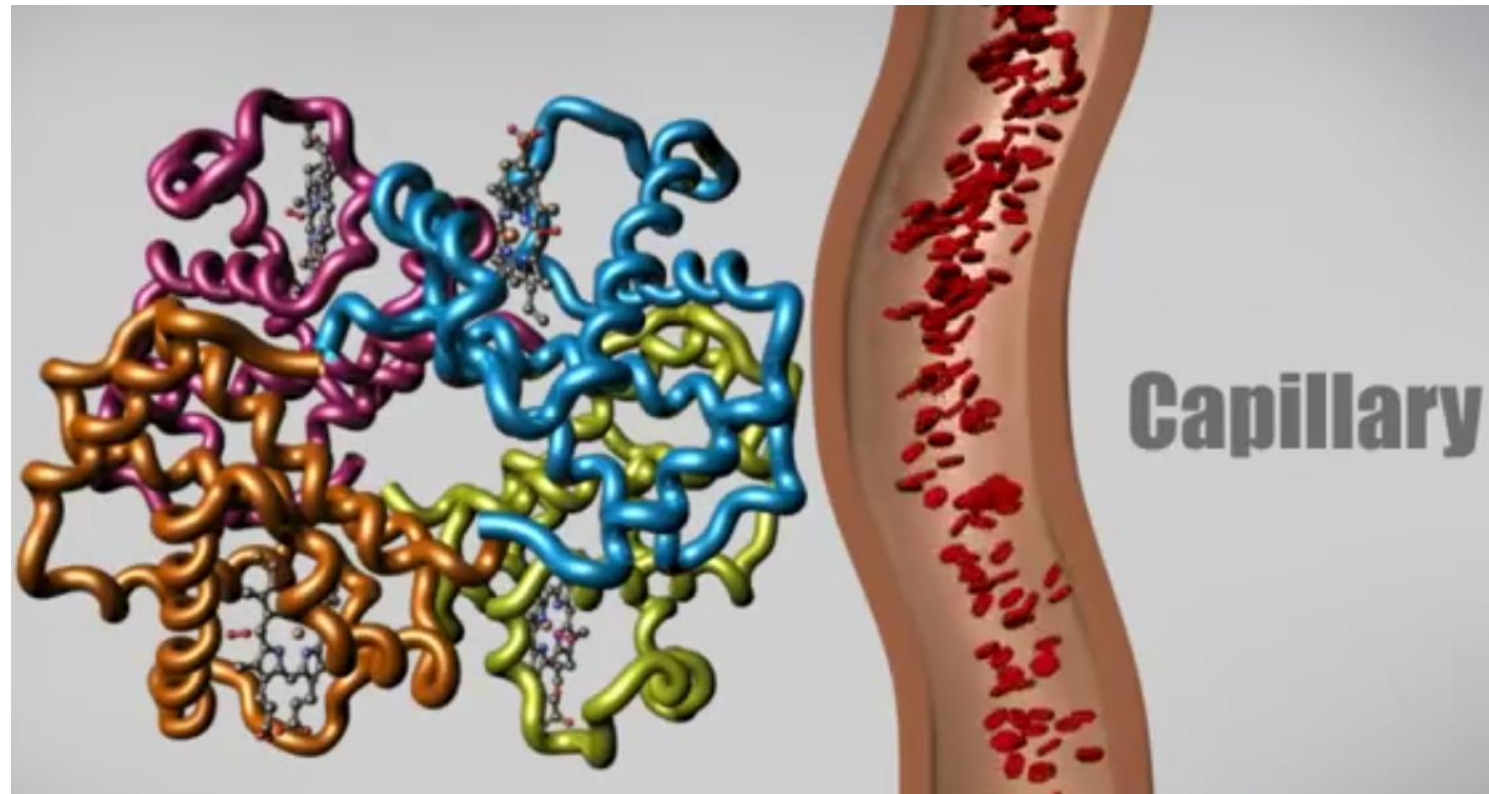
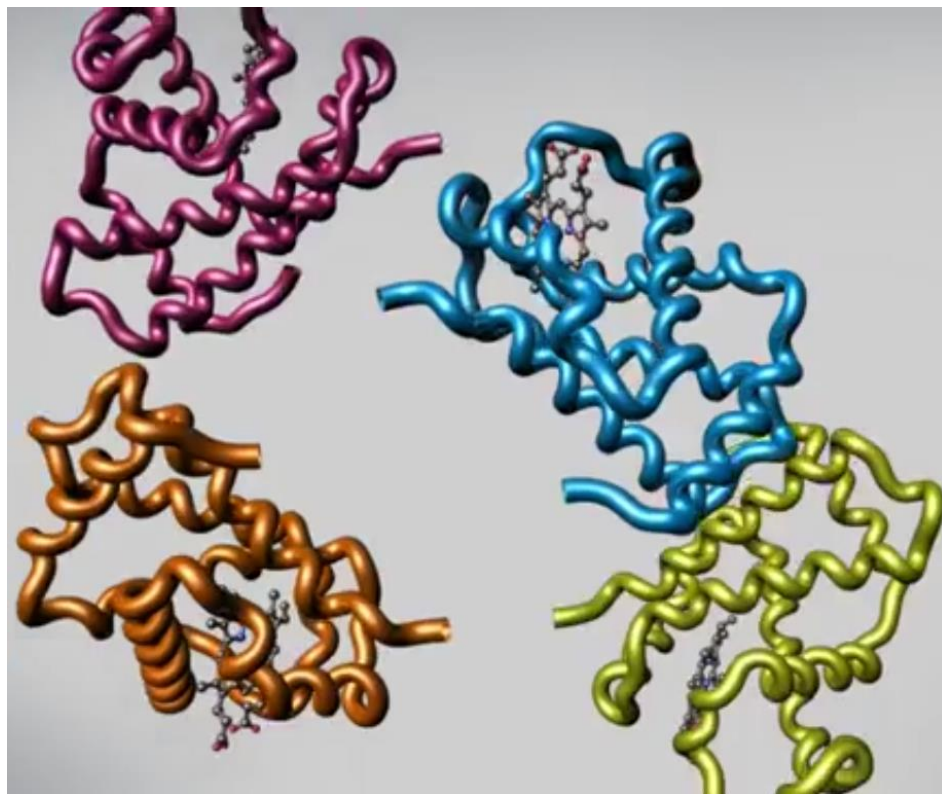
Последовательность аминокислот в полипептидной цепи определяет вторичную и третичную структуру белковой молекулы



Например, субъединицы гемоглобина должны правильно взаимодействовать с кофактором – гемом, несущим атом *Fe*. Неправильная третичная структура белка влияет на взаимодействие.

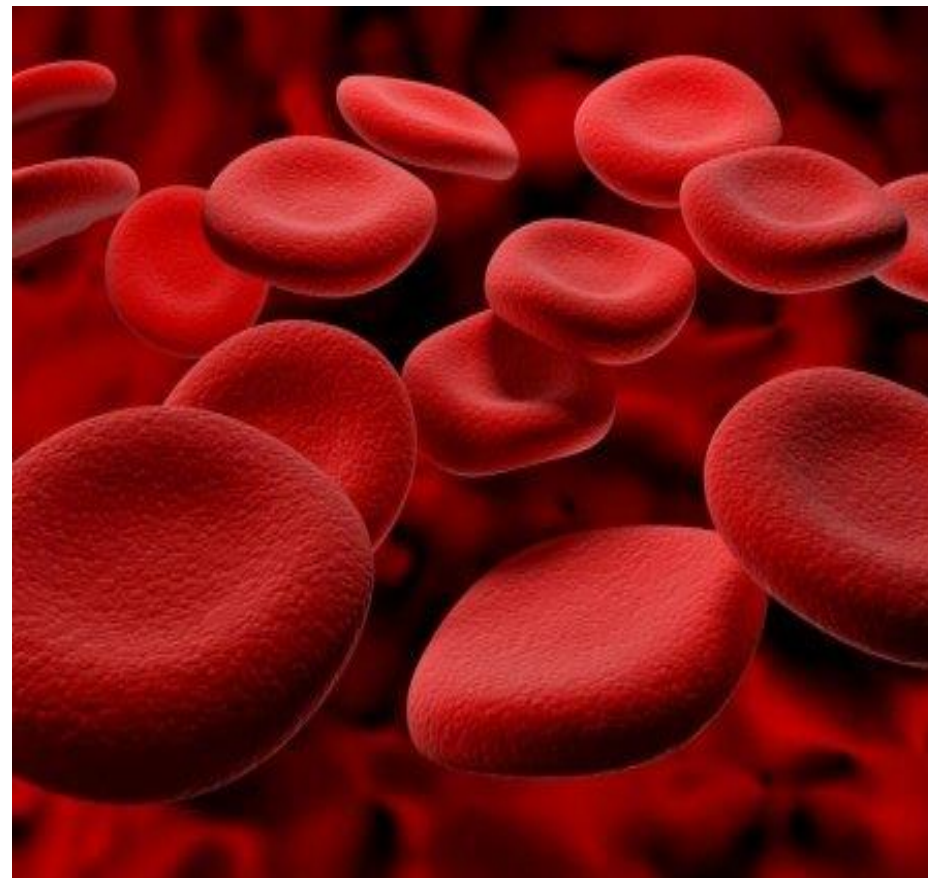
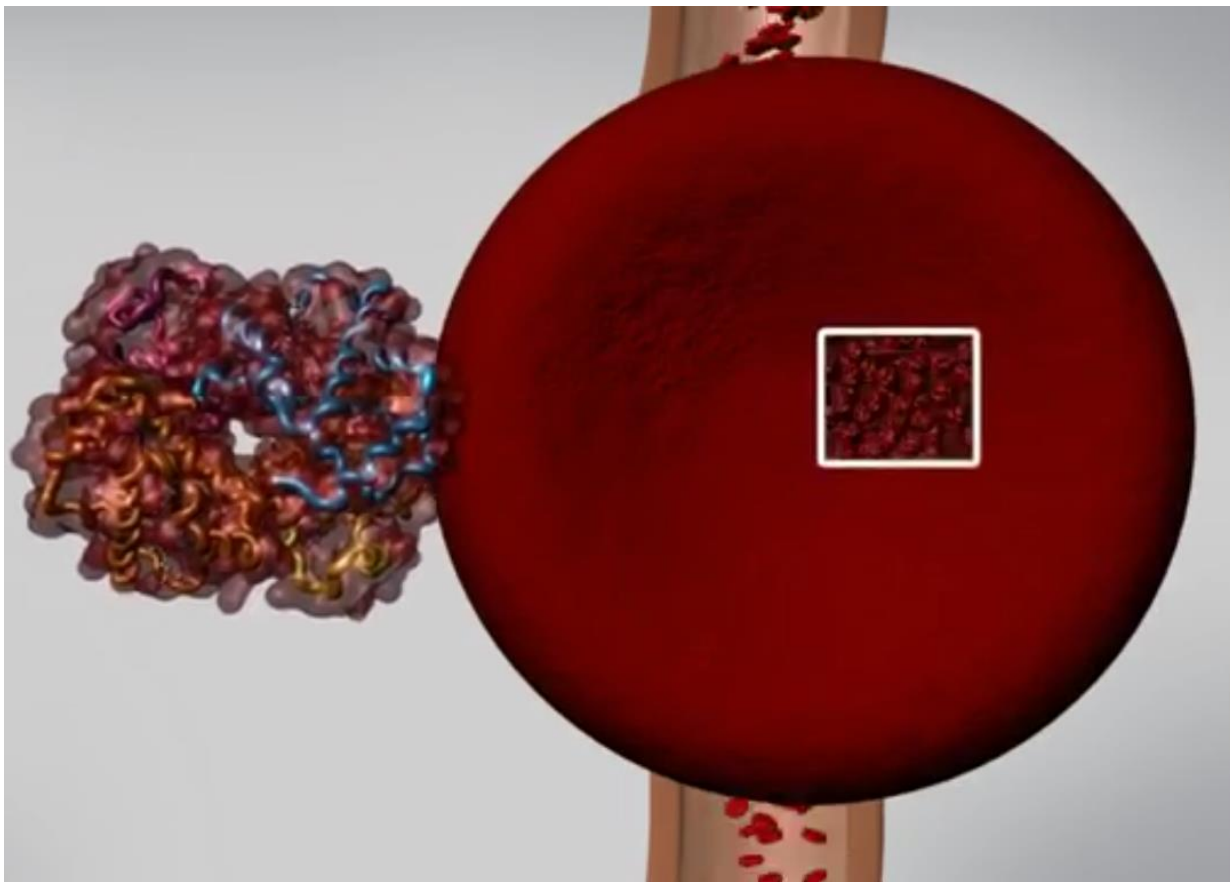
The video: <http://pdb101.rcsb.org/learn/videos/what-is-a-protein-video>

Гемоглобин – пример белковой молекулы с четвертичной структурой



Пример: четыре полипептидные цепи формируют одну функциональную белковую молекулу гемоглобина. В нормальном состоянии человеческий гемоглобин (HbA) – тетрамер, состоящий из двух альфа- и двух бета субъединиц

В каждом эритроците ~ 280 млн молекул гемоглобина



Лишь одна аминокислотная замена ($\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$) в полипептидной цепи гемоглобина может привести к изменению структуры белка и вызвать болезнь

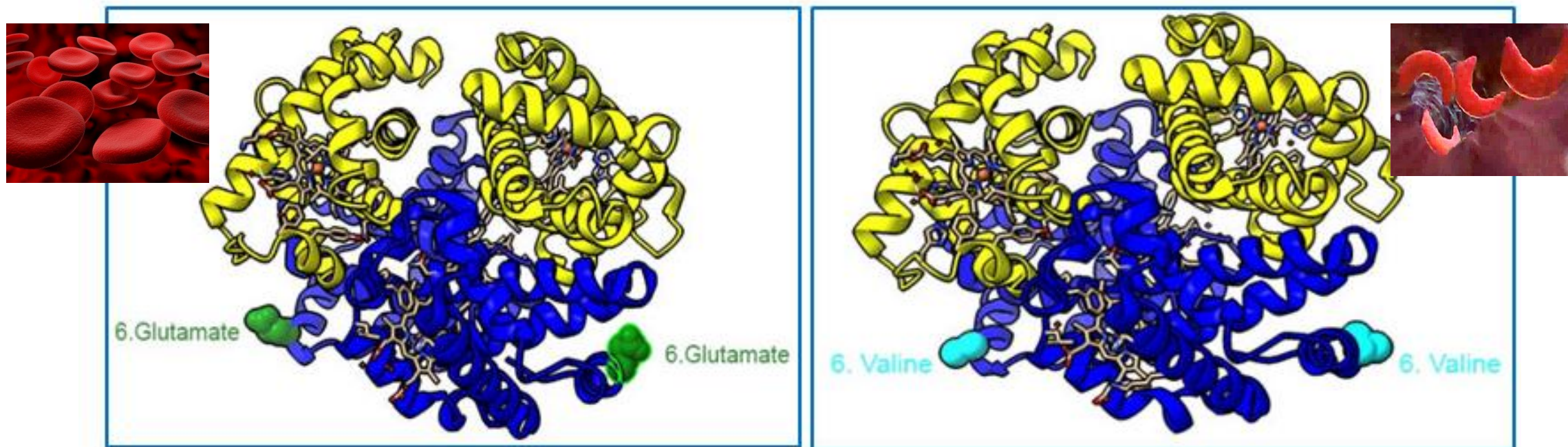


Нормальные
эритроциты



Серповидно-
клеточная анемия

Сравнение молекулы нормального гемоглобина и гемоглобина с измененной структурой, вызывающей серповидно-клеточную анемию



Normal Hemoglobin

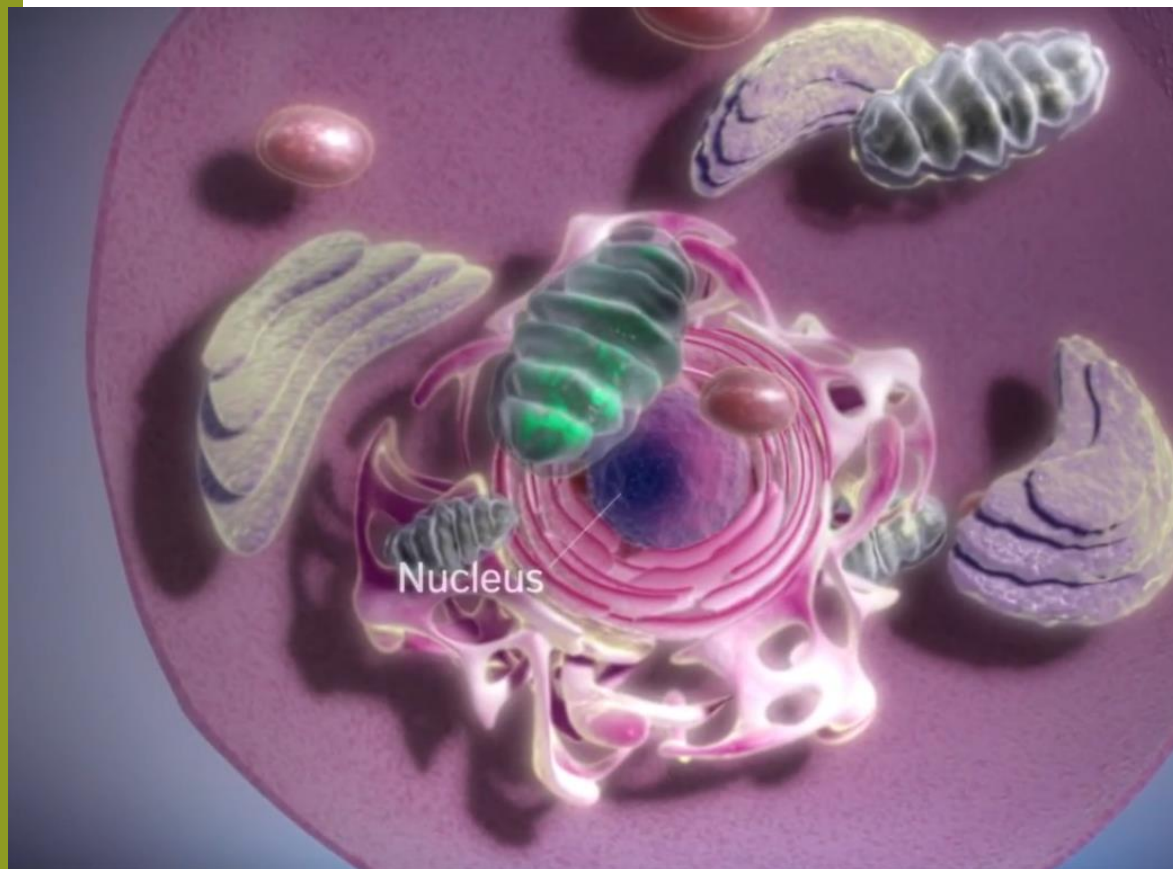
Sickle Cell Hemoglobin

Нормальный гемоглобин содержит отрицательно заряженную, полярную и гидрофильную глутаминовую кислоту. Гемоглобин серповидных клеток содержит валин, который имеет неполярный радикал, располагающийся на поверхности молекулы. В результате этой замены растворимость гемоглобина резко падает, эритроциты, несущие гемоглобин S, деформируются из-за кристаллизации в них гемоглобина.

Изменчивость фенотипического признака часто можно объяснить лишь одной аминокислотной заменой в белковой молекуле, формирующей этот фенотип

- Используя гемоглобин в качестве примера, мы убедились что порядок следования аминокислот в полипептидной цепи непосредственным образом влияет на изменчивость фенотипических признаков
- Следующий вопрос – какой биологический механизм задает порядок следования аминокислот в первичной структуре белковой молекулы?

Как изменчивость внешних признаков детерминируется на уровне ДНК?



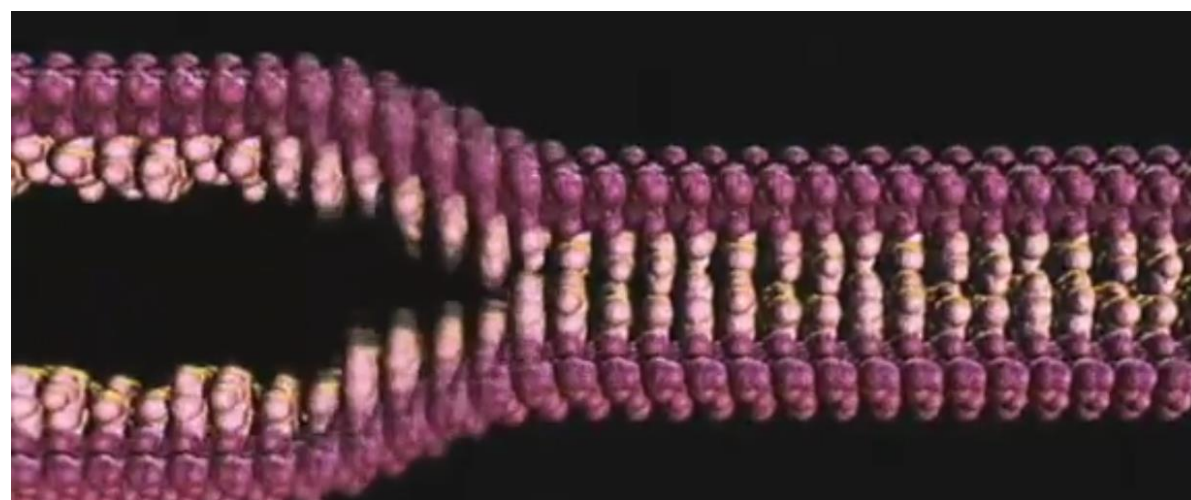
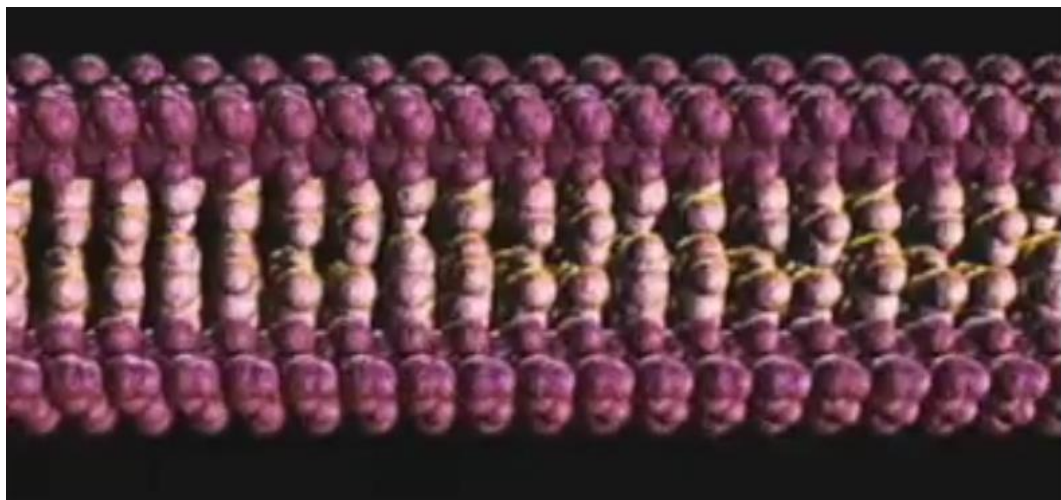
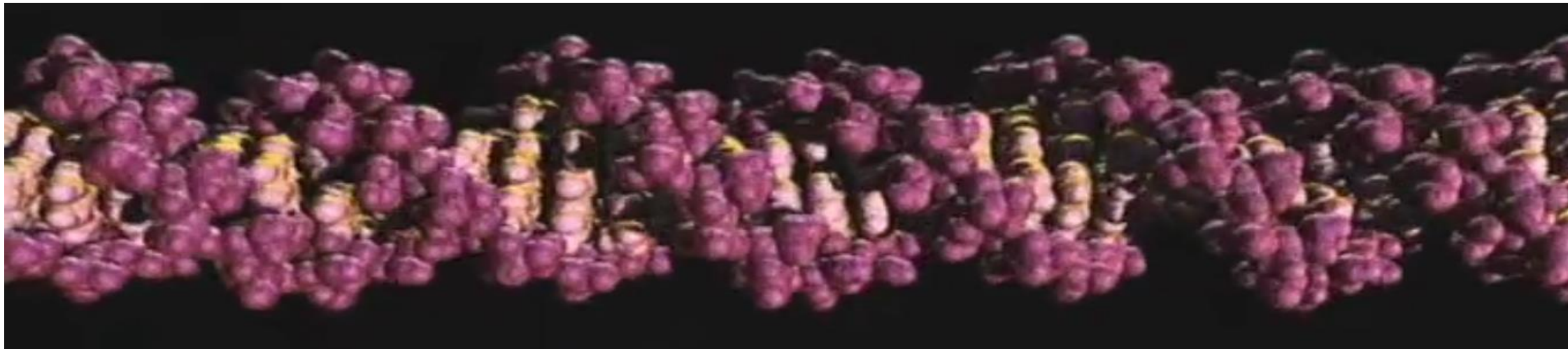
Геном располагается в ядре клетки

The video: <https://www.yourgenome.org/video/from-dna-to-protein>



Например, геном человека распределен между 23 парами хромосом

Двойная спираль ДНК состоит из двух антипараллельных цепей



The video: <https://dnlc.cshl.edu/resources/3d/23-dna-unzip.html>

Каждая цепь состоит из последовательности четырех нуклеотидов: А, С, Т и Г.



Точный порядок следования нуклеотидов в молекуле ДНК задает (кодирует) информацию



Эта система кодирования похожа на двоичную (0/1) систему кодирования компьютеров

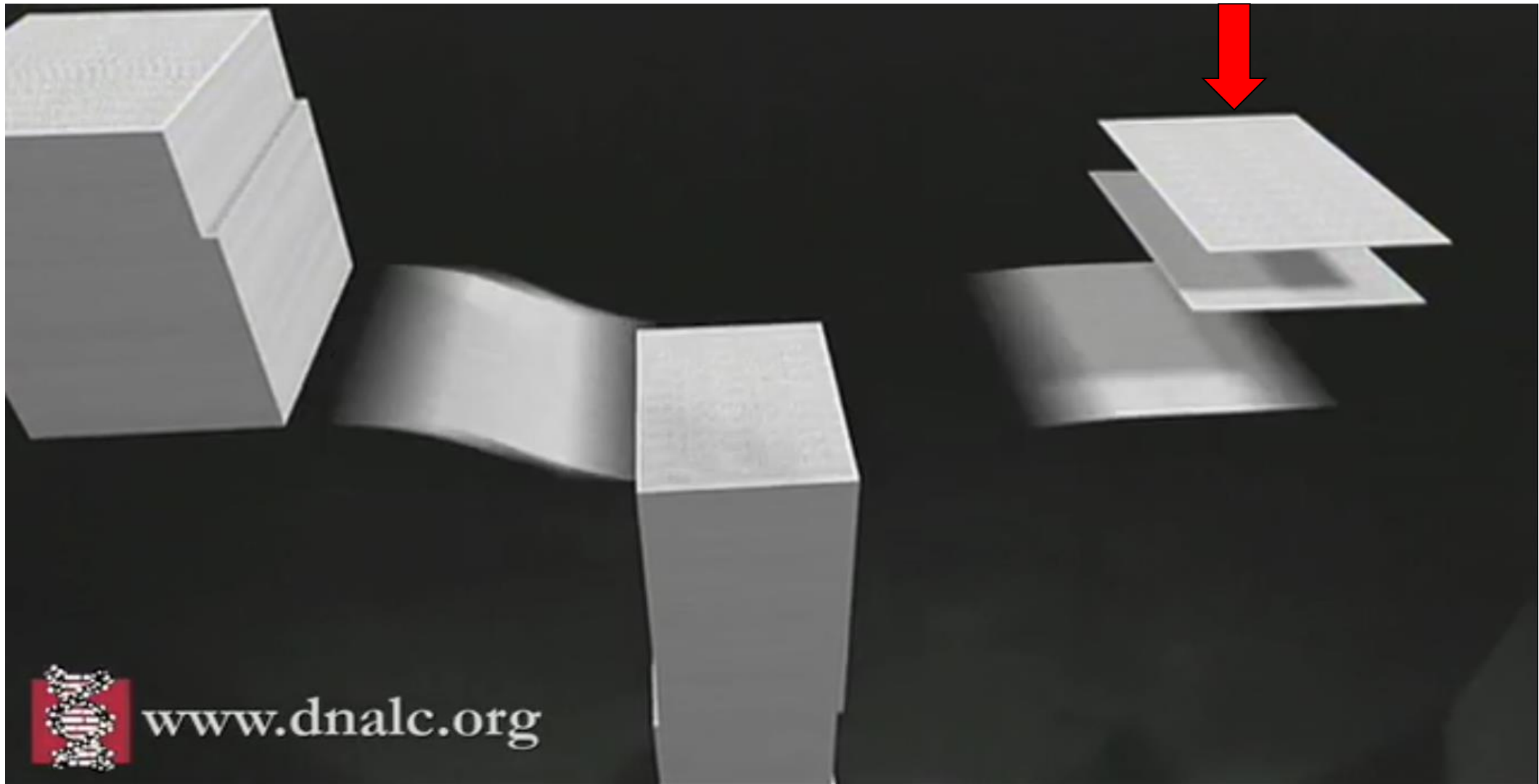
The video: <https://dnalc.cshl.edu/resources/3d/23-dna-unzip.html>

Одна цепь ДНК – комплементарное «отображение» второй цепи:
“А” комплементарно “Т”; “С” комплементарно “G”



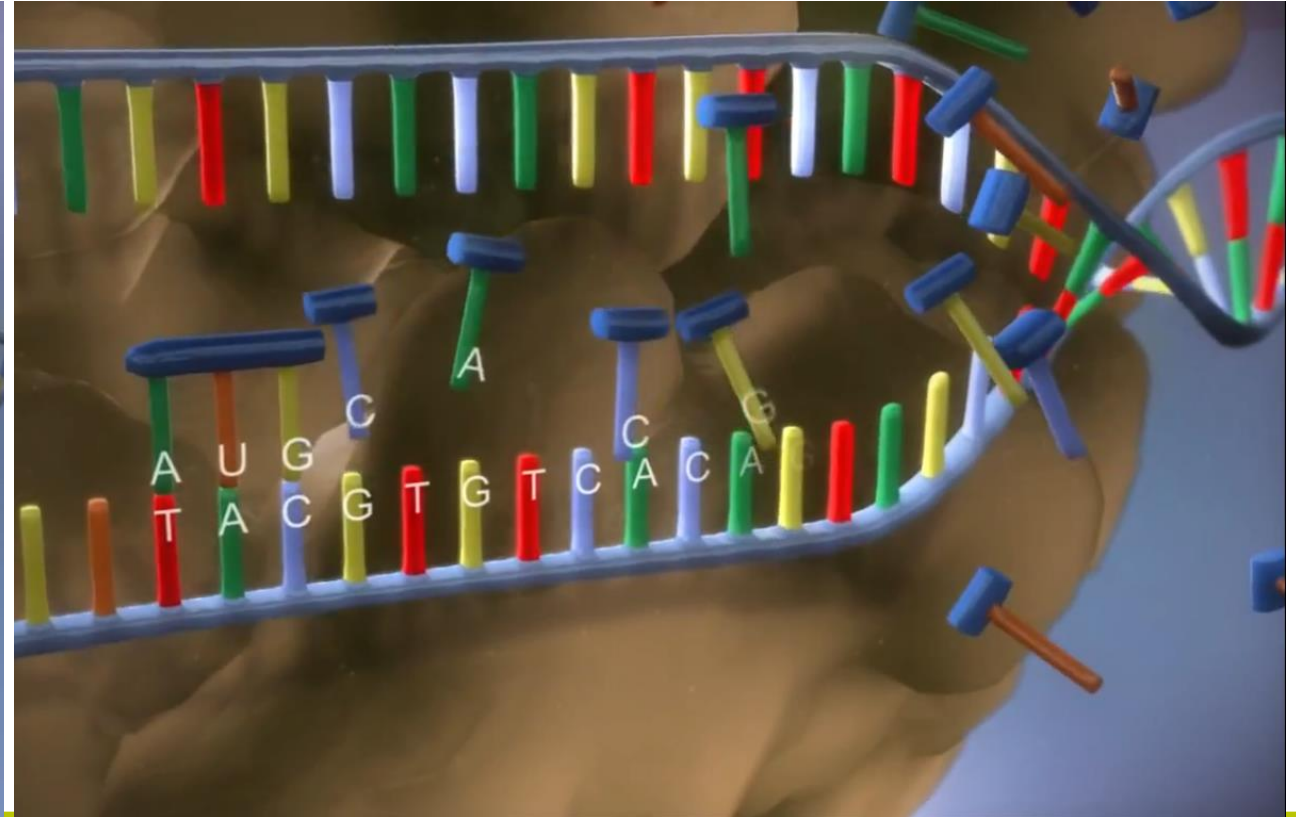
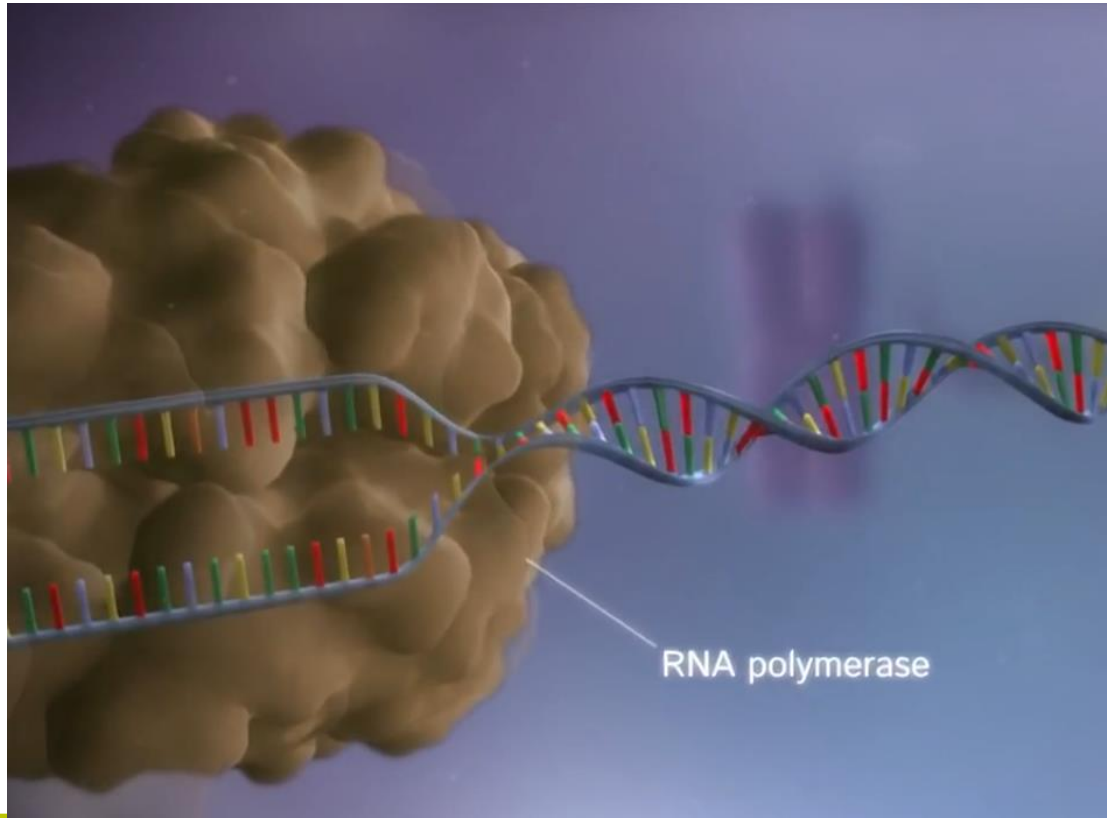
Таким образом, зная последовательность одной цепи ДНК, всегда можно «собрать» и вторую

Лишь 1% от трех миллиардов нуклеотидов генома человека непосредственно кодирует белки. Этот 1% кодирующих участков ДНК мы называем генами



The video: <https://dnalc.cshl.edu/resources/3d/09-how-much-dna-codes-for-protein.html>

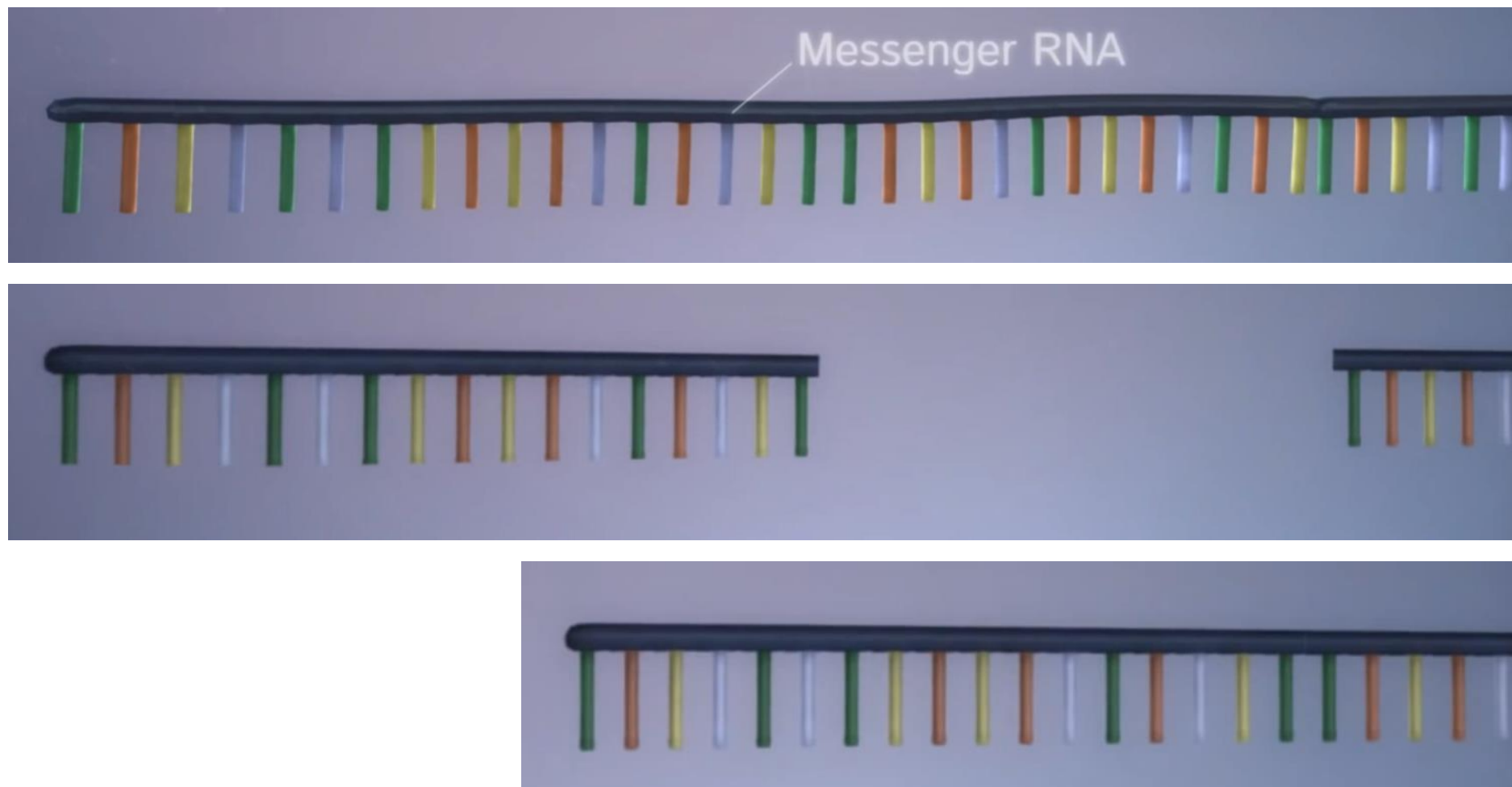
Информация о первичной структуре белковой молекулы кодируется точным порядком следования нуклеотидов в гене. Один ген – один белок.



ДНК располагается в ядре, а синтез белковой молекулы происходит в цитоплазме. Информация о структуре синтезируемого белка должна быть «доставлена» из ядра в цитоплазму специальной молекулой – информационной РНК (иРНК).

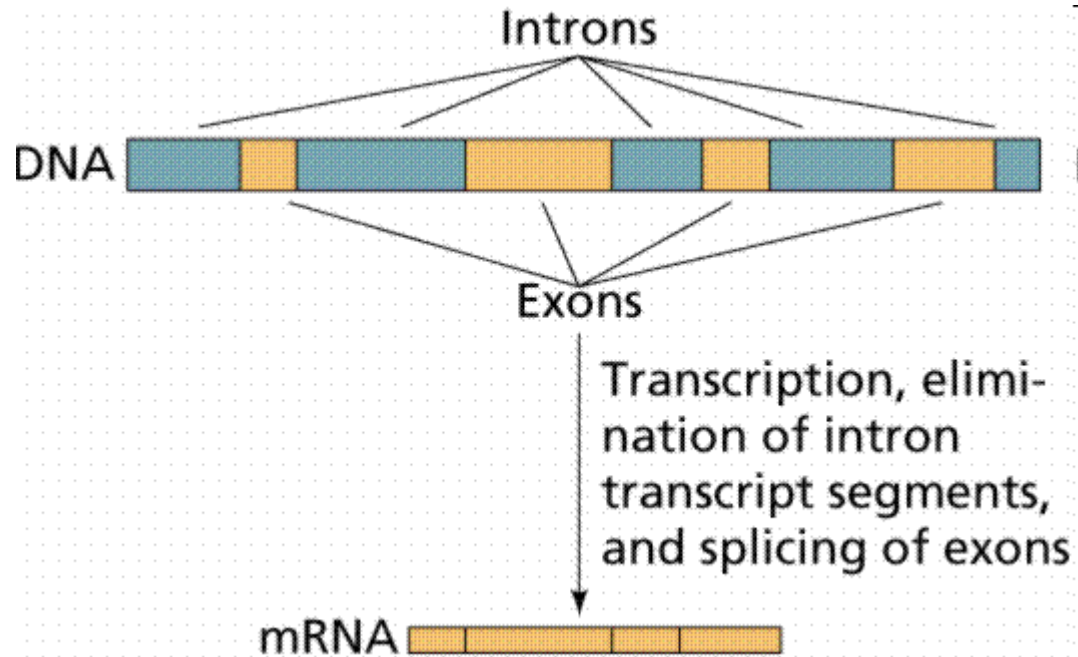
Процесс называется транскрипцией.

Процессинг иРНК. Что такое интрон и экзон гена?



The video: <https://www.yourgenome.org/video/from-dna-to-protein>

Процессинг иРНК. Что такое интрон и экзон гена?

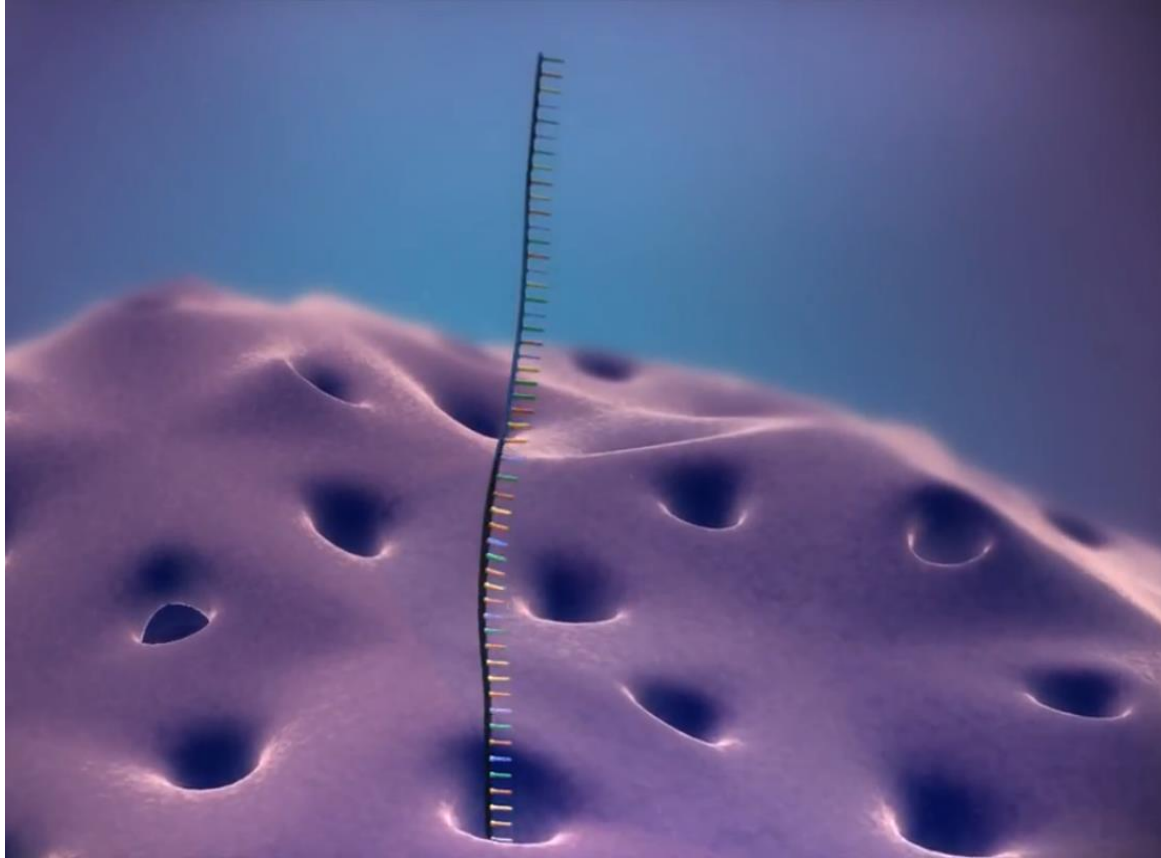


Биологическое значение процессинга иРНК - получение различных комбинаций экзонов гена, а значит, получения большего разнообразия белков, кодируемых одной нуклеотидной последовательностью ДНК

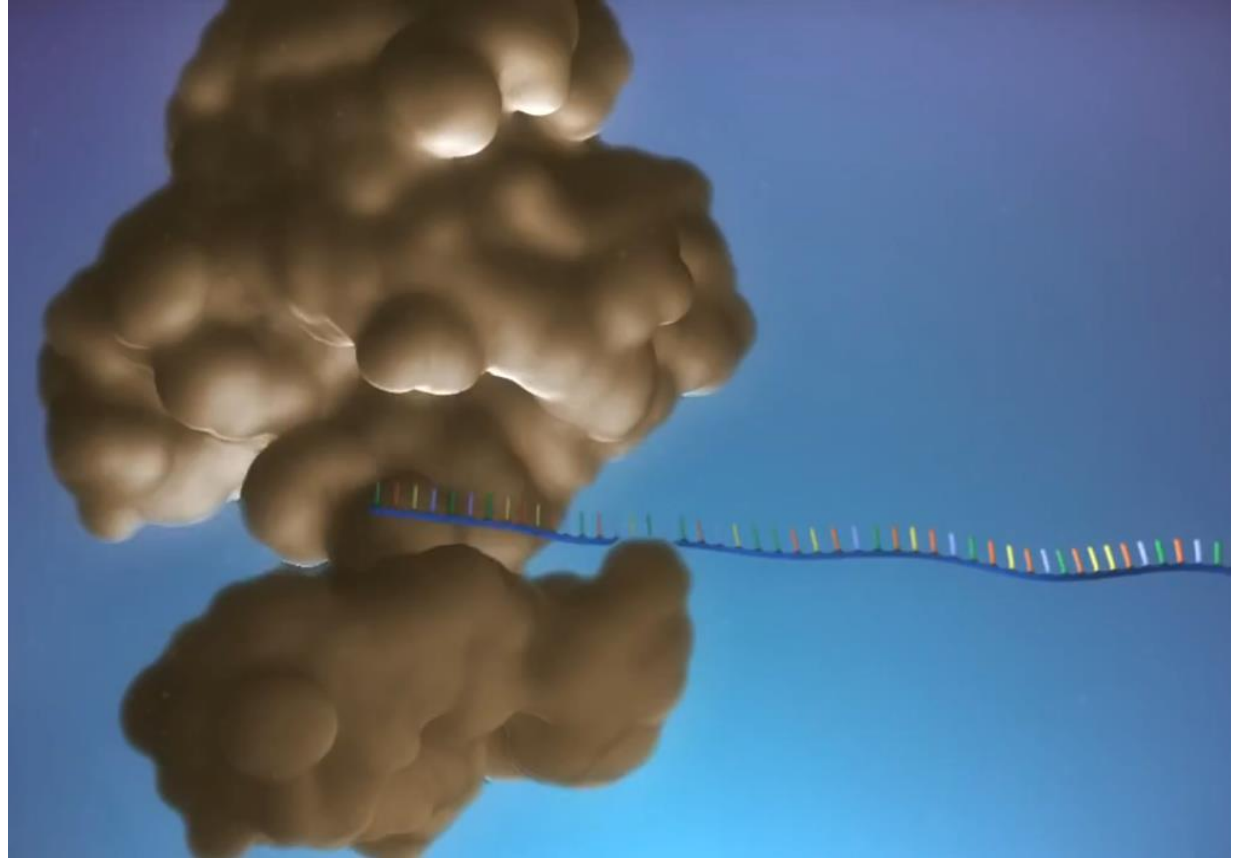
У человека 94 % генов подвержено альтернативному сплайсингу

В ходе сплайсинга из мРНК участки, не кодирующие белок (интроны) удаляются, а экзоны - участки, кодирующие аминокислотную последовательность, соединяются друг с другом, и незрелая пре-мРНК превращается в зрелую мРНК, с которой синтезируются (транслируются) белки клетки.

Рибосомы, на которых происходит синтез полипептида, располагаются в цитоплазме клетки

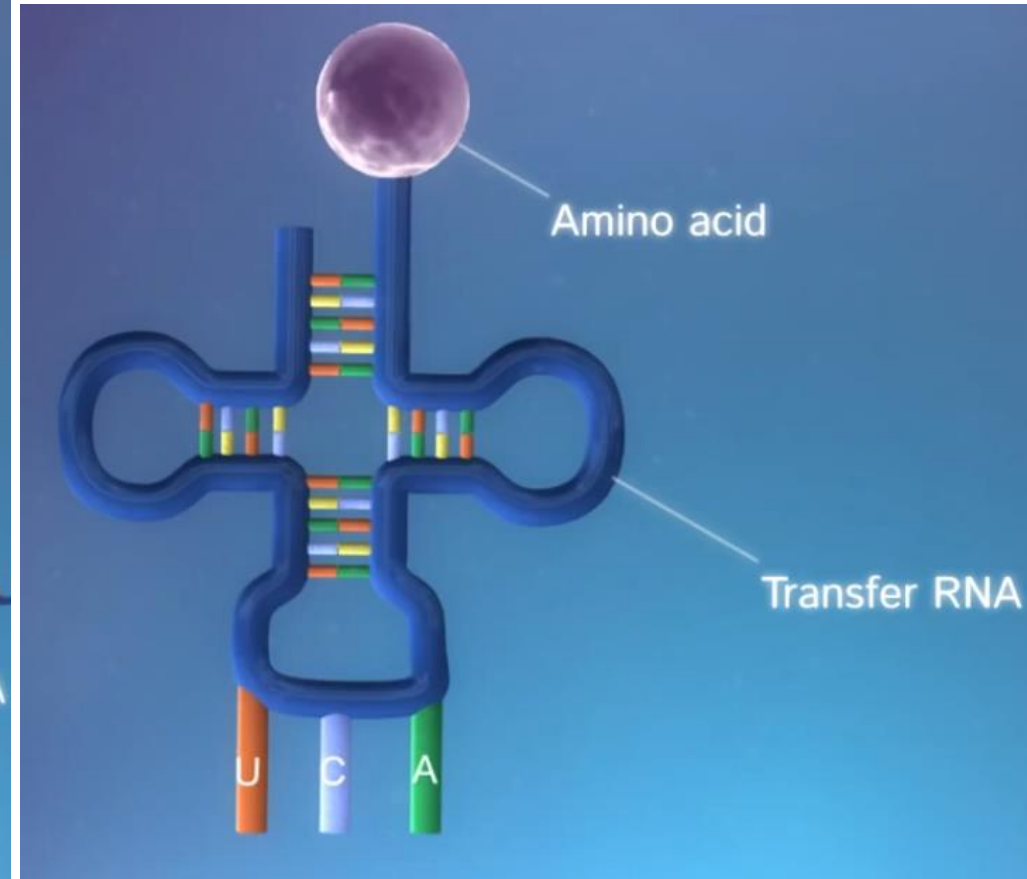
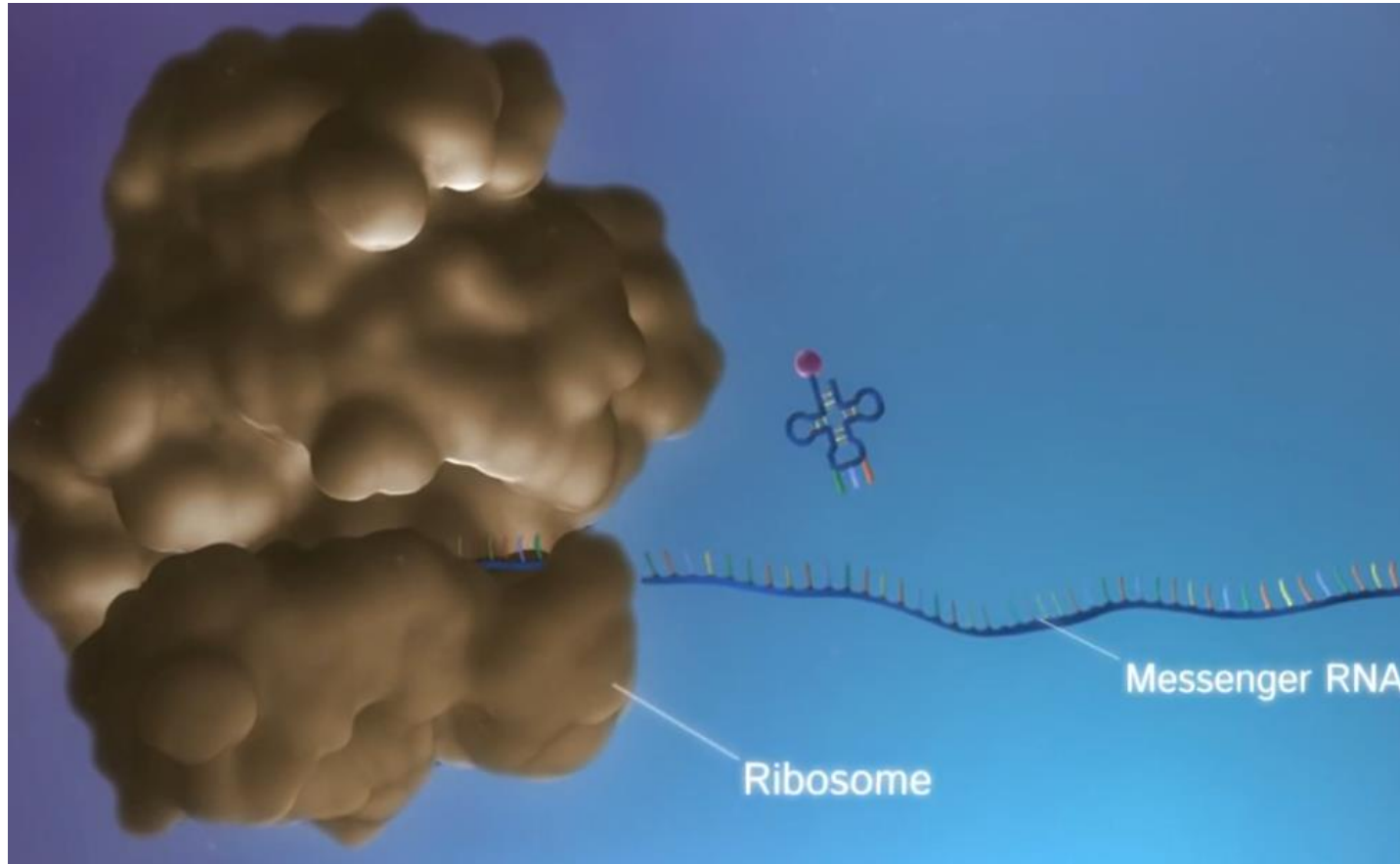


иРНК перемещается из ядра в цитоплазму через ядерную пору



В цитоплазме рибосомы прикрепляются к «прибывшей» из ядра иРНК

Рибосома считывает код с информационной РНК, синтезируя полипептид.
Процесс называется трансляцией.

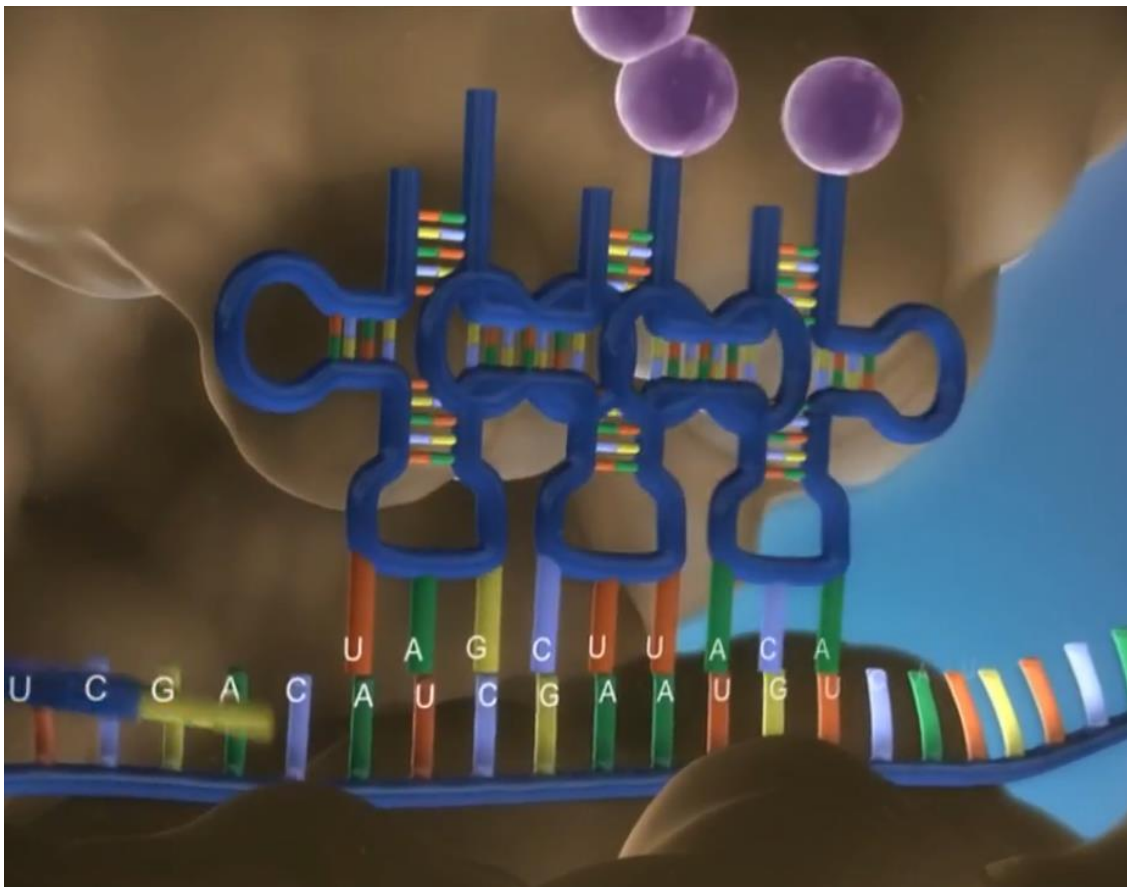


Транспортная РНК (тРНК) доставляет аминокислоты к рибосоме.
В каждой тРНК имеется строгое соответствие между антикодоном (3 нуклеотида в особой части молекулы) и аминокислотой, которую доставляет эта тРНК

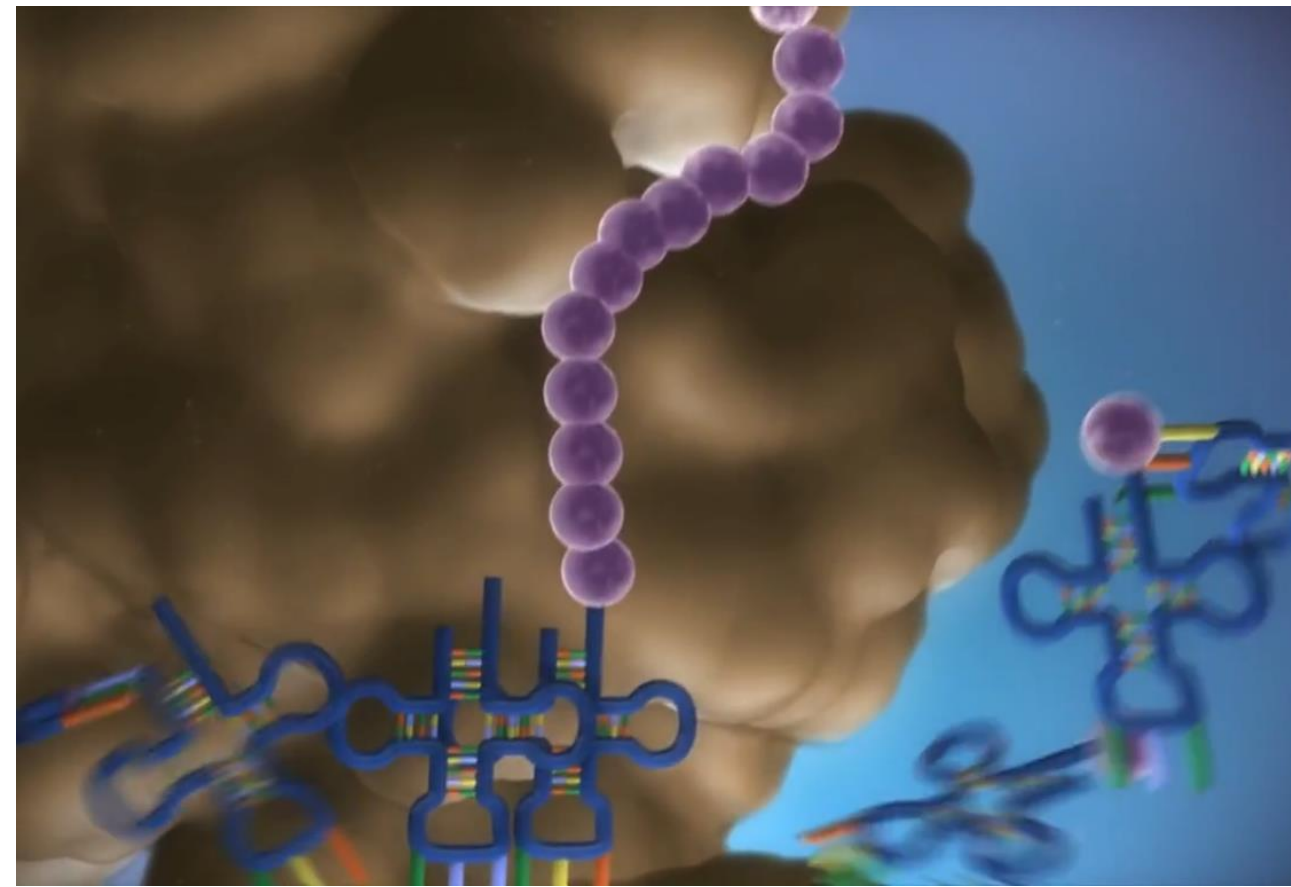
The video: <https://www.yourgenome.org/video/from-dna-to-protein>

Рибосома считывает код с информационной РНК, синтезируя полипептид.
Процесс называется трансляцией.

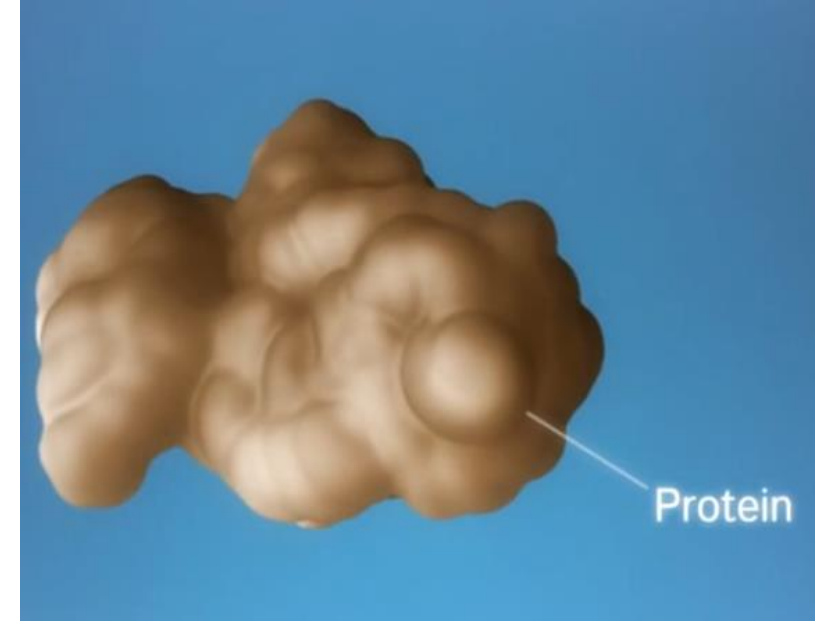
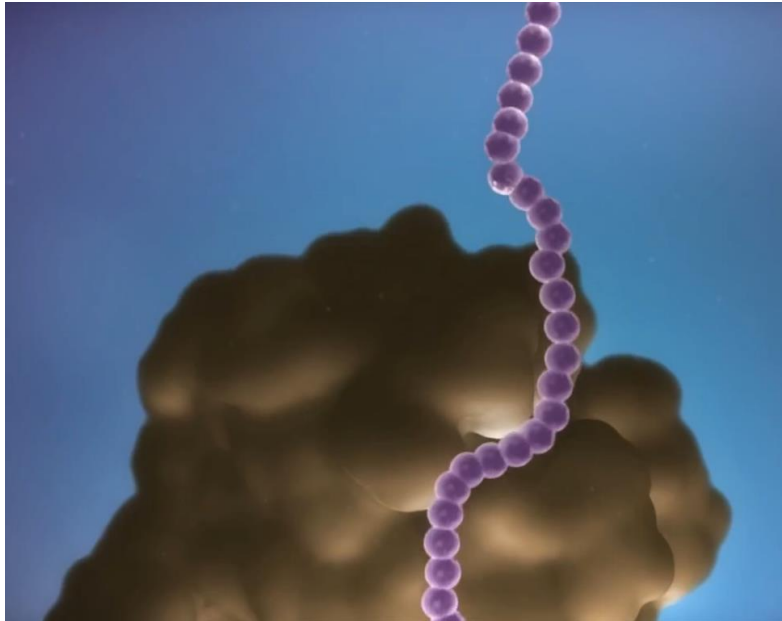
Информация с иРНК считывается сразу с трех нуклеотидов (триплетов)



Для каждого прочитанного триплета тРНК доставляет соответствующую аминокислоту, добавляя ее к растущей полипептидной цепи



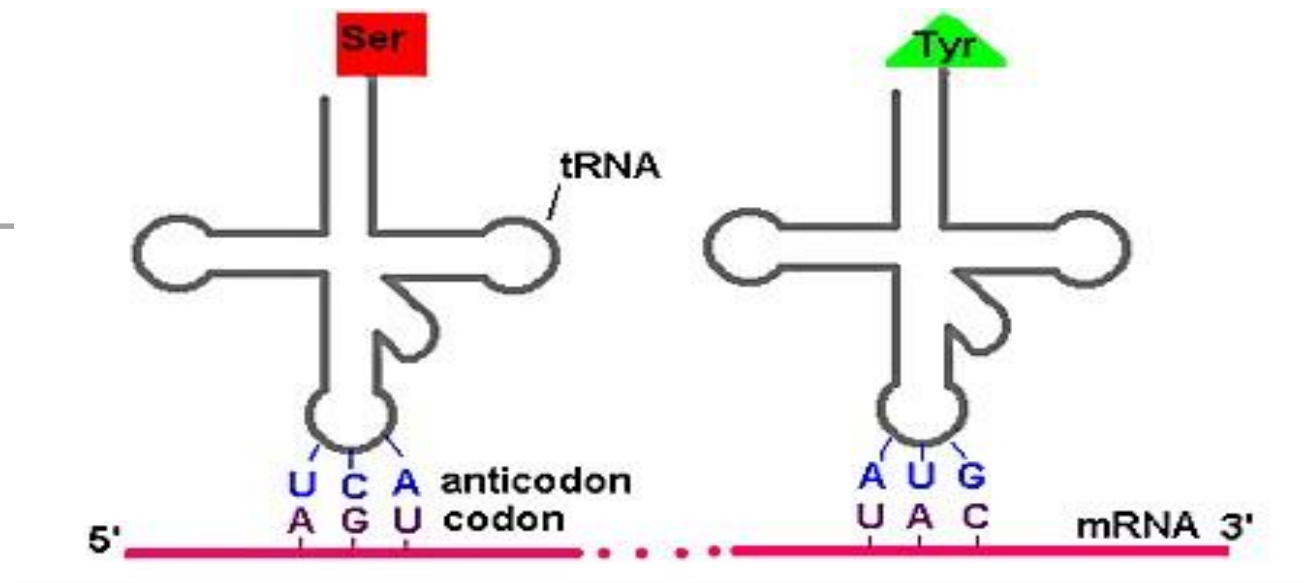
Как только последняя аминокислота добавлена, полипептидная цепь последовательно «укладывается» во вторичную и третичную структуру, формируя белковую молекулу



The video: <https://www.yourgenome.org/video/from-dna-to-protein>

Генетический код и синтез полипептида

- Код формируется 64 комбинациями нуклеотидов
- В генетическом коде имеется 3 “стоп-кодона”
- Генетический код «вырожден» - многие аминокислоты закодированы несколькими комбинациями нуклеотидов



		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

The Genetic Code

Генетический код и синтез полипептида

Это фрагмент гена, кодирующего
бета-субъединицу гемоглобина:

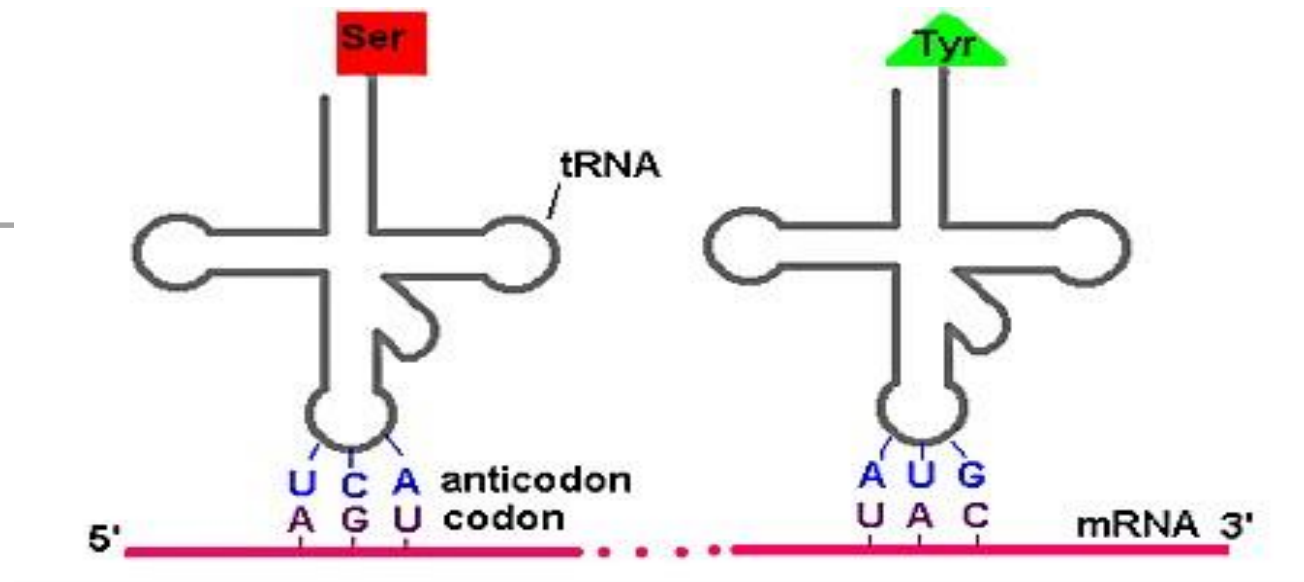
СТС АСТ ССС GAG GAA AAG

Последовательность
соответствующей иРНК:

CUC ACU CCC GAG GAA AAG

Каким будет полипептид,
синтезируемый на рибосоме,
прикрепившейся к такой иРНК?

Leu Thr Pro **Glu** Glu Lys



		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

The Genetic Code

Генетический код и синтез полипептида

Это фрагмент гена, кодирующего
бета-субъединицу гемоглобина:

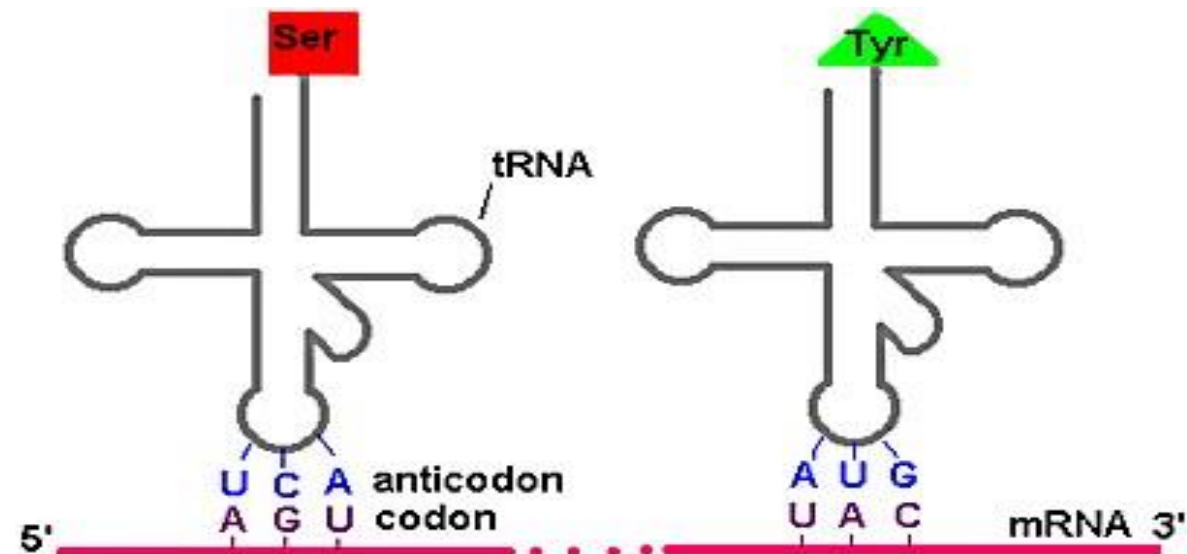
CTC ACT CCC GAG GAA AAG

Что произойдет, если заменить всего
один нуклеотид?

CTC ACT CCC GTG GAG AAG

Каким будет полипептид,
синтезируемый на рибосоме с такой
иРНК мутировавшего гена ?

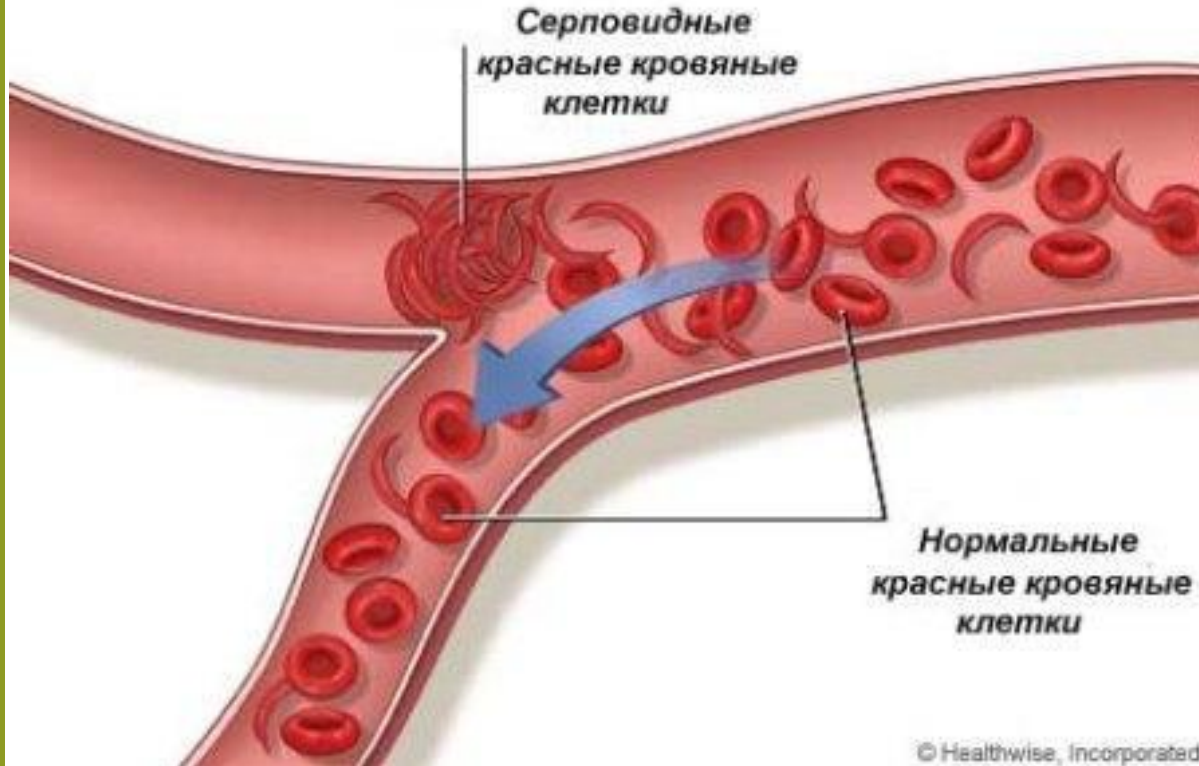
Leu Thr Pro Val Glu Lys



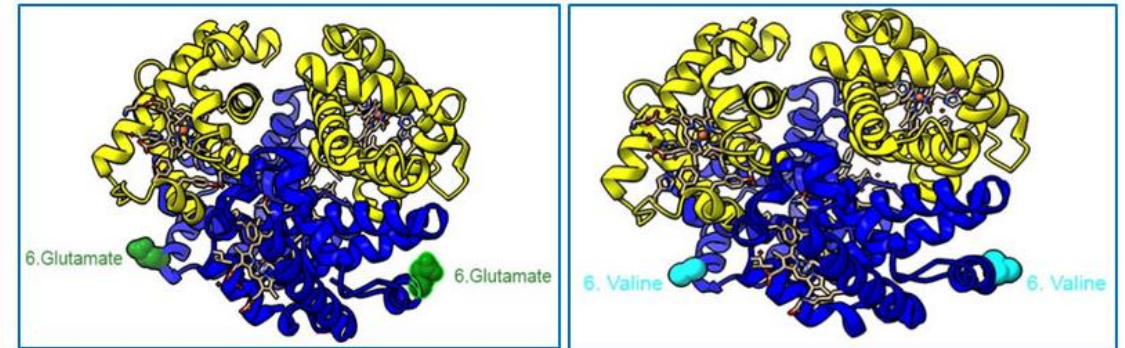
		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

The Genetic Code

Одиночная нуклеотидная замена (**Single Nucleotide Polymorphism, SNP**) в гене, кодирующем бета субъединицу гемоглобина, ведет к замене аминокислоты в кодируемом белке (Glu – Val)



... и, как следствие, к
серповидно-клеточной анемии



Normal Hemoglobin

Sickle Cell Hemoglobin



На этом примере обсудим термины «аллель» и «множественный аллелизм» с молекулярной точки зрения:

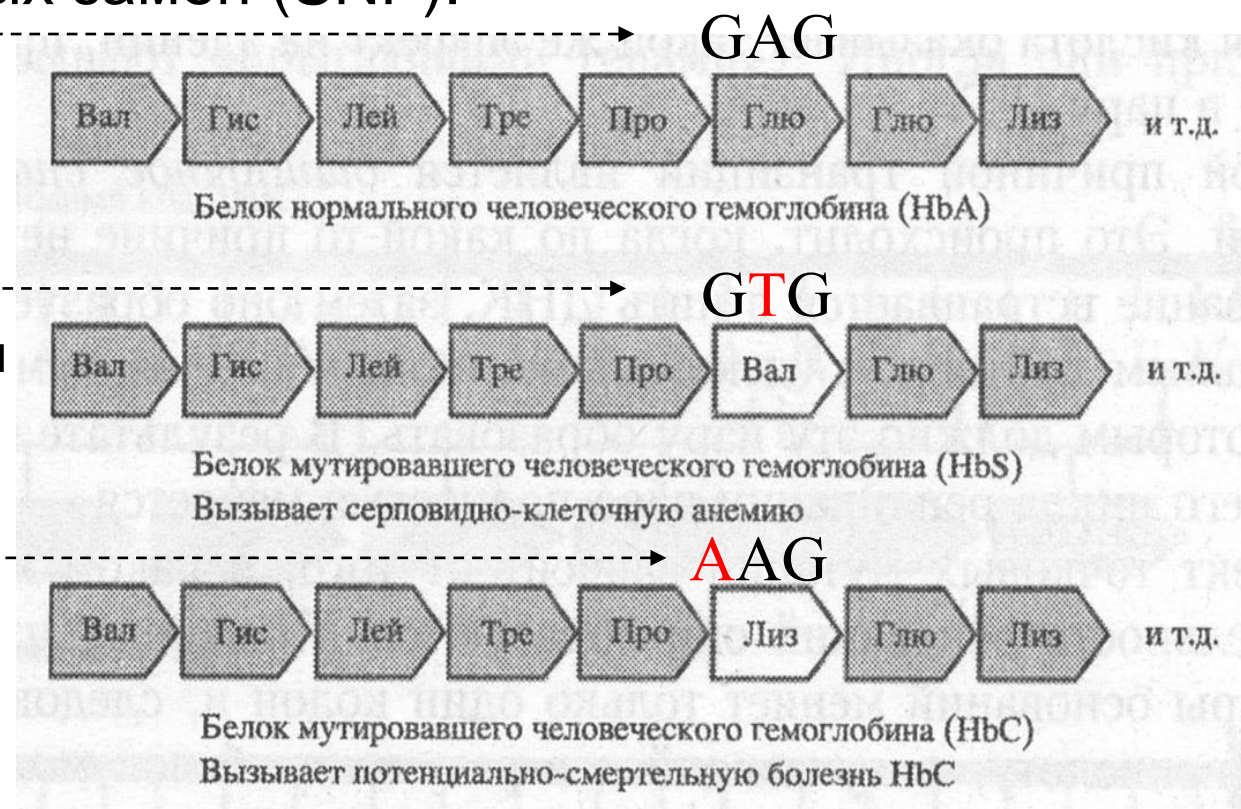
Ген, кодирующий бета субъединицу гемоглобина (*HBB*), имеет несколько структурных вариантов (аллелей), которые появились в результате одиночных нуклеотидных замен (SNP):

Аллель HbA – самый распространенный «нормальный» вариант

Аллель HbS – вызывает серповидно-клеточную анемию в гомозиготном состоянии

Аллель HbC – также вызывает серповидно-клеточную анемию, но при этом обеспечивает защиту от малярии

Несинонимичный SNP?



Известный «менделевский» признак морщинистых семян гороха – тоже следствие InDel

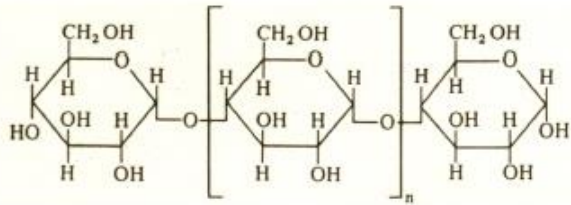


The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like **insertion** in a gene encoding starch-branching enzyme
(*Bhattacharyya et al, 1990*)

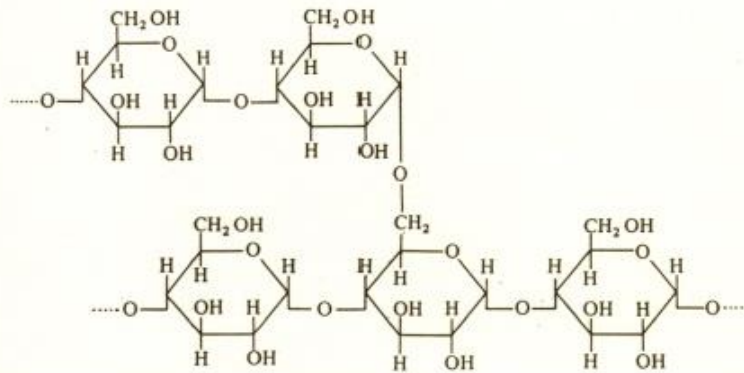


Ген «морщинистых семян» (R) кодирует фермент - starch-branching enzyme (SBE) - который катализирует одну из биохимических реакций синтеза крахмала

Amylose and Amylopectin differ in their branching



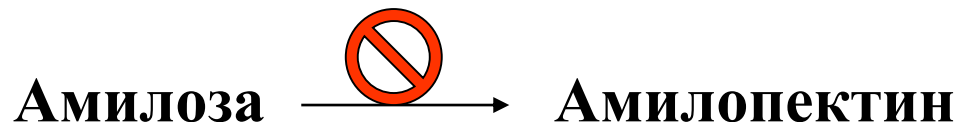
Amylose (Alpha-1,4 glucosidic linkage)



Amylopectin (Alpha-1,4 glucosidic linkage & Alpha-1,6 glucosidic linkage)

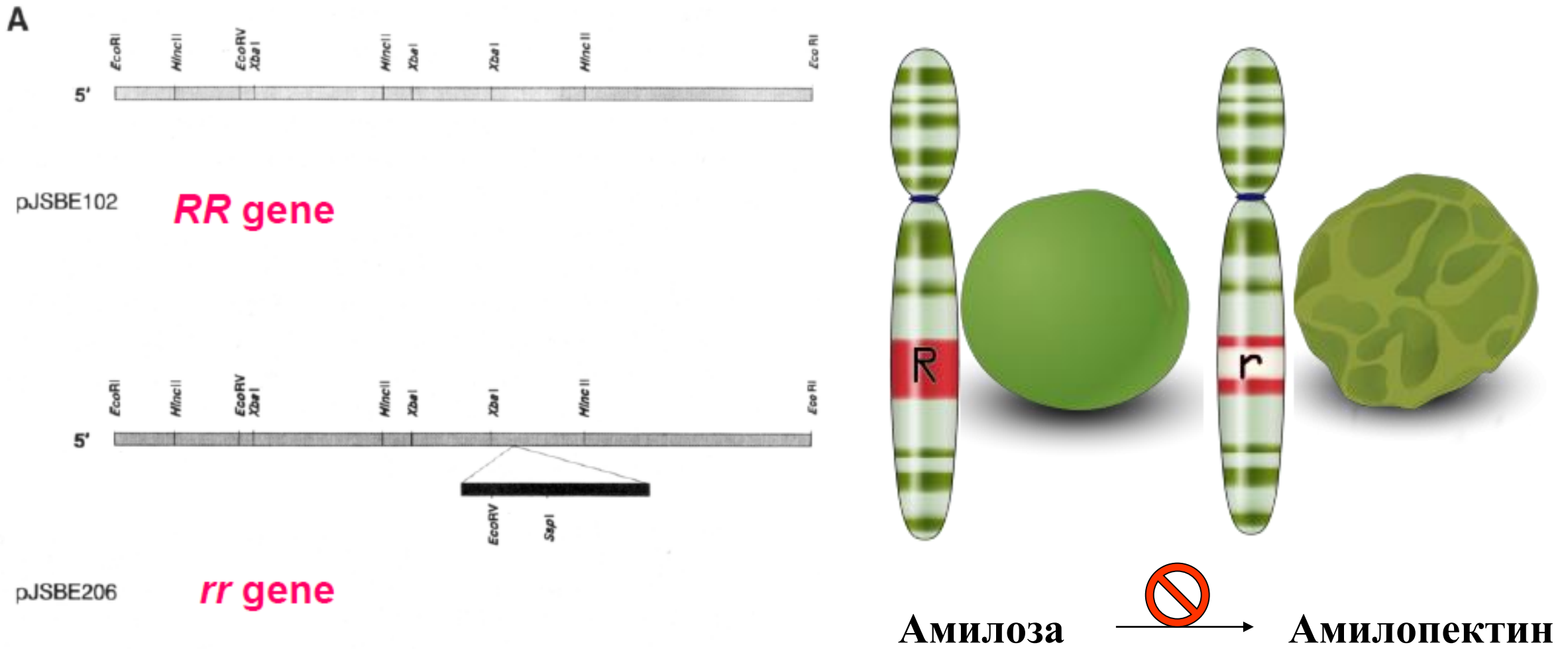
Во время синтеза крахмала в семенах гороха амилоза должна быть преобразована в амилопектин. Эта реакция катализируется ферментом SBE

Мутация (InDel) в гене R вызывает снижение активности фермента SBE. Потеря активности SBE приводит к уменьшению накопления крахмала и – «морщинистым семенам»!



Морщинистые семена?

Вставка (инсерция) в гене *R* (*rugosus*), кодирующем Starch-branching enzyme (SBE)



Bhattacharyya et al, 1990

— = 200 bp

Окраска венчика: вставка 8 нуклеотидов – мутация в гене *bHLH*, задействованном в биосинтезе антоциана. Приводит к образованию стоп-кодона и потере функции белка

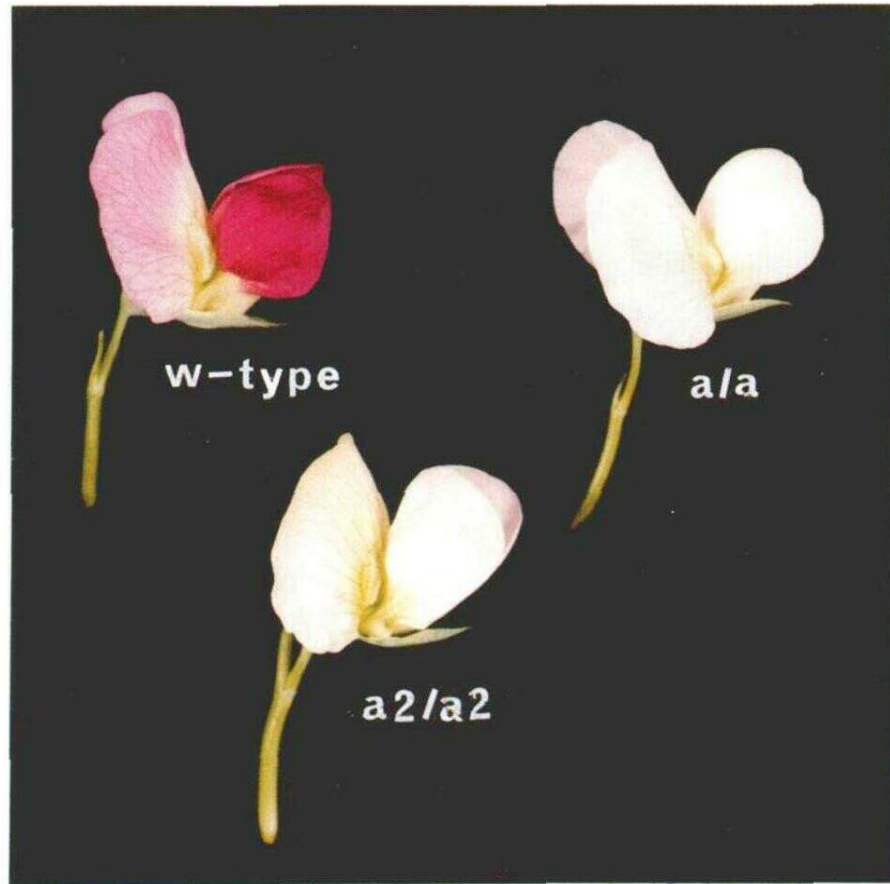
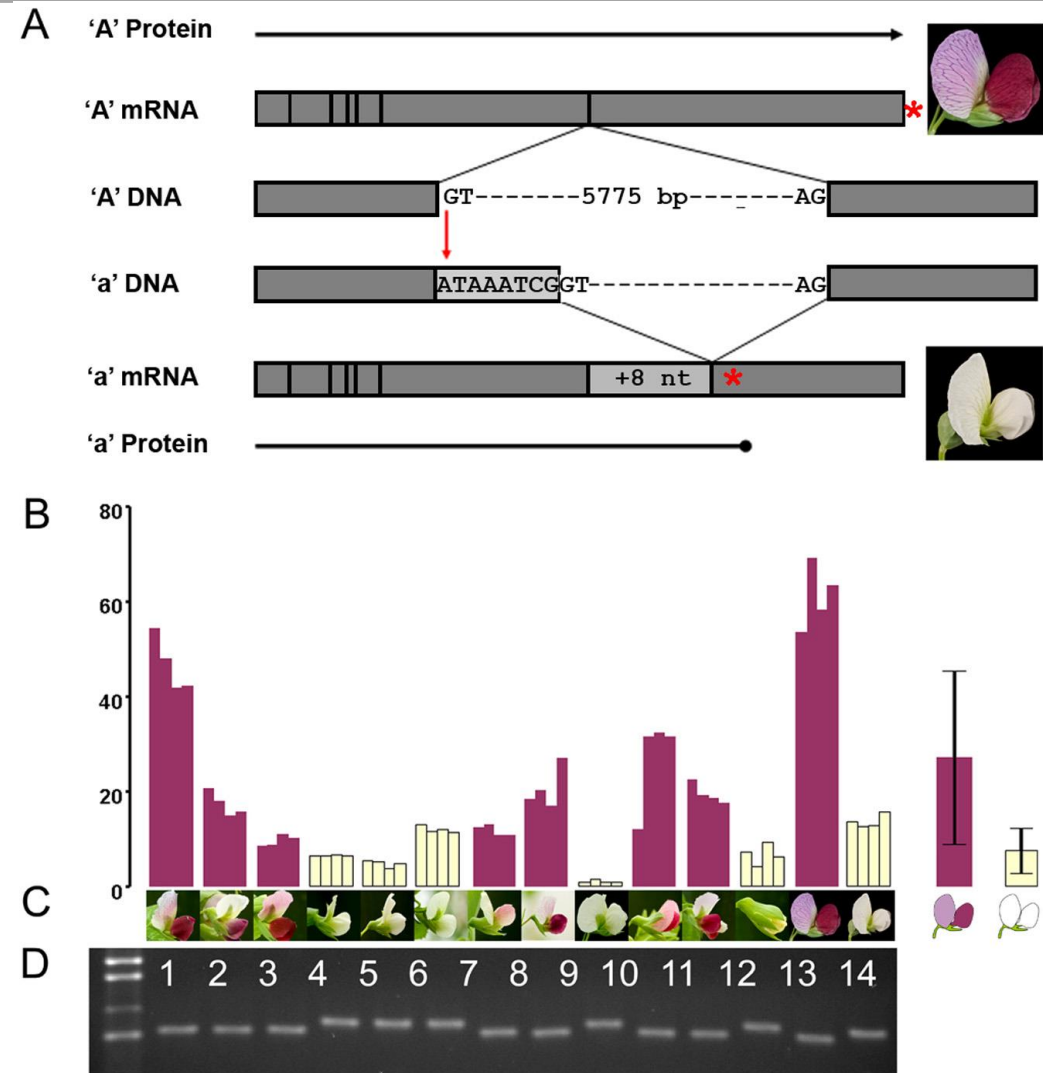


Figure 3. Phenotypes of Wild-Type (w-type), a Mutant (a/a), and a2 Mutant (a2/a2) Flowers.

Harker et al., 1990. The Plant Cell, Vol. 2, 185-194



Hellens et al., 2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013230>

Гены, отвечающие за изменчивость признаков, с которыми работал Мендель:

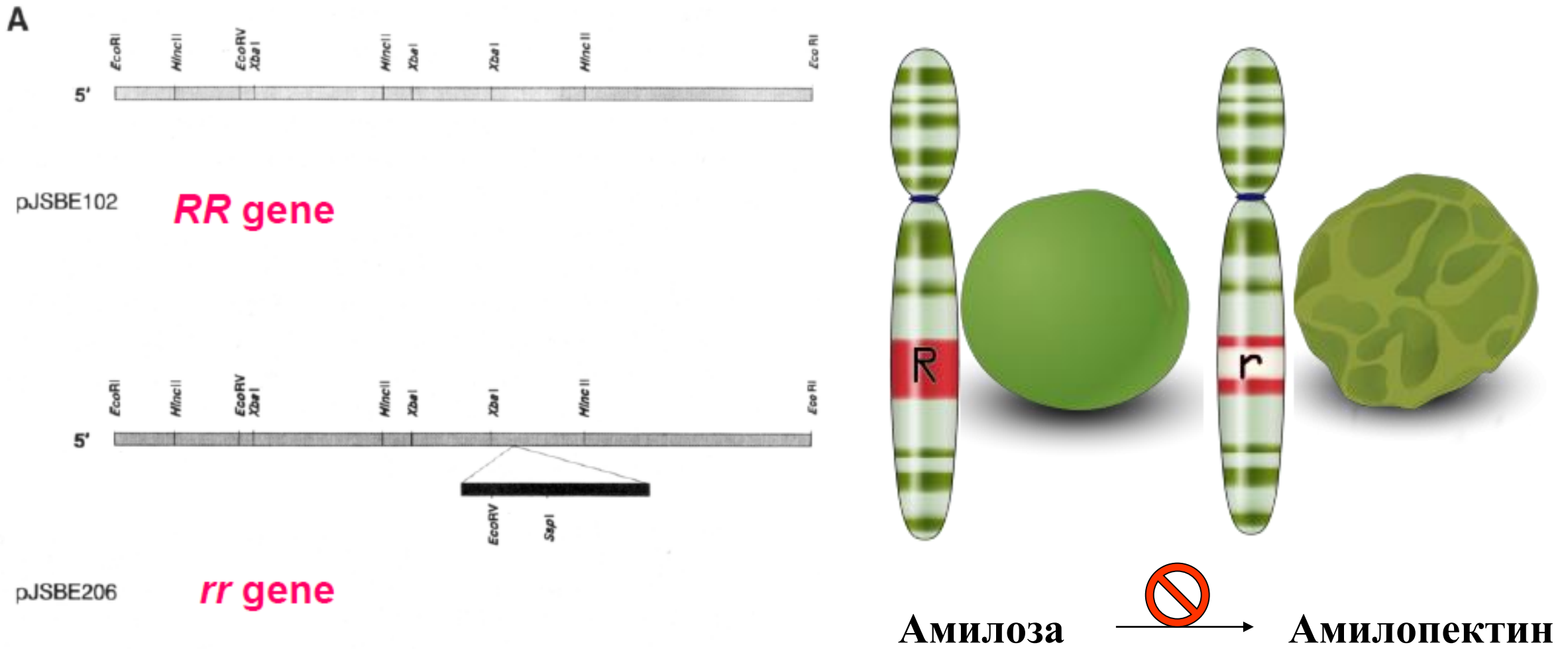
Table 1 Seven characters of *P. sativum* examined by Mendel and a summary of the genes, phenotypes, and presumed mutations involved

Trait	Dominant phenotype	Recessive phenotype	Symbol group	Linkage group	Cloned	Gene function	Molecular nature of mutation
Seed shape	Round	Wrinkled	<i>R</i>	V	Yes	Starch branching enzyme 1	0.8-kb insertion
Stem length	Tall	Dwarf	<i>LE</i>	III	Yes	GA 3-oxidase1	G-to-A substitution
Cotyledon color	Yellow	Green	<i>I</i>	I	Yes	Stay-green gene	6-bp insertion
Seed coat/flower color	Purple	White	<i>A</i>	II	Yes	bHLH transcription factor	G-to-A at splice site
Pod color	Green	Yellow	<i>GP</i>	V	No	Chloroplast structure in pod wall	Unknown
Pod form	Inflated	Constricted	<i>V?</i>	III	No	Sclerenchyma formation in pods	Unknown
Position of flowers	Axial	Terminal	<i>FA</i>	IV	No	Meristem function	Unknown

Reid and Ross, Genetics. 2011 Sep;189(1):3-10. doi: 10.1534/genetics.111.132118.

Морщинистые семена?

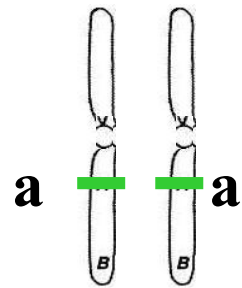
Вставка (инсерция) в гене *R* (*rugosus*), кодирующем Starch-branching enzyme (SBE)



Bhattacharyya et al, 1990

— = 200 bp

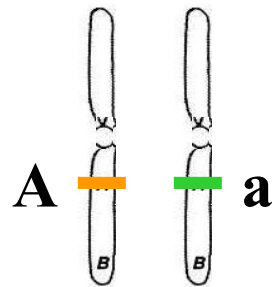
Аллели, гомозиготные и гетерозиготные генотипы



aa

Гомозиготный
организм по признаку окраски семени

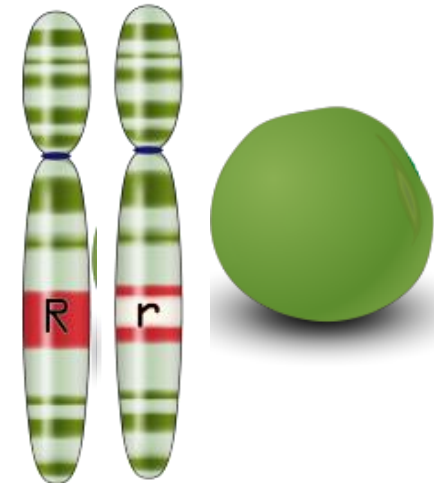
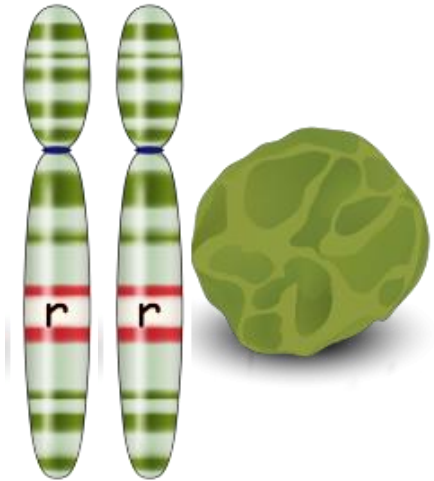
*У которого присутствуют два
одинаковых аллеля одного гена*



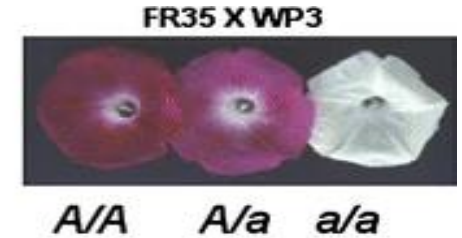
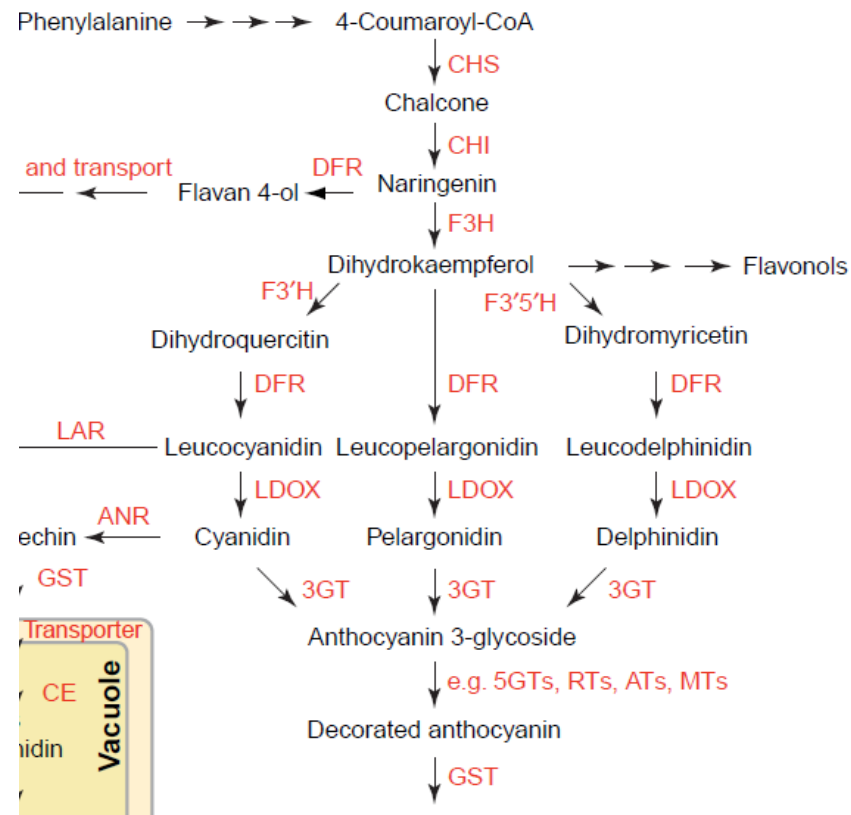
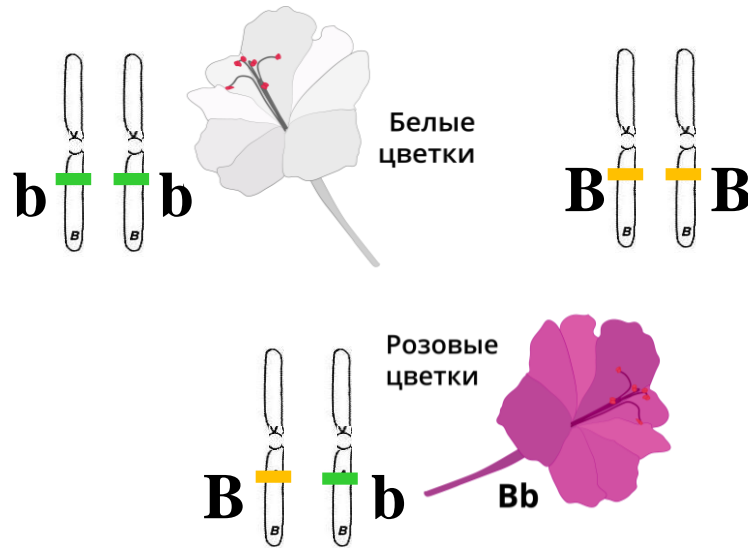
Aa

Гетерозиготный
организм по признаку окраски семени

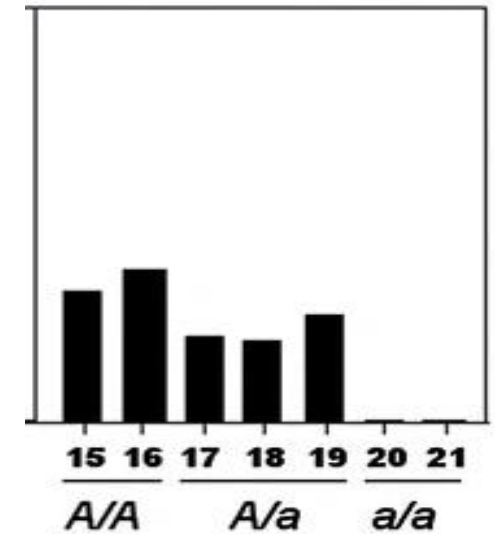
*У которого присутствуют разные
аллели одного гена*



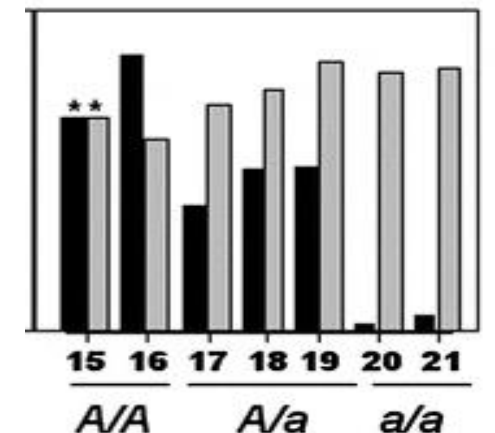
Неполное доминирование: «доза гена»



Anthocyanin content



CHS-D transcript levels



Неполное доминирование у *Ipomoea* объясняется пониженной экспрессией гена *CHS-D* (chalcone synthase) из-за вставки транспозона *Tip100* во втором интроне гена.