

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Державна установа «Центральний методичний кабінет
з вищої медичної освіти міністерства охорони здоров'я України»
ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ
«УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ»

**Дубінін С. І., Пілюгін В.О., Ваценко А.В.,
Улановська-Циба Н.А., Передерій Н.О.**

Сучасні проблеми молекулярної біології

**Підручник для студентів ВНМЗ України
III-IV рівнів акредитації**

Полтава - 2016

ББК 28.0:5я7

УДК 577:61 (075.8)

Затверджено Міністерством охорони здоров'я України як підручник для студентів вищих навчальних закладів МОЗ України (протокол засідання Комісії для організації підготовки навчальної та навчально-методичної літератури для осіб, які навчаються у вищих медичних (фармацевтичному) навчальних закладах та закладах післядипломної освіти МОЗ України від 16 грудня 2015 р. №4).

А в т о р и : Дубінін Сергій Іванович

Ваценко Анжела Володимирівна

Пілюгін Валентин Олексійович

Улановська-Циба Наталія Аркадіївна

Передерій Ніна Олександрівна

Р е ц е н з е н т и :

Бажора Юрій Іванович - завідувач кафедри клінічної імунології, генетики і медичної біології (опорної) Одеського державного медичного університету, лауреат Державної премії, доктор медичних наук, професор;

Пішак Василь Павлович - завідувач кафедри медичної біології, генетики та гістології Буковинського державного медичного університету, член-кореспондент АПН України, лауреат Державної премії, доктор медичних наук, професор;

Федонюк Лариса Ярославівна - завідувач кафедри медичної біології Тернопільського державного медичного університету, доктор медичних наук, професор;

Підручник «Сучасні проблеми молекулярної біології» створений відповідно Програми. У підручнику викладено основи молекулярної біології: основні напрямлення вивчення біомолекул (нуклеїнових кислот та білків), структура генів та геномів про- і еукаріот, вірусів, мітохондрій, рухливих генетичних сегментів, а також пошкоджень (мутацій) на молекулярному рівні, механізмів репарації, генетичної рекомбінації, етапів експресії генів та основних молекулярно-генетичних процесів. Також викладені сучасні методи дослідження нуклеїнових кислот, ПЛР, методи ДНК-діагностики, створення рекомбінантних ДНК та трансгенних організмів. Показані сучасні перспективи створення рекомбінантних лікарських препаратів, генних вакцин, генної терапії і терапевтичного клонування.

Матеріал підручника надасть студентам біологічних, медичних, фармацевтичних факультетів ВНЗ 3-4 рівнів акредитації знання з теоретичних основ молекулярної біології та покаже напрямки перспективних досліджень у практиці, зокрема в медицині. Може бути корисним для викладачів коледжей та інших навчальних закладів, а також практичних лікарів.

ISBN

© Дубінін С. І., Пілюгін В.О., Ваценко А.В.,

Улановська-Циба Н.А., Передерій Н.О.

Молекулярні основи спадковості. Введення в молекулярну біологію.

Практичне значення молекулярної біології. Сучасні найважливіші досягнення біотехнології, перспективи її використання в клінічній медицині. Поняття про молекулярну медицину і нанобіотехнологію.

Предмет молекулярної біології.

Молекулярна біологія в сучасному розумінні пояснює феномен життя на молекулярно-генетичному рівні.

В центрі уваги молекулярних біологів постали:

1) нуклеїнові кислоти, серед яких найбільше значення має ДНК, в якій знаходяться функціонально-активні ділянки – гени;

2) білки, активність яких забезпечує життя на молекулярному рівні. Згідно одному з визначень молекулярної біології, ця дисципліна характеризує структуру, функції і взаємозв'язок між цими типами макромолекул.

Про предмет вивчення молекулярної біології є суперечливі думки. Ф.Крік з гумором говорив, що почав застосовувати даний термін, коли йому набридло пояснювати, хто він за професією, вивчаючи питання кристалографії, біохімії, біофізики і генетики. Термін вперше був використаний У.Астбері в 1946 р. Під цим поняттям нині пропонують об'єднати розділи біохімії, біофізики і генетики, які присвячені вивченню молекулярних механізмів, найважливіших загально-біологічних явищ на межі вивчення з іншими науками (мікробіологія, біофізика і генетика), що привели до створення єдиної синтетичної галузі знань.

За своїми завданнями молекулярна біологія наближена до біохімії, відрізняючись від останньої лише методами, об'єктами і результатами дослідження. У зв'язку з цим в науковому світі ставлять різні акценти при висвітленні проблем в залежності від базового напрямку науки, до якого належить дослідник і предмет вивчення. З відкриттям ролі ДНК в спадковості настала ера молекулярної біології (О.С.Спірін, 1997).

Основні етапи розвитку молекулярної біології і молекулярної генетики, їх взаємозв'язок з класичною генетикою.

Історія молекулярної біології починається з 1930-х років при об'єднанні окремих біологічних дисциплін: біохімії, генетики, мікробіології і вірусології тощо. Назву цієї науки найчастіше пов'язують з ім'ям У.Астбері, який в 1939 р. назвав себе «молекулярним біологом». Через два роки він отримав першу рентгенограму ДНК, і тим самим поклав початок вивченню тонкої структури «найголовнішої молекули», яка вперше була виявлена Ф.Мішером у 1869 р. Перша офіційна згадка про молекулярну біологію належить У.Уївері, який керував відділом природничих наук Рокфеллерівського фонду і інтегрував зусилля біологів, хіміків і фізиків в області вивчення об'єктів живої природи як виникнення нового напрямку сучасної біології.

Після того, як у 1910-х роках закони Менделя отримали широке визнання в наукових колах, а в 1920-х роках розвиток атомної теорії призвів до розробки принципів квантової механіки, здавалося, що наука впритул підійшла до відкриття молекулярного фундаменту феномену життя. У.Уївер від імені Фонду Рокфеллера підтримував і фінансував дослідження на межі біології, хімії і фізики. І навіть такі видатні науковці, як Нільс Бор і Ервін Шредінгер, намагалися підвести під біологію теоретичну базу так, як вони це робили в теоретичній фізиці.

Проте у 1930-х - 1940-х роках було не зрозуміло, які саме дослідження призведуть до поставленої мети, і яким буде її кінцевий результат. Зокрема проводилися дослідження в колоїдній хімії, біофізиці, радіобіології і кристалографії.

Розробка тонких фізичних і хімічних методів аналізу структури і функцій молекул, властивих всім живим системам і перш за все клітинам як елементарним і універсальним

одинацям життя, мала вирішальне значення для народження молекулярної біології. Могутнім стимулом для її розвитку стали успіхи і невирішені проблеми біохімії, цитології і генетики. Саме ці біологічні науки, які сформувалися у середині ХХ ст., створили фундамент для молекулярної біології.

Центром молекулярно-біологічних досліджень стали роботи в області вивчення матеріальних основ спадковості, природи генів і механізмів передачі спадкових ознак із покоління в покоління.

Під впливом генетиків нової формації (Т.Моргана, М.К.Кольцова, М.В.Тимофєєва-Ресовського і ін.) фізики-теоретики і експериментатори, які емігрували з Європи до США, організували так звану «фагову групу» на чолі з М.Дельбрюком, яка розпочала дослідження в області молекулярної будови і мутагенезу вірусів і бактеріофагів. Пізніше ці роботи були істотно розвинуті Б.Ф.Поглазовим, Н.А.Кисельовим і іншими вченими. В.А.Енгельгардт спільно з М.Н.Любимовою обґрунтували молекулярні механізми м'язового скорочення, А. Н. Белозерський вперше виділив ДНК з рослин, що стало фундаментальними етапами становлення молекулярної біології.

На початку 50-х років ХХ ст. в біохімії були отримані фундаментальні дані про елементарну будову білків і нуклеїнових кислот, включаючи способи організації поліпептидних ланцюгів білків, і, що особливо важливо, про структуру нуклеотидів і закономірності їх кількісного вмісту в молекулах ДНК і РНК (Е.Чаргафф). Саме вказані роботи, а також біофізичні дослідження структури ДНК, виконані в Англії методом рентгеноструктурного аналізу Розаліндою Франклін і Морісом Уїлкінсом, впритул підвели вихованця «фагової групи» Джеймса Уотсона і англійського фізика Френсіса Кріка до розкриття молекулярної природи генів і механізму їх відтворення (реплікації) у складі ДНК.

Створення моделі подвійної спіралі ДНК і відкриття принципу комплементарності стали найважливішою подією сучасної біології, розкривши фундаментальні принципи функціонування живих систем, що визначило подальші напрямки досліджень в сучасній біології. Сучасне природодослідництво зобов'язане саме молекулярній біології тим, що в період з середини 50-х до середини 70-х років ХХ ст. з неймовірною швидкістю були розкриті природа і основні шляхи передачі та реалізації генетичної інформації.

У 1940 р. Джордж Бідл і Едуард Тейтем показали факт існування зв'язку між генами і білками, пов'язавши генетику з біохімією. Вони запропонували генетикам замість дрозофіли використовувати як модельний організм грибок нейроспору. Використання широкого спектру модельних організмів було надзвичайно важливим для появи нової дисципліни.

У 1944 р. Освальд Евері, який працював у Рокфеллерівському університеті з бактеріями, довів, що гени складаються з ДНК. У 1952 р. Алфред Херши і Марта Чейз підтвердили, що генетичний матеріал бактеріофага теж складається з ДНК. У 1953 р. Джеймс Уотсон і Френсіс Крік запропонували дволанцюгову структуру молекули ДНК. Їх структурна модель дозволила пояснити багато фундаментальних біологічних феноменів, таких як існування дуже великих біологічних молекул, спосіб збереження і точне копіювання інформації, можливість зміни структури генів в еволюції і ін., внаслідок чого молекулярна біологія вивела свої основні принципи.

У 1961 р. Франсуа Жакоб і Жак Моно припустили, що між ДНК і білком має бути посередник, якого вони назвали інформаційною РНК. У 1961-1965 рр. з розшифровкою генетичного коду стало зрозумілим, як інформація, що зберігається на ДНК, визначає структуру білка, і які саме поєднання нуклеотидів в структурі ДНК відповідають певним амінокислотам білка. На початку 1960-х років Жакоб і Моно показали, як білок може регулювати транскрипцію та експресію генів.

Головні відкриття в молекулярній біології були зроблені впродовж наступної чверті століття. Потім на їх основі були розроблені нові складні технології, які зараз в сукупності

називають генною інженерією. Генна інженерія дозволила виділяти і вивчати окремі гени, зокрема і високоорганізованих живих організмів, включаючи людину.

Народження молекулярної біології стало кульмінацією тривалого процесу, який почався з перших спостережень, зроблених під мікроскопом. З кінця XVIII ст. велика увага приділялася опису особливостей хімічних молекул в живих організмах. Так в працях видатного хіміка Юстуса Лібіха, народилася фізіологічна хімія, попередниця сучасної біохімії, яка зобов'язана своїм народженням Едуарду Бухнеру. Проте між молекулами, які вивчали хіміки, і тонкими структурами, помітними під мікроскопом, наприклад, хромосомами, була область незвіданого, «світ втрачених вимірів», так його називав видатний фізик-хімік Вольфганг Освальд. Цей світ населяли колоїди, хімічні сполуки, структура і властивості яких залишалися нез'ясованими.

Успіх молекулярних біологів в дослідженні цього невідомого світу забезпечила поява нових методів фізики і хімії: рентгеноструктурний аналіз, електронна мікроскопія, ультрацентрифугування, електрофорез.

Поворотним пунктом в цьому процесі стала робота Лайнуса Полінга (1949 р.), в якій вперше хвороба людини, серпоподібно-клітинна анемія, була пов'язана з мутацією в молекулі гемоглобіну.

При народженні молекулярної біології відбулася зустріч двох дисциплін, які переживали в першій половині ХХ століття період бурхливого розвитку: біохімії і генетики. Біохіміки вивчали структуру і функції молекул, з яких складається жива матерія. У період 1900-1940 рр. описані центральні процеси метаболізму: травлення і засвоєння поживних речовин, зокрема, вуглеводів. Кожен з елементарних хімічних процесів, з яких складається метаболізм, каталізується ферментом. Ферменти – це білки, тому вивчення структури і функцій білків стало одним з найважливіших завдань біохімії.

Генетики, завдяки використанню Томасом Морганом плодової мушки дрозофіли, підтвердили закони Менделя і відкрили нові факти і закономірності при взаємодії генів. Морган показав, що гени локалізовані в хромосомах, проте, хімічна природа генів і молекулярні механізми їх дії залишалися для нього загадкою.

У 1869 р. Йоган Фрідріх Мішер відкрив речовину, яку назвав нуклеїном. У 1919 р. у Рокфеллерівському інституті був проведений хімічний аналіз нуклеїнової кислоти, у складі якої були ідентифіковані чотири азотисті основи, цукор і фосфат, сполучені між собою ковалентними зв'язками в порядку фосфат-сахар-основа. Кожна з цих одиниць отримала назву нуклеотид. Передбачалося, що чотири нуклеотиди сполучені між собою в короткі ланцюги однакової структури, і тільки у 1934 р. Торб'єрн Касперссон і Ейнар Хаммерстен показали, що ДНК – це полімер.

У 1927 р. М.К.Кольцов припустив, що успадковані ознаки повинні передаватися з покоління в покоління разом з гігантськими молекулами, які складаються з двох дзеркальних ланцюгів, що реплікуються напівконсервативним способом, і кожен з ланцюгів при реплікації служить матрицею для синтезу нової молекули. У 1935 р. Макс Дельбрюк, М.В.Тимофеев-Ресовський і Карл Циммер припустили, що хромосоми — це гігантські молекули, структура яких може бути змінена шляхом опромінення рентгенівськими променями, що приводить до зміни успадкованих ознак. У 1937 р. Уільям Астбері отримав перші результати рентгеноструктурного аналізу ДНК, але не зміг зробити висновки про її структуру, з'ясувавши, що ця структура є регулярною.

Критичний експеримент, який доводив, що гени складаються з ДНК, був зроблений в 1943 р. Освальдом Евері і співавторами, які продовжили роботу трагічно загиблого на початку Другої світової війни Фредеріка Гриффіта із штамами пневмококів. У експериментах Гриффіта відбувалася трансформація невірулентних бактерій типу (R) у вірулентний штам (S). О.Евері виділив «трансформуючий агент» і ідентифікував його як ДНК. Аналогічний

експеримент був поставлений в 1953 р. Алфредом Херши і Мартою Чейз, які працювали з бактеріофагом T2. У своїй роботі вони теж показали, що генетичним матеріалом фага є ДНК.

У 1950-х роках три групи вчених досягли успіху в дослідженнях структури біологічних макромолекул. Перша працювала в Кінгс-коледжі (Лондон), до неї ввійшли Моріс Уїлкінс і Розалінда Франклін. Друга складалася з Френсіса Кріка і Джеймса Уотсона з Кембріджа. Третю групу, очолив Лайнус Полінг, група працювала в Каліфорнійському технологічному інституті (США). Уотсон і Крік конструювали моделі структури з кульок, з'єднаних металевими стрижнями, враховуючи дані про структуру окремих нуклеотидів і відстані між атомами. Франклін і Уїлкінс аналізували дані кристалографії і рентгеноструктурного аналізу.

Група Л.Полінга в 1948 р. виявила, що в просторовій структурі багатьох білків є частини у вигляді спіралі. Аналогічні висновки можна було зробити і на підставі даних Франкліна і Уїлкінса на ДНК. Остаточні висновки про спіралеподібну структуру ДНК, наявність в ній двох ланцюгів, зв'язаних водневими зв'язками між окремими нуклеотидами, і їх комплементарності були зроблені Уотсоном і Кріком. Їм допоміг Ервін Чаргафф, який відвідав у 1952 р. Кембрідж і нагадав про свої експерименти 1947 р., в яких він виявив, що в різних зразках ДНК співвідношення нуклеотидів варіює, але аденін завжди присутній в тій же пропорції, в якій і тимін, а гуанін – в такій же, як і цитозин.

Першу точну модель ДНК Уотсон і Крік побудували в 1953 р. на підставі даних, отриманих Р.Франклін. Їх відкриття викликало незвичайний ентузіазм як у вчених, так і у широкої публіки. Стаття Уотсона і Кріка була опублікована в «Nature» 25 квітня. Її зміст був дубльований публічною доповіддю завідувача лабораторією, в якій працювали Уотсон і Крік, Уільяма Брега, 14 травня. Вже 15 травня про нього була надрукована замітка в лондонській газеті «News Chronicle», а 16 травня — в «The New York Times». У 1962 р. Уотсон, Крік і Уїлкінс отримали за це відкриття Нобелівську премію.

У 1957 р. Крік запропонував формулу, що здобула популярність як «центральна догма молекулярної біології». Згідно цієї формули, ДНК є зберігачем інформації про структуру білка, посередником між ними виступає РНК. Механізм напівконсервативної реплікації ДНК, підтвердили експерименти Мезельсона і Сталя. Крік і його співавтори показали, що генетичний код складається з нуклеотидних триплетів (кодонів), кожен з яких кодує один амінокислотний залишок білка. У 1966 р. Хар Коран та ін. розшифрували генетичний код, встановивши співвідношення між кодонами ДНК і амінокислотними залишками білка.

Ранні роботи по дослідженню структури РНК також відносяться до 1950-х років. Уотсон і Крік припускали, що наявність у рибози 2`ОН групи перешкоджає утворенню подвійної спіралі, характерної тільки для ДНК. Були сумніви в здатності її до утворення будь-якої спіральної структури. Високий ступінь гетерогенності очищених зразків перешкоджав отриманню на РНК виразних знімків дифракційної картини і їх рентгеноструктурному аналізу. У 1955 р. відкритий фермент полінуклеотидфосфорилаза, за допомогою якого став можливим штучний синтез гомогенних нуклеїнових кислот. Виявилося, що РНК не тільки може утворювати спіраль, але, як і ДНК, здатна до утворення подвійної спіралі, хоча її структура і відрізнялася від подвійної спіралі ДНК.

Наприкінці 1950-х — початку 1960-х років опубліковані результати досліджень РНК, зокрема про гібридизацію РНК і ДНК з утворенням подвійних спіралей з ланцюгів обох макромолекул і навіть потрійної спіралі РНК, а також про структуру невеликих фрагментів РНК і динуклеотидів G-C і A-U, кристалізованих у вигляді завитків спіралі. У 2009р. опублікований сучасний огляд цих робіт.

У середині 1960-х років відкриті рибосоми, показана їх роль в синтезі білка і необхідність інформаційної РНК для їх утворення. У 1965 р. визначена первинна структура транспортної РНК, а до 1968 р. відразу декілька груп вчених отримали кристали транспортних РНК, хоча ще недостатньої якості, щоб визначити їх просторову структуру. Це стало досяжним

завдяки кристалізації в 1971 р. тРНК з дріжджів. Робота по дослідженню просторової структури тРНК дріжджів була закінчена у 1973 р. Згодом методи цієї роботи були використані у дослідженнях просторової структури і інших тРНК. Виявилося, що окрім лінійної або спіралеподібної форми тРНК, білки можуть мати компакту глобулярну структуру.

У 1980-х роках було показано, що деякі РНК здатні до аутокаталітичного розщеплення. РНК, як і ферменти, здатні каталізувати хімічні реакції. Таке аутокаталітичне розщеплення назвали рибозимами.

У 1990-х роках для деяких рибозимів була вивчена просторова структура, це були перші глобулярні РНК окрім транспортних. На цій основі були проведені дослідження особливостей формування структури РНК, виявлення консервативних структурних мотивів, локальних стабілізуючих взаємодій між фрагментами нуклеотидної послідовності. Ці досягнення стали можливими, завдяки появі методу транскрипції *in vitro*. Крім того, для вивчення структури РНК почали застосовувати ядерний магнітний резонанс, який став у нагоді для дослідження малих РНК (RNAs).

Згодом розвиток методів вивчення структури РНК дозволив досліджувати просторову структуру цілого ряду макромолекул, включаючи рибосомальну РНК. За роботу по дослідженню просторової структури рибосомальної РНК Ада Йонат, Венкатраман Рамакрішнан і Томас Стейц отримали Нобелівську премію.

Дослідження структури білка. Перше виділення і класифікація.

Як особливий клас біологічних молекул, білки були визначені ще в XVIII ст. Антуаном де Фуркруа. Спочатку їх називали альбумінами (*matieres albuminoides, albuminoids* або *Eiweisskorper*) і їх характерними властивостями вважали здатність до згортання або коагуляції при обробці теплом чи кислотою. Широко відомими прикладами таких білків на початку XIX ст. вважали яєчний альбумін, альбумін з сироватки крові, фібрин і клейковину пшениці. Схожість між згортанням яєчного білка і скисанням молока були відомі з найдавніших часів. Навіть само слово Альбумін було запропоновано ще Плінієм Старшим (лат. *albus ovi* - білок яєчний).

Якоб Берцеліус і Герріт Ян Мульдер провели елементний аналіз рослинних і тваринних білків і намагалися визначити їх емпіричну формулу. До їх здивування, у всіх білків формула виявилася приблизно однаковою, різними були лише вміст сірки і фосфору, присутні у відносно невеликих пропорціях.

Мульдер припускав, що існує єдина базова білкова субстанція (*Grundstoff*), яка синтезується в рослинах і засвоюється тваринами при перетравленні. Берцеліус підтримав цю ідею, назвавши субстанцію протеїном.

Мульдер також ідентифікував продукти деградації протеїну, зокрема, амінокислоту лейцин, і визначив її молекулярну масу (131 Da).

Мінімальна молекулярна маса протеїну, згідно аналізу Мульдера, була приблизно 9 kDa, в сотні разів більшою, ніж у молекул, з якими йому доводилося стикатися. Тому хімічна структура протеїну (точніше, первинна структура) залишалася невідомою до 1949 р., коли Фредерік Сенгер визначив амінокислотну послідовність першого білка – інсуліну. Проте, теоретично ще в 1902 р. Франц Хофмайстер і Еміль Фішер передбачили, що білок є лінійним ланцюгом з амінокислотних залишків, сполучених пептидними зв'язками. Багато вчених мали сумнів, що такі довгі амінокислотні ланцюги можуть залишатися стабільними в розчині, і існували також альтернативні теорії про можливу будову білків.

Те, що білки є макромолекулами з певною структурою, а не колоїдними сумішами, показав Теодор Сведберг за допомогою аналітичного ультрацентрифугування. За допомогою очищення з тканини важко отримати білок більш, ніж декілька міліграм. Тому ранні дослідження проводили на протеїнах, які легко очищуються з яєчного білка, крові, а також

різних токсинів і травних соків. Техніка очищення білка швидко розвивалася під час Другої світової війни у зв'язку з необхідністю отримувати очищені білки крові для лікування поранених солдатів. В кінці 1950 р. американська компанія Armour and Company очищувала у великих кількостях рибонуклеазу А і безкоштовно надавала її для досліджень. В результаті РНКазу А на декілька десятиліть стала основним об'єктом фундаментальних досліджень для багатьох наукових груп, з послідуочим нагородженням Нобелівською премією.

Просторова структура. Дослідження просторової структури білка почалися в 1910-х роках, коли Крік і Мартін показали, що при коагуляції випадінню білка в осад передує інший процес, денатурація, при якій білок втрачає розчинність і ферментативну активність, але набуває додаткових хімічних властивостей. В середині 1920-х років було відмічено, що іноді денатурація може бути зворотною, а у 1929 р. з'явилася думка, що денатурація є зміною конформації амінокислотного ланцюга, при якому залишки, які раніше знаходилися всередині білкової глобули, тепер експоновані в розчинник. У такому разі розчинність повинна знижуватися відповідно до порівняно низької розчинності амінокислот з аліфатичними і ароматичними бічними групами. Відповідно з'являються додаткові хімічні властивості і втрачається ферментативна активність.

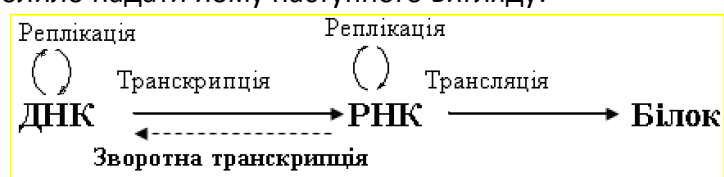
На початку 1960 р. Крістіан Анфінсен показав, що РНКазу А дійсно денатурує зворотно, і що природна конформація цього білка відповідає глобальному мінімуму вільної енергії.

Просторову структуру глобулярних білків спочатку вивчали лише гідродинамічними методами і ультрацентрифугуванням. У 1950-х роках з'явилися спектральні методи, включаючи круговий дихроїзм, флуоресценцію, визначення спектрів поглинання в ультрафіолетовій і інфрачервоній областях. Кристалографія і рентгеноструктурний аналіз для визначення просторової структури гемоглобіну були вперше застосовані Перуцом і Кендрю в 1960-х роках. За цю роботу вони були удостоєні Нобелівської премії. У 1980-х роках почали також застосовувати ядерний магнітний резонанс. До 2006 р. Protein Data Bank містив дані про просторову структуру 40 тисяч білків. Завдяки виявленню консервативних доменів, гомологічні структури різних білків зараз можна реконструювати за допомогою комп'ютерних програм, а для дослідження структури великих міжбілкових комплексів застосовують криоелектронну мікроскопію.

В результаті видатних відкриттів Дж.Уотсона, Ф.Кріка, Х.-Г.Корани, А.Корнберга і інших молекулярних біологів, удостоєних Нобелівських премій, вже в середині 60-х років ХХ ст. остаточно затвердився *основний постулат молекулярної генетики*, що формулює магістральний шлях реалізації генетичної інформації в клітині: **ДНК → РНК → Білок**.

Пізніше були детально вивчені механізми відтворення (реплікації) ДНК, транскрипції (біосинтезу РНК) і трансляції (біосинтезу білка). Паралельно продовжувалися роботи по вивченню внутрішньоклітинної локалізації цих процесів, що привело до усвідомлення функціонального значення внутрішньоклітинних компонентів (ядра, мітохондрій, рибосом і ін.) і дало підставу Дж.Уотсону у 1968 р. для визначення молекулярної біології: «Молекулярна біологія вивчає зв'язок структури біологічних макромолекул і основних клітинних компонентів з їх функцією, а також основні принципи і механізми саморегуляції клітин, які узгоджують і об'єднують всі процеси, що протікають в клітині».

Згодом центральний постулат молекулярної генетики був доповнений уявленнями про існування процесу зворотної транскрипції (про біосинтез ДНК на матриці РНК) і реплікації РНК, що дозволило надати йому наступного вигляду:



Одночасно все більше деталізували уявлення про будову і функції білків, необхідних для каталізу (ферменти) і регуляції (регуляторні білки, пептидні гормони) всіх найважливіших молекулярно-генетичних процесів.

Відкриття і розробка методів цілеспрямованого використання цілого ряду ферментів (зворотної транскриптази, ДНК-рестриктаз і ін.) привели до створення технології отримання рекомбінантних ДНК, виникнення генетичної інженерії, що стало революційною подією в історії молекулярної біології.

Наприкінці 70-х і початку 80-х років ХХ ст. молекулярна біологія вступає в період розквіту. В цей час з'ясовуються механізми сплайсингу (В.Келлер і ін.), відбувається відкриття РНК-ферментів (рибозимів) і аутосплайсинга (Т.Чек), активно вивчаються механізми генетичної рекомбінації і рухомі генетичні елементи (Д.Хогнесс, Г.П.Георгієв), на новий рівень виходять роботи в області структури ферментів і біологічних мембран (Ю.А.Овчинников), починаються роботи по розшифруванню структури геномів вищих організмів (включаючи геном людини), створюються основи нових (генно-інженерних) біотехнологій, виявляються і синтезуються каталітично активні антитіла, виникає білкова інженерія.

Поступово молекулярна біологія стає в центрі наук. Бурхливий розвиток молекулярної біології привів на початку 80-х років ХХ ст. до появи нової науки — біоінформатики (обчислювальної біології, комп'ютерної генетики), яка виникла на межі молекулярної генетики і інформатики. Поштовхом стала поява швидких методів визначення нуклеотидних послідовностей ДНК, (1975-1976 рр. Ф.Сангер і А.Коулсон, А.Максам, У.Гілберт). У 1982 р. організовані банки нуклеотидних послідовностей: Gen Bank в США і EMBL в Європі, в яких концентрувалася інформація про розшифровані нуклеотидні послідовності ДНК різних організмів. Поступово біоінформатика включилася в розробку важливих молекулярно-біологічних проблем, включаючи: статистичний аналіз нуклеотидних послідовностей ДНК; прогноз функцій по первинній структурі біополімерів (ДНК, РНК і білків); аналіз (моделювання) просторової структури білків і нуклеїнових кислот; теорію молекулярної еволюції і систематики.

Прогрес в області визначення нуклеотидних послідовностей (секвенування) ДНК різних організмів, досягнутий в кінці ХХ ст. (у 1995 р. секвенувано перший бактеріальний геном, в 1997 р. — геном дріжджів, в 1998 р. — геном нематоди, в 2000 р. — геном дрозофіли і майже повністю — геном людини), привів до виникнення *геноміки* — науки, яка вивчає набори всіх генів даного організму як єдине ціле. Одночасно виникла протеоміка — наука, яка досліджує повні набори білків, що функціонують на різних етапах розвитку організму.

В кінці ХХ ст. розширюються і стають все більш цілеспрямованими в науково-практичному відношенні **завдання молекулярної біології**, серед яких:

- розшифровка структури геномів;
- створення банків генів;
- дактилоскопія генома;
- вивчення молекулярних основ еволюції, диференціювання, біорізноманітності, розвитку і старіння, канцерогенезу, імунітету та ін.;

Проблеми молекулярної біології стосуються розкриття біологічних функцій молекул, їх синтез і розпад, взаємні перетворення. При цьому найбільша увага приділяється вивченню ролі і функції нуклеїнових кислот і білків з використанням електронної мікроскопії, методів диференційного центрифугування (А.Клод, 1959), методів виділення і фракціонування білків за допомогою електрофорезу (А.Тізелнус, 1937), а також методів виділення і очищення нуклеїнових кислот (Е.Кей, А.Дауне і ін.), хроматографічного (А.Мартін, Р.Синг, 1941), рентгеноструктурного аналізу біополімерів (У.Брегг, Дж.Бернал, У.Астбері і ін.). Особливе

значення для розвитку молекулярної біології і генетики мав прорив у методах дослідження НК, який почався в 70-х роках (Г.П.Георгієв, 1984). Були запропоновані методи:

1) гелелектрофорез, що дозволив судити про молекулярну масу на основі швидкості руху їх в гелі і ділити НК на ділянки різної довжини (Т.Маніатіс, Е.Фріч, Д.Самброк, 1970);

2) методи розщеплювання ДНК ферментами бактерій рестриктазами (В.Арбе 1970; Х.Сміт, 1970). До того ж виявилось, що власний фермент бактерій на аналогічній послідовності своєї ДНК не діє із-за її метилування. Рестриктази різних бактерій специфічно взаємодіють з ДНК різних еукаріотів. Це дозволило підбирати рестриктази, які розщеплюють ДНК специфічного виду еукаріотів.

У 30-х роках починається вивчення НК рослин (А.М. Белозерський, 1934) і їх виділення (А.М.Белозерський, І.І.Дубровська, 1936), а також виявлення подібності РНК рослин і тварин (Дж.Девідсон, 1975). Е.Чаргафф і його співробітники (1949-1951), використовували методи хроматографії на папері і спектрофотометрії, встановили, що незалежно від організму вміст $\text{Аденіну}=\text{Тиміну}$, а $\text{Гуаніну}=\text{Урацилу}$. У свою чергу кількість пуринів відповідає кількості піримідинів. Це було підтверджено і на прикладі рослин (А.М.Белозерський і його співробітники, 1957-1974). З іншого боку виявилось, що ДНК різних видів відрізняється за величиною відношення $\text{А}+\text{Т} / \text{Г}+\text{Ц}$. Саме ці спостереження нарівні з рентгеноструктурним аналізом молекул ДНК наштовхнули на розшифровку структури молекул ДНК і побудову моделі її відтворення (Дж.Уотсон і Ф.Крік 1953).

З розшифруванням будови ДНК (з 60-х років) починається другий ще бурхливіший етап розвитку молекулярної біології, особливо у зв'язку з вивченням генетики бактерій і вірусів (А.Херши, М.Дельбрюк і С.Лурія) і нуклеотидної послідовності молекул ДНК різних організмів (М.Бір, Д.Бартон, А.Л.Мазін, Б.Ф.Ванюшин і ін.), а також механізму біосинтезу білка. У 1953 р. був підтверджений зв'язок вивчення включення мічених амінокислот в молекулі білка в мікосомах (П.Замечник, Е.Келлер, 1953). Виявилось, що активація кожної амінокислоти відбувається за участю специфічного ферменту, т-РНК і АТФ (М.Хогланд, 1956; П.Берг, Р.Звятий, Ф.Аллен, 1958 і ін.), порядок включення амінокислоти також визначається специфічною т-РНК (Ф.Шапвіль, 1962; Ф.Ліпман, 1953). Відомо, що і велика частина РНК клітини зосереджена в рибосомах (р-РНК). Однак виявилось, що її нуклеотидна послідовність не відповідає такій ДНК (А.М.Белозерський, О.С.Спірін, 1957). Лише у і-РНК нуклеотидна послідовність відповідає послідовності ДНК (Е.Волкін, Л.Астархан, 1961). У зв'язку з цим все ще існують сумніви щодо ролі р-РНК.

Зі встановленням ролі т-РНК і і-РНК в синтезі білка була розшифрована структура алеїнової (Р.Холлі, 1965) і валінової (А.А.Баїв, 1967) т-РНК з дріжджів. У 60-х роках навчилися також розрізати і повторно з'єднувати окремі ділянки РНК і синтезувати її молекулу (С.Очоа, 1959). Схожі маніпуляції проводилися і на молекулах ДНК, що дало можливість конкретизувати роль окремих її ділянок в генетичному кодуванні (Р.Коран, М.Ніренберг, 1961). Одночасно помітно просунулися роботи по вивченню ролі рибосом (Р.Робертсон, 1958) в явищах трансляції (О.С.Спірін, 1963, 1968; Д.Уоллер, 1960; А.Річ, 1968; А.Тіс'ер і Дж.Уотсон, 1958 і ін.).

Виявилось, що процес трансляції складається з таких етапів, як ініціація, елонгація і термінація. Була запропонована схема регуляції активності генів і їх участі в синтезі білка (Ф.Жакоб, Ж.Моно, 1961), а також виділені у складі ДНК структурні (інформаційні) і регуляторні гени (речовини, які приймають участь в синтезі, — репресори) і гени-оператори (які під дією репресора здатні блокувати функцію структурних генів). При появі в середовищі індуктора (наприклад, лактози) — репресор зв'язується з індуктором і блокує функцію гена-оператора, що приводить до активації структурного гена. Речовина-репресор виявилася білком. (М.Пташне, 1968). Промотор і промоторні ділянки ДНК, розташовані поряд з геном-опероном. Серія робіт була виконана по вивченню структури і функції білків (Л.Полінг,

Ст.Інгрем, Ф.Сенгер, Ст.Стейн, К.Анфінсон і ін.), що стало можливим після розробки методик виділення білків в кристалічному вигляді (Дж.Самнер, 1926; Дж.Нортроп, М.Куниць, 1930 і ін.). Це привело до побудови моделі структури міоглобіну і гемоглобіну (Дж.Кендрю, М.Перуц, 1957), лізоциму (Д.Філіпс, 1967) і ін. білків.

Серед найважливіших досягнень молекулярної біології слід назвати і розшифровку принципу організації і функціонування вірусів. Хоча вірусологія як наука бере початок з робіт Д.І.Івановського (1892), вона вийшла на передові позиції лише в 40-50-х роках ХХ ст. з моменту розробки методик їх кристалічного виділення.

Дослідження в області молекулярної біології розвивалися під кутом вивчення природи спадкового апарату у бактерій і фагів (Дж.Бідл і Е.Тейтум, 1941, 1944), мінімальних розмірів генів у бактеріофага Т4 кишкової палички (С.Бензер, 1961) і вірусів (Ф.Крік, Дж.Уотсон, 1951). Ці роботи дозволили картиувати ділянки ДНК, відповідальні за біохімічні мутації і завершилися розробкою питань про регуляцію генної активності (Ф.Жакоб і Ж.Моно, 1961), структуру ДНК (Дж.Уотсон і Ф.Крік, 1953) і генетичний код (Р.Гамору, 1954, 1957; Ф.Крік і Л.Барнет і ін., 1961, 1963), а також про механізми транскрипції і трансляції (А.Корнберг, 1956, Р.Коран, 1968). Автори цих досліджень були удостоєні Нобелівської премії.

Для розшифровки генетичного коду мала значення розробка методики введення в безклітинну систему синтезу білка штучно синтезованих молекул ДНК з чіткою послідовністю нуклеотидів (М.Ніренберг і Дж.Матгей, 1961, 1963). Завдяки цьому вдалося точно з'ясувати послідовність включення в молекулу поліпептиду індивідуальної амінокислоти і порядок основ всіх 64 кодонів (Р.Гамору, 1957). Введенням у середовище штучно синтезованих коротких РНК, які містять декілька нуклеотидів (М.Ніренберг і Ф.Ледер, 1961, 1972), був досягнутий і синтез білка відповідного складу, а також визначена мінімальна довжина олігонуклеотида, здатного приєднати одну молекулу т-РНК із специфічною амінокислотою. Виявилось, що кожен кодон приєднує до себе тільки т-РНК однієї з 24 амінокислот, це мало значення для остаточної розшифровки складу всіх кодонів (Д.Коран, Р.Віттман, Ч.Яновський, 1966). Ці дослідження показали наявність виродженості генетичного коду (одна амінокислота може бути закодована декількома кодонами), його універсальність і неперекривність. Розшифровка складу генетичного коду дозволила з'ясувати молекулярний механізм процесів рекомбінації і мутацій, а також наявність в ДНК незмістовних кодонів. Функціональна специфіка клітин одного організму була пояснена відмінностями в активності різних генів. Серія досліджень показала здатність клітин і організму підтримувати генетичну стабільність в умовах дії шкідливих чинників завдяки наявності механізмів репарації генетичних пошкоджень за участю спеціальних ферментів — «зшивання» і «вирізання» пошкоджених ділянок молекул ДНК (сплайсинг).

На початкових етапах розвитку молекулярної біології і генетики (50-60 рр.) вважали, що про- і еукаріоти мають однакову будову і функціонування генів. Перші успіхи вивчення еукаріотів показали наявність у них складнішого і досконалішого механізму експресії і регуляції генів. Так, біосинтез мРНК у різних еукаріотів відрізняється участю різних форм РНК-полімерази, тоді як у прокариот існує тільки одна форма (М.Сингер, П.Берг, 1998). У еукаріотів ДНК знаходиться в ядрі і входить до складу нуклеопротейдних комплексів, відбувається включення і виключення окремих генів в різних групах клітин.

Геном еукаріотів істотно відрізняється від генома прокариотів наявністю численних послідовностей, які повторюються в ДНК (Р.Бріттен і Е.Кон, 1968), а також здатністю утворювати гібриди між одноланцюговою її ниткою і РНК. Ці відкриття надалі помітно просунули вивчення НК (Г.П.Георгієв, 1989) і привели до виділення у еукаріотів 3-го класу послідовностей в організації геному: сателітну ДНК, послідовності на різних ділянках ланцюга, які помірно повторюються, і унікальні ділянки ДНК (які зустрічаються одноразово або мало повторюються). Було з'ясовано, що помірні повтори включають ділянки розміром з

100-300 (короткі) або декілька тисяч (довгі) пар нуклеотидів (Дж.Девідсон, Р.Бріттен і ін., 1974). У еукаріот були виявлені зв'язок ДНК в ядрах з 5 класами гістонів і наявність особливих білків, що взаємодіють з і-РНК, і генів, які беруть участь в експресії. На базі досягнень молекулярної біології виникла «генна інженерія», де використовуються гени не тільки виділені з живих організмів, але і штучно синтезовані. Досягнуто розмноження виділених генів і збільшення їх копій. Шляхом введення нових генів в інші істоти, отримують потрібні білки, антитіла, імуностимулятори, ферменти, вакцини, сироватки та інші продукти. Виведені трансгенні рослини, стійкі до ряду шкідників, гербіцидів, грибкових і бактеріальних хвороб (томати, капуста, бавовна, горох і т.п.). У Бельгії виведений трансгенний бик («Герман») з введенням в геном гена білка жіночого молока, який проявляє свою дію у його «доньки». Зроблені успішні спроби замінити хірургічні операції на серці і судинах по усуненню спадкових вад генноінженерними прийомами, введенням в судини бракуючих генів. На цій основі виникла нова область медицини — генна терапія. З використанням методів генної інженерії ставиться завдання створення біологічно поновлюваних джерел енергії, екологічно чистих технологій і нових форм корисних мікроорганізмів в промислових цілях. З урахуванням перспектив розвитку генної інженерії гостро ставиться завдання про забезпечення біологічної безпеки кожної країни і людства в цілому (О.С.Спірін, 1997). Звідси розвиток молекулярної біології в майбутньому пов'язаний не тільки з надіями, але і тривогами.

Розвиток молекулярної біології і генетики в останні десятиліття ХХ ст. пов'язаний з вивченням молекулярних основ еволюції (М.Кимура, 1985; В.А.Ратнер, 1998), виявленням дистанції філогенезу між різними організмами (А.Ф.Айала, 1981; Д.Докінз, 1993) і особливостей еволюції генома (Р.Даувер, Р.Флейвель, 1986). Дослідження показали наявність біохімічних відмінностей навіть між близькими видами, і швидкість молекулярної еволюції не збігається із швидкістю морфологічної еволюції.

Зараз не викликає сумніву факт, що швидкість еволюції будь-якого білка постійна і однакова в різних гілках філогенезу і нейтральні біохімічні мутації виникають частіше сприятливих. Молекулярні методи стали складовою частиною вивчення еволюції. У зв'язку з вивченням молекулярних основ еволюції знову дискутується питання про об'єкт і сферу дії відбору (Е.Майр, 1997), намагаючись навіть цілком заперечувати його роль (А.Ліма-Фарія, 1991). В той же час дослідження в області молекулярної біології і генетики вплинули на розвиток систематики, морфології, фізіології і теорії еволюції. В області молекулярної генетики успіхи, починаючи з 1982 р., пов'язані з клонуванням генів і їх використанням в біотехнології. З цією метою створені банки генів і штучні хромосоми людини. Велика увага приділяється отриманню і використанню трансгенних організмів (Ю.Ю.Гліба, 1998), не дивлячись на існуючі протести їх використання. Продяться вивчення молекулярних основ старіння (В.П.Скулачов, 1998; Л.Хейфлік, 1997; Х.Д.Осивец, А.Хаманн, 1997).

Отже, ХХ ст. вивело біологію на передові позиції у природознавстві, вивчення життя стало предметом широкої зацікавленості. Найбільші успіхи пов'язані з вивченням молекулярних основ життя. Дослідження в цих областях вплинули і на стан класичних напрямків біології.

Початок нового тисячоліття ознаменувався видатною подією – розшифруванням нуклеотидної послідовності генома людини, з якою пов'язані надії на вирішення багатьох проблем людства (корекція спадкових захворювань, продовження життя і т.д.).

Завдання молекулярної біології. Разом з вказаними важливими завданнями молекулярної біології актуальним напрямом наукового пошуку найближчого майбутнього є розробка методів, що дозволяють розшифровувати структуру, а потім і тривимірну, просторову організацію високомолекулярних нуклеїнових кислот. Зараз це досягнуто відносно загального плану тривимірної структури ДНК (подвійної спіралі), але без точного

знання її первинної структури. Швидкі успіхи в розробці аналітичних методів дозволяють з упевненістю чекати досягнення вказаних цілей впродовж найближчих років. Головні внески йдуть від представників суміжних наук, насамперед фізики і хімії. Всі найважливіші методи, використання яких забезпечило виникнення і успіхи М.б., були запропоновані і розроблені фізиками (ультрацентрифугування, рентгеноструктурний аналіз, електронна мікроскопія, ядерний магнітний резонанс і ін.). Майже всі нові фізичні експериментальні підходи (наприклад, використання ЕОМ, синхротронного, або гальмівного, випромінювання, лазерної техніки і ін.) відкривають нові можливості для поглибленого вивчення проблем М.б. У числі найважливіших завдань практичного характеру, на першому місці стоїть проблема молекулярних основ злоякісного росту, далі — шляхи попередження, і подолання спадкових захворювань — «молекулярних хвороб». Велике значення має з'ясування молекулярних основ біологічного каталізу, тобто дії ферментів. До найважливіших сучасних напрямів слід віднести розшифровку молекулярних механізмів дії гормонів, токсичних і лікарських речовин, а також з'ясування деталей молекулярної будови і функціонування таких клітинних структур, як біологічні мембрани, що беруть участь в регуляції процесів проникнення і транспорту речовин. Віддаленіші цілі молекулярної біології — пізнання природи нервових процесів, механізмів пам'яті і т.д. Один з важливих розділів молекулярної біології є гена інженерія, яка ставить своїм завданням цілеспрямоване оперування генетичним апаратом (геномом) живих організмів, починаючи з мікробів і нижчих (одноклітинних) і закінчуючи людиною (у останньому випадку перш за все в цілях радикального лікування спадкових захворювань і виправлення генетичних дефектів). Про втручання в генетичну основу людини мова може йти лише в віддаленому майбутньому, оскільки при цьому виникають серйозні перешкоди як технічного, так і принципового характеру. Відносно мікробів, рослин, тварин, є перспективи, наприклад, отримання сортів культурних рослин, які мають апарат фіксації азоту з повітря і не потребують добрив. Вони засновані на вже досягнутих успіхах: ізолювання і синтезу генів, перенесення генів з одного організму в іншій, застосування масових культур клітин, як продуцентів господарських або медичних важливих речовин; створення методів діагностики і лікування генетичних хвороб, вірусних захворювань; створення нової біотехнології виробництва харчових продуктів і різноманітних біологічно активних сполук (гормонів, антигормонів, релізінг-факторів, енергоносіїв і ін.).

Молекулярна медицина.

Молекулярна медицина є однією з галузей сучасної медицини, спрямованих на розробку нових технологій діагностики, лікування і профілактики спадкових і неспадкових захворювань на молекулярному і клітинному рівнях. Своєю появою молекулярна медицина (медицина XXI ст.) зобов'язана стрімкому розвитку фундаментальної медико-біологічної науки і, передусім, досягненням в області молекулярної біології, генетики, молекулярної імунології, біохімії, біофізики, мембранології, а також фармакології. Теоретичною основою молекулярної медицини є результати розшифрування генома людини, ідентифікації структурних і регуляторних генів, розробка концепції апоптозу, з'ясування молекулярних механізмів багатьох спадкових і мультифакторіальних хвороб, розробка технологій отримання і культивування стовбурових клітин та ін. Науковими завданнями молекулярної медицини є ідентифікація структурних і регуляторних генів людини, вивчення їх експресії і регуляції, з'ясування генної природи і молекулярних механізмів спадкових хвороб, ролі генетичних чинників в етіології і патогенезі різних патологічних станів, у тому числі й інфекційної етіології.

Постановка діагнозу з точною локалізацією генетичного дефекту до недавнього часу була неможливою за відсутні надійних методів терапії м'язової дистрофії Дюшена. Зараз це реально завдяки знанню первинної структури гена, можливості синтезувати олігонуклеотидні праймери, використовувати полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для синтезу відповідних

послідовностей і застосування їх у діагностиці (гібридизація).

Принципове значення має молекулярна онкогенетика. Дослідження проводяться в декількох напрямках:

- молекулярна діагностика спадкових форм раку;
- діагностика і з'ясування молекулярних механізмів вірусіндукованих форм раку;
- пошук і діагностика молекулярних маркерів несприятливого прогнозу при ракових захворюваннях;
- діагностика мікрометастаз;
- пошук і діагностика поліморфного ДНК-маркера, для виявлення схильності до раку.

Знання молекулярної природи змін, які служать причиною пухлинного росту, дають можливість прогнозувати захворювання. Молекулярно-генетичні методи ПЛР і гібридизація зі специфічним ДНК-зондом сприяють ідентифікації поодиноких трансформованих або метастазних клітин серед великої кількості нормальних клітин (1-2 на 10^6 клітин). Такого рівня чутливості не дає жоден із відомих біохімічних чи імунологічних методів.

Принципово не відрізняється від діагностики спадкових і онкологічних захворювань генодіагностика інфекційних патологій. У цьому випадку виявляються гени, специфічні для збудників або продуктів їх експресії.

Результатом досягнень молекулярної генетики з'явилося народження нової галузі медичної науки — генетичної (генної) терапії (ГТ) - можливість використання функціональних генів як лікарських засобів. Насправді ГТ - це сукупність біомедичних технологій, заснованих на введенні хворому генетичних конструкцій: перенесення генів *ex vivo* (подібно випадку з геном аденозиндеамінази, проводиться зазвичай на клітинах крові); *in situ* (локальна ГТ, наприклад, введення в трахею і бронхи при муковісцидозі, або в масу пухлини у разі терапії злоякісних новоутворень); *in vivo* (введення генетичних конструкцій безпосередньо в ембріон).

У світі зареєстровано вже понад 1000 клінічних дослідів ГТ і декілька тисяч пацієнтів мають у своєму організмі генетично модифіковані клітини.

Таким чином, ці та інші нові напрями у фундаментальній і прикладній медицині разом з медичною генетикою формують новий напрям медицини - генетичну медицину. Як зазначає В.М.Запорожан і співавтори (2007, 2008): «...генетична медицина – це наука, яка вивчає генетичні механізми розвитку патологічного процесу в організмі людини різної етіологічної природи на всіх рівнях організації (молекулярному, клітинному, тканинному, органному), розробляє для кожного рівня генетичні методи діагностики, лікування і профілактики захворювань».

Сьогодні складовими елементами молекулярної медицини є молекулярна діагностика, індивідуальна фармакотерапія (у тому числі гена терапія) і превентивна медицина (тобто молекулярна профілактика). До основних досягнень молекулярної медицини відносяться розробка і впровадження вискоєфективних методів діагностики спадкових хвороб на будь-якій стадії онтогенезу, ідентифікації особини. Нині закладені експериментальні і клінічні основи генної терапії спадкових і неспадкових хвороб, на основі даних про індивідуальний метаболічний і генетичний статус розпочаті дослідження в області фармакогенетики і фармакогеноміки.

Закономірним результатом розвитку молекулярної медицини стало виділення нового комплексного напрямку персональної (геномної) медицини, яка включає розробку індивідуалізованих технологій лікування і профілактики на основі досягнень геноміки, протеоміки, біоінформатики і генетики, а також тестування організму людини на предмет схильності до хвороб різного генезу і їх ускладнень. Дослідження, які проводяться в цьому напрямі, довгі роки, були сконцентровані на розробці молекулярних технологій супроводу таких мультифакторіальних соматичних захворювань, як бронхіальна астма, цукровий діабет,

злякисні новоутворення, атеросклероз і ін. Нині одним з пріоритетних напрямів молекулярної медицини є пошук маркерів схильності до хронічної течії вірусних і бактеріальних інфекцій, які мають соціальне значення, і перехід до їх терапії з індивідуальним підходом, діагностики на основі ідентифікації молекулярних механізмів взаємодії організму людини і патогена.

Інфекційні захворювання є дуже зручною моделлю для вивчення ролі молекулярних особливостей макроорганізму в розвитку патологічного процесу, оскільки дозволяють розмежувати вплив етіологічного агента (інфекта) і молекулярно-генетичних особливостей інфікованого. Незважаючи на підвищений інтерес фахівців до вказаної проблеми, питання, які стосуються розкриття молекулярно-генетичних основ схильності і резистентності організму людини до довгої персистенції інфекційних збудників, до теперішнього часу залишаються відкритими. Не вирішено також питання про механізми, що призводять до різних результатів хвороби: одужанню, безсимптомному носійству, трансформації в хронічну форму з відповідними ускладненнями. Це, у свою чергу, обумовлює необхідність проведення фундаментальних досліджень, стосовно вивчення молекулярних процесів в системі «збудник – макроорганізм» з метою розробки нових персональних технологій діагностики, а також прогнозування результату вірусних інфекцій, селективної дії фармакологічних засобів на ключові молекулярні одиниці патогенезу інфекційних хвороб. Розуміння проблеми формування персистентних і хронічних прогресивних форм вірусної інфекції лежить в області дуже цікавого біологічного феномену - тривалого (іноді довічного) персистування стороннього генетичного об'єкту в зараженій клітині, яка розвивається, незважаючи на виражену імунну відповідь.

Більшість вірусів можуть служити причиною розвитку патологічних процесів, при яких їх реплікація забезпечується життєздатністю клітини-хазяїна. При цьому індивідуальна сприйнятливість організму до інфекції визначається сукупністю декількох чинників. До їх числа передусім відносяться особливості інфекта (генотип вірусу, об'єм матеріалу, що інфікує, реалізація механізмів втечі вірусів від імунного нагляду за допомогою перманентної мінливості їх антигенної структури, а також пригнічення індукції і реалізації імунної відповіді). Ключову роль в ланцюзі патофізіологічних подій грають індуковані збудником ендogenous реакції, і першою «лінією» реагування на вірусну агресію є система крові і імунітет.

Сьогодні доведено, що інфекційний процес супроводжується багаторівневою дезорганізацією кровотворної і імунної систем – від зародкових до зрілих клітин, патогенетичною основою якої слугує стимуляція збудником дизрегуляції процесів гемо- і імунопоеза, дисбаланс структурного (хромосомного апарата, мембран), метаболічного і функціонального статусу імунокомпетентних клітин крові. Особливу роль в цьому грають механізми порушень програмованої загибелі (фундаментального механізму регуляції клітинного гомеостазу) і міжклітинної кооперації імунокомпетентних клітин, особливості реалізації яких залежать як від природи патогена, так і генетичної детермінованості.

Генотерапія ще залишається експериментальним методом, але, з часом вона стане ефективною і безпечною альтернативою існуючим методам лікування багатьох спадкових і придбаних захворювань. Вже зараз проводяться клінічні випробування з метою порівняння ефективності і безпеки генотерапії і звичайних методів лікування злякисних новоутворень. У найближчому майбутньому декілька нових препаратів на основі антизмістовних олігонуклеотидів отримають дозвіл на використання для лікування вірусних інфекцій (у тому числі ВІЛ) і, можливо, злякисних новоутворень. Передбачається широке використання методів генотерапії для створення ектопічної експресії чинників згортання (при гемофіліях) і еритропоетину (при хронічній анемії).

Для успіху більшості методів генотерапії потрібна розробка безпечніших і ефективніших способів доставки трансгенів, тому успіх залежить від прогресу в

конструюванні і отриманні нових векторів. Ймовірно, стануть можливими ризиковані процедури, такі, як внутріутробна генотерапія. Нарешті, необхідно забезпечити безпеку хворих, які беруть участь у клінічних випробуваннях, і врахувати етичні сумніви, що висловлюються громадкістю.

Перспективні біочіпові технології, що дозволяють на основі аналізу, ДНК або білків, отримувати величезний об'єм інформації практично про будь-які біологічні об'єкти - будь то людина, тварина, рослина, харчові продукти. Уперше термін «біочіп» з'явився в середині 90-х років минулого століття. Це невелика пластинка з нанесеними на ній в строгому порядку певними фрагментами молекул білка або ДНК. Перші біочіпи налічували всього декілька сотень таких молекул (маркерів), проте з розвитком технологій їх кількість поступово зростала. На пластині розміром в 1 см² зараз можливе розміщення до мільйона таких молекул.

Маючи на біочіпі зонди, що цікавлять лікаря, стає можливим знайти в організмі людини маркери, відповідні певним вірусам, бактеріям, раковим клітинам або генетичним порушенням. Н., розроблений біочіп, здатний виявити усі відомі на сьогодні форми збудника туберкульозу, а також визначити, чим треба лікувати конкретно цю форму. Вчені вже навчилися лікувати деякі генетичні захворювання методом генної терапії, а пошук «пошкоджених» генів людини за допомогою біочіпів полегшить їм це завдання. За допомогою білкових чіпів, які несуть молекули, «чутливі» до різних низькомолекулярних з'єднань, можна буде визначати наявність широкого спектру лікарських речовин, гормонів, наркотиків, отрут, пестицидів практично в будь-якому матеріалі - будь то кров, вода, їжа або зразок ґрунту. Визначення типів вірусів імунодефіциту і гепатиту також можливо за допомогою біочіпів.

Можливості, що відкриваються завдяки цій технології в області діагностики, важко переоцінити. Наприклад, звична для кожного з нас процедура, як загальний аналіз крові. Вивчаючи дані лабораторного дослідження, лікар отримує набір показників, більшість з яких найчастіше є загальною для великої кількості захворювань. Біочіпи дозволяють практично з 100% точністю визначити наявність, скажімо, дефектних генів або інших маркерів, характерних саме для цього захворювання. Для розшифровки даних, отриманих за допомогою «біочіпової» технології, використовуються спеціально створені комп'ютерні програми і обладнання, що дозволяють спочатку просканувати біочіп, а потім інтерпретувати закладену в ньому інформацію.

Біочіпи використовуються для самих різних цілей. У медицині біочіпи можуть допомогти за лічених час виявити у хворих стійкі форми туберкульозу, наявність тієї або іншої сечостатевої інфекції і т.д. Біочіпи вже знаходять застосування для скринінгу різних ракових захворювань, оцінки ефективності терапії, прогнозу течії патологічного процесу. Дослідники в університетах і у фармакологічних фірмах проводять на чіпах одночасний аналіз роботи тисяч і десятків тисяч генів і порівнюють експресію цих генів у здорових і ракових клітинах. Такі дослідження допомагають створювати нові лікарські препарати і швидко з'ясовувати, на які ланки патологічного процесу і яким чином ці нові ліки діють.

Вже відомі маркери, що дозволяють передбачити появу онкологічного захворювання через певний час. Так, задовго до виникнення раку легенів у людей, які палять, в крові можуть з'явитися маркери, що сигналізують про можливий його розвиток в майбутньому. Подібні маркери виявлені і для раку простати, коли клінічно захворювання ще немає. Найцікавіше, що ці молекулярні маркери можна визначити в крові пацієнтів задовго до проведення дорогих і хворобливих процедур біопсії. Білки-маркери багатьох форм раку не дозволяють передбачити підвищений ризик розвитку захворювання, але дають можливість оцінити результати лікування і своєчасно помітити рецидив хвороби. Таким чином, подібний

метод аналізу може бути використаний для регулярного диспансерного обстеження і моніторингу захворювання в післяопераційний період.

Нанобіотехнології – це міждисциплінарний науково-технічний комплекс знань, який заснований на засобах і методах біотехнології і нанотехнології, вивчає дію об'єктів нанодіапазону на біологічних об'єктах з метою створення і виробництва корисних для людини продуктів, технологій і процесів.

Головними чинниками, які вплинули на появу, становлення і розвиток нанобіотехнології, є швидкий розвиток таких наукових дисциплін, як мікробіологія, молекулярна біологія і інженерія, білкова інженерія і, власне, біотехнологія, яка об'єднує дані дисципліни, а також високий розвиток матеріалознавства, електроніки і інших областей нанотехнології, наноінженерії і нанонауки, фундаментальною основою яких є фізика. Окрім цього, слід відзначити, що поява нанобіотехнології була б неможливою, якби не процес взаємної інтеграції наукових галузей, які кардинально відрізняються своєю природою, методами і засобами. Завдяки такому симбіозу стала можливою поява абсолютно нових галузей наукових знань в тому числі і нанобіотехнологія. Наступним важливим фактом в становленні і розвитку даної наукової області є філософський аспект, оскільки поява свого роду «синтетичної» технології і науки може кардинально змінити наукову картину світу, тобто повністю перевернути уявлення людства про такі матеріальні категорії, як матерія, субстанція, форма і про поняття «живого» і «неживого». Внаслідок чого наукова картина світу, що існує нині, буде неабияк доповнена і переосмислена, це сприятиме новому технологічному ривку людства в своєму розвитку.

На даний час нанобіотехнологія має три напрямки - це: наномедицина, біоміметика і розробка штучних нанорозмірних частинок в живих системах.

З розвитком нанобіотехнології тісно зв'язаний якісно новий напрям медичної науки – молекулярна наномедицина. Основні дослідження цієї області полягають у вивченні і створенні: лабораторій на чіпі, адресної доставки ліків до уражених клітин, нових бактерицидних і противірусних засобів і діагностики захворювань за допомогою квантових крапок.

Розвиток наномедицини тісно пов'язаний з революційними досягненнями геноміки і протеоміки, які дозволили вченим наблизитися до розуміння молекулярних основ хвороб. Наномедицина розвивається там, де дані геноміки і протеоміки поєднуються з можливостями, що дозволяють створити матеріали з новими властивостями на нанометричному рівні (Wagner V., Wechsler D.).

Успіхи останніх років у вивченні функціонування геному людини, молекулярних механізмів клітинних процесів забезпечують основу для вагомого підвищення інформативності медичної діагностики. Стає можливим отримувати надійні і інформативні відомості про функціонування організму і розвиток патологічного процесу на підставі комплексного обліку рівня значного числа сполук, тим або іншим чином пов'язаних з патологічним процесом (М.П.Цегельників, К.В.Шайтан). Перш за все, це пов'язано з використанням лабораторій на чіпі, які можуть проводити діагностику як *in vivo* (при імплантації їх в організм), так і *in vitro*, а також з використанням методів діагностики за допомогою квантових крапок (у режимі *in vitro*).

Наступна галузь наномедицини дозволить незабаром здійснювати безперервну доставку ліків усередину організму в необхідному напрямку без витрат агента, який транспортується. В даний час саме адресна доставка ліків з усіх напрямків наномедицини розвивається значними темпами. У цій області вже отримані деякі прикладні результати, які можуть сприяти тому, що найближчим часом практично всі ліки доставлятимуться саме таким чином, забезпечуючи ефективнішу дію на уражену зону усередині організму.

Створення бактерицидних і противірусних засобів на основі нанобіотехнології і їх використання в медицині дозволить створити принципово нові лікарські засоби на основі наночасток різного походження. Вже зараз численні наукові колективи всього світу працюють над вивченням і розробкою різних універсальних платформ по створенню різних видів ліків і вакцин. Особлива увага приділяється вірусам, як найбільш універсальним платформам, що забезпечують створення різних ліків і вакцин при використанні навіть одного вірусу. Робота з вірусами дозволяє отримати ще одну перевагу при використанні ліків в боротьбі з вірусними інфекціями і профілактикою їх появи, що дасть можливість надійно контролювати прояв таких захворювань.

Можлива інтеграція або взаємодія наночасток неорганічної природи з біологічними наночастками, що забезпечить появу комбінованих ліків, які міститимуть переваги обох видів наночасток та забезпечать при цьому універсальність і надійність своєї дії.

Наступним найважливішим напрямком нанобіотехнології є біоміметика. Жива клітина використовує ДНК, РНК і велику кількість білків, щоб будувати клітинні структури нанометрових розмірів. Саме цією властивістю живих клітин користується біоміметична нанобіотехнологія при створенні штучних наномашин і наноконструкцій. Сьогодні дана область нанобіотеха знаходиться на початковій стадії, але її розвиток істотно прискорить створення таких конструкцій. Як і наномедицина, біоміметика має чотири напрямки розвитку це: створення наноконструкцій з білка, використання в конструюванні молекул ДНК і РНК і робота з вірусами при створенні наномеханізмів.

При конструюванні різних конструкцій нанометрового розміру перевага віддається роботі з білками. Оскільки білки на даний час найбільш вивчені і існує гіпотетична можливість широкого використання різних білкових наноконструкцій в життєдіяльності людини. Але, практичне застосування таких конструкцій обумовлене рядом проблем, головною з яких є відсутність на даному етапі розвитку науки і техніки засобів точного проектування і виробництва таких конструкцій і, що саме головне, не вивчений вплив штучних «деталей» на організм людини і навколишнє середовище.

При роботі з молекулами ДНК і РНК вже зараз є численні прикладні результати, які показують, що нуклеїнові кислоти мають право використовуватися в біоміметиці нарівні з білками і навіть в агрегації з ними.

Особливу увагу слід приділити використанню вірусів в розробці біоміметичних технологій. На даний момент до кінця не вивчена можливість використання вірусів як платформа для розробки конструкцій або механізмів нанометрового масштабу. Хоча при теоретичному обґрунтуванні цілком доведено їх використання як різних наномеханізмів. При цьому, як переваги вірусів можна відзначити їх будову, вибірковість дій і механізм реплікації вірусних часток. Остання характеристика вірусів може бути використана при репродукції наномеханізмів або нанороботів собі подібних в необмежених кількостях.

Але слід зазначити, що всі розробки в області біоміметичних нанобіотехнологій знаходяться або на стадії теоретичного обґрунтування, або тільки починають перевірятися практично в реальних умовах.

Третій напрямком нанобіотехнології – розробка нанорозмірних частинок в живих системах; розробка різних технологій і транспортних засобів, які доставлятимуть в необхідне місце живого організму різні об'єкти, а в майбутньому, можливо, і в різні місця неорганічного світу.

Вже зараз світова наукова громадськість має практичні результати досліджень в даних напрямках нанобіотехнології, які представлені такими прикладними засобами, як наноліки, біосенсори, наноемульсії різних біологічних рідин і т.д.

Розглянувши нинішній стан розвитку даної галузі науки, не можна не згадати і про фундаментальні перспективи її розвитку в майбутньому.

Однією з найважливіших перспектив майбутнього розвитку нанобіотехнології може служити створення ідеальної технічної системи. Під цим поняттям розуміють систему, маса, габарити і енергоємність якої наближуються до нуля, а її здатність виконувати роботу при цьому не зменшується. Граничний випадок ідеалізації техніки полягає в зменшенні її розмірів (аж до повного «зникнення») при одночасному збільшенні кількості виконуваних нею функцій. В ідеалі - технічного пристрою не повинно бути видно, а функції, потрібні людині і суспільству, повинні виконуватися. Таким прикладом можуть служити біонанороботи і різні біологічні конструкції нанометрового розміру. За допомогою нанобіотехнологічних методів стане можливим створення роботизованих технічних систем з використанням в їх конструкції біологічних елементів.

Третьою перспективою може служити створення нейроелектронної системи свідомості. Така система буде взаємодіяти з центральною нервовою системою і штучним інтелектом. Принципова можливість об'єднання біологічних і електронних компонентів стане можливим завдяки нейроелектричним інтерфейсам – пристроям, які дозволяють сполучати комп'ютери з нервовою системою. Слід також відзначити величезні перспективи нанобіотехнології і в інших галузях науки і техніки. Таким чином, по праву вважається, що ХХІ ст. повинно стати століттям молекулярної біології і нової біотехнології, призначених звільнити людство від тяжкого навантаження хвороб, вад і закласти основи його майбутнього процвітання.

Макромолекули як об'єкти вивчення молекулярної біології

Білки, їх роль в забезпеченні біологічної специфічності. Амінокислоти, їх властивості. Формування поліпептидного ланцюга. Первинна, вторинна, третинна і четвертинна структури білка. Конформація – основа властивостей білка. Фолдінг. Поняття про пріонні хвороби. Класифікація білків відповідно до їх біологічних функцій. Білки-переносники, сигнальні, захисні, структурні, рецепторні, регуляторні, ферменти. Поняття про протеоміку.

Макромолекули клітини. З простих органічних молекул синтезуються складні макромолекули. Макромолекула — це велика молекула, яка побудована з багатьох одиниць, що повторюються. Вона є полімером, що складається з мономерів. Існує 3 типи макромолекул: білки, нуклеїнові кислоти і полісахариди. Деякі ліпіди умовно можна вважати за макромолекули. Макромолекули складають до 90 % сухої маси клітин.

Білки, їх роль в забезпеченні біологічної специфічності. Білками є біополімери (поліпептиди), які складаються з амінокислотних залишків, сполучених пептидними зв'язками.

Білки — найпоширеніший в живій природі клас біополімерів, який становить велику частку сухої речовини тваринних організмів (50—80%) і має найбільшу, в порівнянні зі всіма іншими речовинами органічної природи, різноманітність структури і функцій.

Білки визначають фенотип будь-якого організму, формують ознаки і властивості всіх живих систем. І хоча їх будова запрограмована нуклеотидною послідовністю відповідних генів, в структурному і функціональному відношенні білки більш варіабельні, ніж полінуклеотиди, що кодують їх (ДНК і РНК). Ця особливість білків визначається їх внутрішньою різноманітністю - складовими їх мономерів — амінокислотами. Кількість амінокислот, що зустрічаються в живих організмах, постійна (20 так званих канонічних, або білкових, амінокислот), що в чотири рази більше, ніж кількість канонічних нуклеотидів (А, Г, Т, Ц, У), які створюють молекули нуклеїнових кислот, і тому «мова» білків виявляється набагато багатішою «мови» нуклеїнових кислот.

Білки беруть участь у всіх без винятку молекулярно-біологічних процесах:

- мають каталітичну властивість, вони як *ферменти* детермінують інтенсивність всіх метаболічних процесів в клітинах і організмі в цілому.
- різноманітні *регуляторні білки* контролюють молекулярно-генетичні процеси (білки-регулятори реплікації, транскрипції і трансляції).
- білки є неодмінним компонентом всіх біологічних мембран, складають основу цитоскелету, входять до складу сполучних тканин, волосяного покриву, забезпечують «будівельну» функцію (*структурні білки*).
- здійснюють імунологічний захист від чужорідних з'єднань і патогенних мікроорганізмів (*захисні білки-імуноглобуліни*)
- забезпечують постачання організму киснем і різноманітними живильними речовинами (*транспортні білки*).
- особлива група поліпептидів контролює фізіологічну активність тканин і органів (*білки-гормони*).
- білки формують іонні канали і здійснюють сприйняття, трансформацію і передачу різноманітних зовнішніх сигналів (*білки-рецептори*).
- всі види руху, починаючи з рухів джгутиків бактерій і закінчуючи рухами пальців піаніста, забезпечуються роботою «білкових моторів» (*скоротливі білки*).

Унікальні властивості білків закладені в їх будові. Ця різноманітність визначається великою кількістю можливих поєднань амінокислотних залишків в довгих поліпептидних ланцюгах білків та в колосальній різноманітності просторової будови їх молекул.

Амінокислоти, їх властивості. Амінокислоти, що беруть участь в утворенні білків, мають загальну формулу:



де **R** — бічний ланцюг (радикал).

За кількістю амінних і карбоксильних груп і залежно від радикала (R) амінокислоти класифікують:

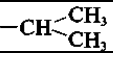
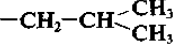
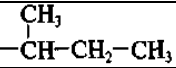
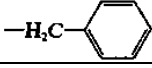
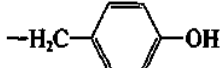
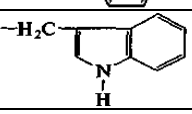
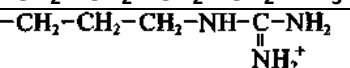
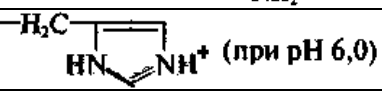
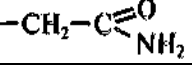
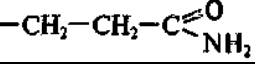

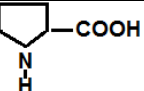
- моноамінокарбонові (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін, метіонін, цистеїн)
- діамінокарбонові (лізин, аргінін)
- амінодикарбонові (аспарагінова і глютамінова кислоти)
- ароматичні (фенілаланін, тирозин) і гетероциклічні (пролін, окипролін, гістидин, триптофан).

З урахуванням полярності і заряду радикала амінокислоти поділяють на чотири класи:

- амінокислоти з неполярними (гідрофобними) R-групами (аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, пролін, триптофан, фенілаланін);
- амінокислоти з полярними (гідрофільними) незарядженими R-групами (гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін, глютамін);
- амінокислоти з негативно зарядженими R-групами (кислі амінокислоти – аспарагінова і глютамінова кислоти);
- амінокислоти з позитивно зарядженими R-групами (основні амінокислоти – лізин, аргінін, гістидин).

Всі амінокислоти білків (протеїногенні), містять дві різні хімічні групи: аміногрупу (-NH₂) і карбоксильну групу (-COOH) і здатні реагувати з утворенням *пептидного зв'язку*. Протеїногенні амінокислоти пролін і окипролін (міститься в деяких білках) не мають вільної аміногрупи. Пролін і окипролін іноді називають імінокислотами, жорстка конформація яких викликає вигини в поліпептидних ланцюгах білків. Амінокислоти присутні в білках у вигляді амінокислотних залишків, зв'язаних у довгі поліпептидні ланцюги. Молекулярна маса амінокислот набуває середнього значення 100 ум. од. і, таким чином, білок з молекулярною масою 40 000 ум.од. містить приблизно 400 амінокислотних залишків.

Таблиця 1.1. Протеїногенні амінокислоти і аміді.

| Амінокислота | Структура бічного ланцюга (радикала) | Скорочене позначення |
|---|---|----------------------|
| Аліфатичні | | |
| Гліцин | -H | Gly, G |
| Аланін | -CH ₃ | Ala, A |
| Валін |  | Val, V |
| Лейцин |  | Leu, L |
| Ізолейцин |  | Ile, I |
| Ароматичні | | |
| Фенілаланін |  | Phe, F |
| Тирозин |  | Tyr, Y |
| Триптофан |  | Trp, W |
| Основні (несуть позитивний заряд) | | |
| Лізин | -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺ | Lys, K |
| Аргінін |  | Arg, R |
| Гістидин |  (при рН 6,0) | His, H |
| Дикарбонові (несуть негативний заряд) | | |
| Аспарагінова кислота | -CH ₂ -COO ⁻ | Asp, D |
| Глутамінова кислота | -CH ₂ -CH ₂ -COO ⁻ | Glu, Q |
| Аміді дикарбонових амінокислот | | |
| Аспарагін |  | Asn, N |
| Глутамін |  | Gln, E |
| Сірковмісні | | |
| Цистеїн | -CH ₂ -S | Cys, C |
| Метіонін | -CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃ | Met, M |
| Амінокислоти – спирти (містять гідроксильну групу) | | |
| Серин | -CH ₂ -OH | Ser, S |
| Треонін |  | Thr, T |
| Пролін |  | Pro, P |

Окрім аміно- і карбоксильних груп в амінокислотах містяться також бічні ланцюги, які не беруть участь в утворенні пептидних зв'язків та мають назву *радикали*. Хімічна природа радикалів різноманітна, що дозволяє їм вступати в різні взаємодії в процесі синтезу та формувати просторові структури білка. Послідовність розташування радикалів визначає особливості просторової (тривимірної) структури білків і їх функціональні властивості.

Для амінокислот характерна оптична ізомерія, в білках присутні L-амінокислоти. D-форми амінокислот виявляються у складі пептидів достатньо рідко. Вони виявлені в

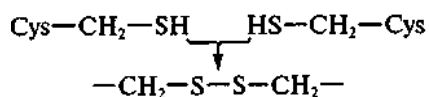
клітинних стінках бактерій сибірської виразки (D-Glu), а також у складі пептидів шкіри одного з видів південноамериканських жаб (D-Ala).

Єдиною білковою амінокислотою, яка не має оптичної активності, є гліцин (не має хірального вуглецевого атома). У гліцині радикалом умовно виступає атом водню. Відсутність радикала приводить до того, що гліцин збільшує рухливість поліпептидного ланцюга в білках і, через малий розмір, сприяє ущільненню упаковки. Решта амінокислот містить різноманітні по хімічній будові властивостям радикали, за якими їх класифікують.

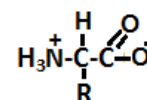
До амінокислот з *алкільними* радикалами відносять аланін, валін, лейцин і ізолейцин (останній містить 2 хіральних центри і відповідно має 4 оптичних ізомери). Аланін — найпоширеніша в природі амінокислота, вміст якої в білках зазвичай максимальний, ймовірно, через її просту будову і доступність для синтезу клітинними ферментами.

До групи *ароматичних* амінокислот входять фенілаланін, тирозин і триптофан. Крупні неполярні залишки: *Фен* і *Тир* разом з *Вал*, *Іле* і *Про* розташовуються переважно усереднені білкових молекул. Тирозин, що відноситься до полярних незаряджених амінокислот, бере участь в утворенні численних водневих зв'язків між бічними ланцюгами амінокислотних залишків при формуванні унікальних просторових структур білків. Гідроксильні групи, властиві серину і треоніну, здатні утворювати ефіри з фосфорною і рядом органічних кислот. Тому, зокрема, функціонально важливе фосфорилування ряду білків здійснюється найчастіше по залишкам даних амінокислот. Серин, як і тирозин, присутні в активних центрах ряду ферментів. По гідроксильним групам Ser і Tyr приєднуються до білка вуглеводні компоненти (глікозилування), що має місце при синтезі складних білків — глікопротеїнів.

Цистеїн і метіонін - *сірковмісні* амінокислоти. Характерною особливістю залишків Cys є їх здібність до вільного окислення у присутності кисню з утворенням «подвійної» амінокислоти — цистину. У білках це призведе до виникнення поперечних ковалентних зв'язків між поліпептидними ланцюгами або усереднені одного поліпептидного ланцюга. Так виникають *дисульфідні містки*.

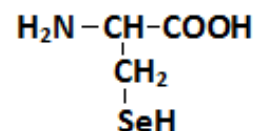


Вміст Cys великий в групі білків, здатних зв'язувати атоми важких металів — металотионеїнах. Амінокислоти у водному середовищі живих клітин є біполярними іонами (цвиттеріони):



До *заряджених амінокислот* відносять ті, які містять додаткові заряджені групи в радикалах. До амінокислот з кислотними властивостями, відносяться аспарагінова і глютамінова, у яких при нейтральному рН негативний заряд визначається наявністю в їх радикалах карбоксильної групи. До заряджених позитивно (основних) амінокислот відносяться лізин, аргінін і гістидин. Заряджені залишки Lys і Arg можуть ефективно зв'язувати фосфорні залишки, які лежать в основі взаємодії позитивно заряджених білків хроматину (гістонів) з молекулами ДНК. Гістидин містить гетероциклічну (імідазольну) групу, яка у фізіологічному інтервалі значень рН може виконувати роль акцептора протона. Тому His присутній в активних центрах багатьох ферментів, де виконує роль «протонної помпи».

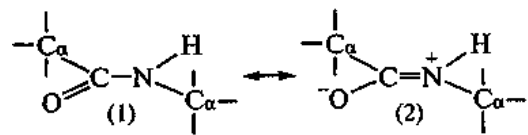
На сьогоднішній день поки неможливо однозначно пояснити, чому саме розглянуті амінокислоти були відібрані в ході еволюції для побудови більшості білків. Прості по будові Gly, Ala, Glu, Ser, Asp вважаються найдавнішими в еволюції на відміну від складних амінокислот, таких, як Asn, His. Крім вищезазначених 20 канонічних амінокислот в білках зустрічаються і інші амінокислоти, одна з яких, *селеноцистеїн*, містить атом селену (Se). Селеноцистеїн виявлений у самих різних організмів — від архібактерій до людини — у складі ряду каталітично активних білків (гліцин-редуктази, глутатіон-пероксидази, 5-деїодинази і ін.) і



розглядається як 21-а білкова амінокислота. Встановлені особливості синтезу, кодування і включення селеноцистеїна в поліпептидні ланцюги білків.

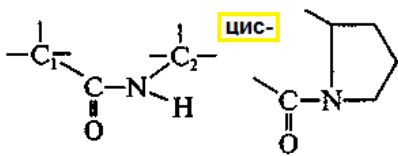
Формування поліпептидного ланцюга. α -амінокислоти є мономерами з яких будуються білки. Вперше це було доведено Е.Фішером, який синтезував на початку ХХ ст. короткі пептиди з декількох амінокислотних залишків. У 50-х роках ХХ ст. Р.Мерріфілд розробив технологію твердофазного синтезу поліпептидів для отримання повних за розмірами білкових молекул. Першим був синтезований каталітично активний білок — рибонуклеаза, що складається з 124 амінокислотних залишків, а потім і інші функціонально активні молекули білків, що підтверджувало поліпептидну теорію їх будови.

Таким чином, поліпептидні ланцюги білків складаються з амінокислотних залишків, зв'язаних пептидними зв'язками. Структура пептидного зв'язку приведена на рис. 2.1. Її параметри (міжатомні відстані і валентні кути) були визначені Л.Полінгом і Р.Корі на кристалічних структурах молекул, які містять один або декілька пептидних зв'язків. Виявилось, що відстань між атомами С і N (0,132 нм) менше звичайної, тоді як зв'язок С—О довший, ніж в альдегідах і кетонах. Л.Полінг і його співробітники пояснювали це наявністю резонансу двох суміжних структур пептидного зв'язку:



Пептидний зв'язок має частково подвійний характер і перебуває на 60 % у формі (1) і на 40 % у формі (2).

У білках найбільш поширений *транс*-пептидний зв'язок, представлений на рис. 2.1. Цис-пептидний зв'язок менш поширений і найчастіше утворюється при атомі азоту проліну.



Цис-зв'язки виявлені у ряді природних циклічних пептидів. Хоча поліпептидний ланцюг має зазвичай одну вільну аміногрупу на одному кінці (N-кінець) і одну вільну карбоксильну групу на іншому кінці (C-кінець), іноді ці групи зв'язуються, що і приводить до утворення циклічного пептиду.

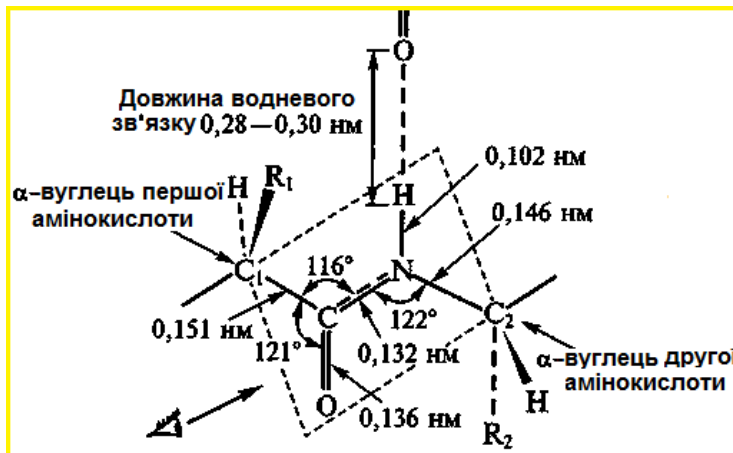
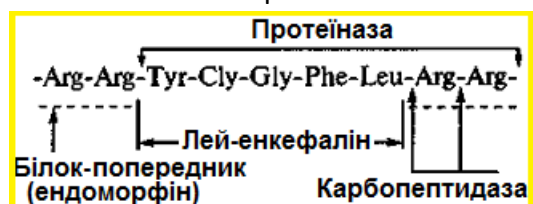


Рис. 2.1. Будова пептидної групи. Вказані міжатомні відстані, а також довжина водневого зв'язку, що утворюється з сусідньою пептидною групою. Всі атоми усередині пунктирної рамки лежать в одній площині.

Циклічну будову мають природні пептидні антибіотики граміцидин S і циклоспорін. Ці і деякі інші циклопептиди синтезуються мікроорганізмами по особливому нематричному мультиензимному механізму і містять в своєму складі

неканонічні амінокислоти (N-метилірованні амінокислотні залишки, D-ізомери амінокислот і ін.). Багато природних пептидів виникають з крупних білків-попередників в результаті *обмеженого протеолізу* під дією ферментів протеїназ, які руйнують пептидні зв'язки між певними амінокислотними залишками, тим самим вивільняючи фізіологічно активні пептиди. Таким чином, наприклад, з складу білка-попередника (ендорфіну) вивільняються пептиди-анальгетики *енкефаліни*, що відносяться до опіоїдних пептидів:



З білка-попередника можуть одночасно вирізатися або декілька молекул одного і того ж пептиду, або декілька різних по структурі пептидів, що мають різні фізіологічні ефекти.

Наприклад, у складі β-ендорфіна виявлений набір пептидів, який отримав назву пропіомеланокорпін (ПОМК), до складу якого окрім енкефаліну входять вирізані відповідними протеїназами три пептидні гормони: меланокитстимулюючий гормон (МСТ), адренкортикотропний гормон (АКТГ) і ліпотропін. Таким чином, з одного білка-попередника утворюється декілька пептидів, що модифікують обмін речовин в організмі в стресових ситуаціях.

Багато природних пептидів виконують певні фізіологічні функції. Для деяких з них характерна поліфункціональність — впливати на більшість процесів в організмі. Так, тетрапептид тафцин (Tyr-Lys-Pro-Arg) є імуностимулятором і психостимулятором; трипептид глутатіон (γ-Glu-Cys-Gly) підтримує відновлену форму заліза (Fe²⁺) в гемоглобіні і бере участь в перенесенні амінокислот через мембрани клітини. Пептиди, що виробляються в мозку, здатні управляти емоціями і поведінкою (психотропні пептиди).

Вивчення структури природних пептидів допомагає створювати їх синтетичні аналоги, які мають потужні фізіологічні ефекти. Наприклад, було показано, що біологічний ефект адренкортикотропного гормону (містить 39 амінокислотних залишків, синтезується в гіпофізі і регулює функцію кори надниркових залоз) обумовлений наявністю пептидного фрагмента: **-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-**.

Поліфункціональність пептидів, ймовірно, пояснюється їх здатністю зв'язуватися з різними рецепторами або схожістю структури самих рецепторів. В цьому відношенні відносно невеликі природні пептиди суттєво відрізняються від протеїнів (греч. «протос» — первинний), у яких виражена відповідність між послідовністю розташування амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі і певною просторовою структурою молекули. Деякі пептиди здатні приймати певну конформацію, зручну для взаємодії з рецепторами, але тільки білки здатні формувати і утримувати складні просторові структури з довгих поліпептидних ланцюгів. Найменший розмір для білків - 50 амінокислотних залишків (н., чинник зростання епітелію, інсулін і білки оболонки бактеріофагів). Найчастіше білки мають в своєму складі 100-400 амінокислотних залишків і утворюють тривимірну структуру.

Структури білка. Конформація – основа властивостей білка. Датський біохімік К.Ліндерстрем-ланг (1959 р.) запропонував розрізняти *чотири рівні* структурної організації білків: *первинну, вторинну, третинну і четвертинну структури*, які позначають відповідну амінокислотну послідовність, впорядковану будову основного ланцюга поліпептиду, тривимірну структуру білка і структури білкових агрегатів. Ця класифікація панувала до початку 80-х років ХХ ст., коли Г.Шульц і Р. Ширмер з урахуванням нових даних про структурні особливості білків доповнили її ще двома рівнями організації: *надвторинними структурами і доменами*. У результаті склалося уявлення про *шість* ієрархічних *рівнів* структурної організації білків, представленими Шульцем і Ширмером у вигляді схеми (рис. 2.2). В основі структурної організації білків лежить генетично детермінована амінокислотна послідовність поліпептидного ланцюга (первинна структура),

яка визначає всі подальші вищі рівні організації.

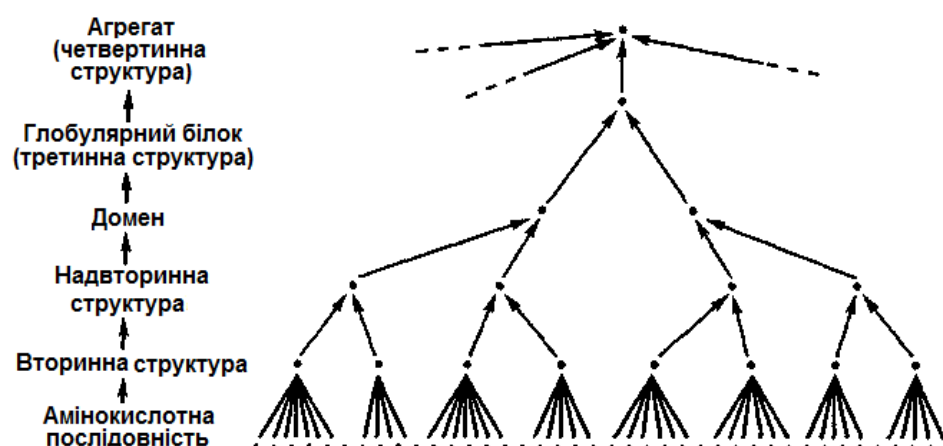


Рис. 2.2. Рівні структурної організації білків (за Шульцем і Ширмером).

Первинна структура білка - порядок чергування аміно-кислотних залишків в поліпептидному ланцюзі білка. Ця структура запрограмована нуклеотидною послідовністю відповідних структурних генів ДНК, *транскрибується* в комплементарні нуклеотидні послідовності мРНК, які є матрицями для біосинтезу поліпептидних ланцюгів в процесі *трансляції на рибосомах*. Первинна структура функціонально активного білка не завжди відповідає структурі мРНК, що пов'язано з можливостями репрограмування в ході трансляції, а також посттрансляційною модифікацією.

Значні розміри поліпептидних ланцюгів білків, які можуть включати декілька тисяч амінокислотних залишків (н., тиреоглобулін складається з 2750 амінокислотних залишків, а окремі трансмембранні білки-рецептори містять до 5000 амінокислотних залишків), ускладнюють розшифровку їх первинної структури. Для розшифровки використовуються спеціальні методи, з якими пов'язаний прогрес вивчення білкових тіл. Першою вдалося розшифрувати амінокислотну послідовність інсуліну (Ф.Сангер, 1953). Він складається з 51 амінокислотних залишків і організований у вигляді двох поліпептидних ланцюгів (ланцюг А - 21 залишок і ланцюг В - 30 залишків), ковалентно зв'язаних між собою двома дисульфідними містками. Ця робота, звана «ручне секвенування» (від англ. *sequence* — послідовність, поєднання), була виконана динітрофторбензольним методом Ф.Сангера (ДНФ-метод), за допомогою якого пізніше були розшифровані первинні структури аспартатамінотрансферази (Ю.А.Овчинніков, А.Е.Браунштейн, 1971) і ще декількох крупних поліпептидів. Аналіз амінокислотних послідовностей білків різко прискорився після впровадження методу П. Едмана і створення автоматичних приладів (секвенаторів), які дозволяють в автоматичному режимі здійснювати секвенування фрагментів поліпептидних ланцюгів завдовжки до 50 амінокислотних залишків. Проте навіть використання секвенаторів вимагає значного часу для визначення первинної структури крупних білків, які складаються з декількох поліпептидних ланцюгів. В цьому випадку спочатку потрібно встановити число ланцюгів, потім розділити ці ланцюги, розщепнути їх на короткі фрагменти, придатні для автоматичного секвенування за методом П.Едмана, визначити їх структуру і лише тоді встановити амінокислотну послідовність білка.

З хімічних методів фрагментації поліпептидів найчастіше використовують обробку бромціаном, який розщеплює пептидні зв'язки, утворені залишками метіоніну. Розділення пептидів, отриманих після фрагментації поліпептидних ланцюгів одним з вищеперелічених способів, найчастіше проводять методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC).

Фрагментацію ізольованих поліпептидних ланцюгів проводять з використанням ферментів: трипсину (вибірково гідролізує пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами Arg і Lys), хімотрипсину (гідролізує пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами Phe, Tyr, Trp, Leu), термолізину (розщепляє пептидні зв'язки, утворені аміногрупами Leu, Phe, Tyr, Val і Ile) і ряду специфічних ендопротеїназ, що розпізнають і розщепляють пептидні зв'язки між залишками певних амінокислот (Glu - C, Lys - C і Arg - C).

Порівняння первинних структур нормальних і аномальних білків дозволяє розкрити основи патологічних процесів, включаючи широко найпоширеніші генетично детерміновані захворювання. Саме цей підхід виявив причину серповидно-клітинною анемії - поширеній хворобі крові в регіонах розповсюдження малярії, яка пов'язана із точковою мутацією гена, що кодує β-ланцюг гемоглобіну. Заміна одного залишку Glu в нормальному гемоглобіні типу А на залишок Val приводить до появи аномального гемоглобіну типу S, не здатного в достатній мірі зв'язувати кисень, що призводить до розвитку гіпоксії в тканинах людини.

Метод Едмана, використаний для автоматичного секвенування отриманих пептидних фрагментів, заснований на наступних реакціях (рис.2.3).

Повторення циклів цих реакцій дозволяє послідовно одержати похідні амінокислот починаючи з N-кінця пептиду, що аналізується.

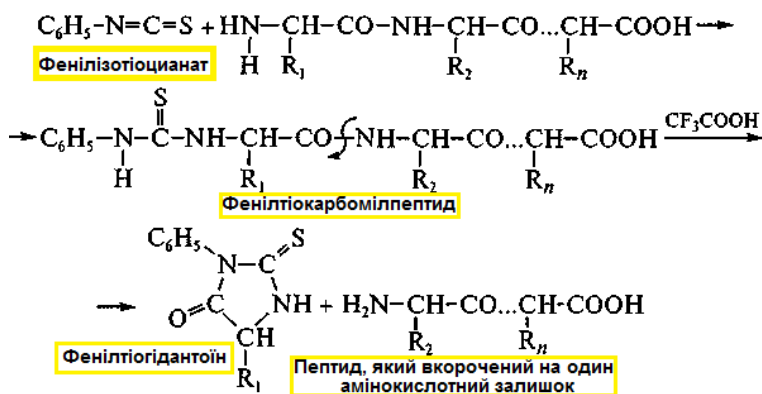


Рис. 2.3. Метод Едмана.

Похідні амінокислот потім аналізуються методом тонкошарової хроматографії або методом рідинної хроматографії. Крім цих методів використовуються: мас-спектрографія, лазерна рентгенографія та ін. В сучасних дослідженнях для визначення первинної структури білків все частіше використовують аналіз нуклеотидної послідовності кДНК, застосовуючи відповідні методи генетичної інженерії, що займає значно менше часу. Дізнавшись нуклеотидну послідовність кДНК або відповідну послідовність мРНК, можна, враховуючи особливості генетичного коду, визначити амінокислотну послідовність кодованого ними білка (не маючи препарату білка!). Але такий підхід не дозволяє встановити посттрансляційні модифікації білків і тому методи прямого секвенування не втратили свого значення.

Виявлення гомології первинних структур білків лежить в основі вивчення молекулярної еволюції білків, а дендрограми, побудовані на основі первинних структур білків, широко застосовуються для виявлення філогенетичних зв'язків різних груп організмів. Враховуючи величезну інформацію, накопичення первинної структури (до кінця 1997 р. найбільші міжнародні комп'ютерні банки даних містили відомості про первину структуру 100 000 білків), така побудова допомагає достовірно судити про процеси молекулярної еволюції, віддалені від нашого часу на сотні мільйонів років назад. Встановлено, що білки еволюціонують з різними швидкостями. Дуже консервативними виявляються гістони – білки, які виникли на самих ранніх східцях еволюції, що забезпечують компактне укладання ДНК у складі хроматину. Вони присутні в ядрах переважної більшості живих організмів і підтримують стабільність фундаментальних молекулярно-генетичних механізмів зберігання і відтворення спадкової інформації. Мінливіші білки: цитохроми, глобіни тварин та ін., ці білки найчастіше використовують як моделі для вивчення молекулярної еволюції. Схожість або відмінність первинних структур використовують для побудови молекулярно-філогенетичних «дерев» із залученням для цього спеціально розроблених комп'ютерних програм, що дозволяє встановити швидкість мутацій білків на окремих етапах еволюції органічного світу. 400-500 млн. років тому еволюціонували глобіни, в період виходу хребетних тварин на землю. Особливо сильно змінювалася первинна структура тих ділянок, які відповідали за четвертину структури. До найшвидше еволюціонуючих білків належать білки РНК-вмісних вірусів (грипу, імунодефіциту людини, онкогенних вірусів). В основі еволюції білків лежить мінливість відповідних генів, мутації в кодуючих ділянках яких і призводять до змін первинної структури білків. Мутаційному процесу в живій клітині постійно протистоїть система репарації, яка сильно розвинена відносно ДНК і малоефективна відносно РНК, чим і можна пояснити незвичайно високу швидкість мінливості білків, кодованих РНК-генами.

Виявлення гомології первинних структур білків лежить в основі вивчення молекулярної еволюції білків, а дендрограми, побудовані на основі первинних структур білків, широко застосовуються для виявлення філогенетичних зв'язків різних груп організмів. Враховуючи величезну інформацію, накопичення первинної структури (до кінця 1997 р. найбільші міжнародні комп'ютерні банки даних містили відомості про первину структуру 100 000 білків), така побудова допомагає достовірно судити про процеси молекулярної еволюції, віддалені від нашого часу на сотні мільйонів років назад. Встановлено, що білки еволюціонують з різними швидкостями. Дуже консервативними виявляються гістони – білки, які виникли на самих ранніх східцях еволюції, що забезпечують компактне укладання ДНК у складі хроматину. Вони присутні в ядрах переважної більшості живих організмів і підтримують стабільність фундаментальних молекулярно-генетичних механізмів зберігання і відтворення спадкової інформації. Мінливіші білки: цитохроми, глобіни тварин та ін., ці білки найчастіше використовують як моделі для вивчення молекулярної еволюції. Схожість або відмінність первинних структур використовують для побудови молекулярно-філогенетичних «дерев» із залученням для цього спеціально розроблених комп'ютерних програм, що дозволяє встановити швидкість мутацій білків на окремих етапах еволюції органічного світу. 400-500 млн. років тому еволюціонували глобіни, в період виходу хребетних тварин на землю. Особливо сильно змінювалася первинна структура тих ділянок, які відповідали за четвертину структури. До найшвидше еволюціонуючих білків належать білки РНК-вмісних вірусів (грипу, імунодефіциту людини, онкогенних вірусів). В основі еволюції білків лежить мінливість відповідних генів, мутації в кодуючих ділянках яких і призводять до змін первинної структури білків. Мутаційному процесу в живій клітині постійно протистоїть система репарації, яка сильно розвинена відносно ДНК і малоефективна відносно РНК, чим і можна пояснити незвичайно високу швидкість мінливості білків, кодованих РНК-генами.

Вторинна структура білків. Дослідження вторинної структури, засновані на даних рентгеноструктурного аналізу, показали наявність в білках регулярно згорнутих і закономірно закручених ділянок поліпептидного ланцюга. Л. Полінг і Р. Корі в 1951 р. вперше пояснили спіральне розташування в просторі поліпептидних ланцюгів, а потім сформулювали основні принципи побудови моделей вторинних структур білків.

За цими правилами було запропоновано декілька типів білкових спіралей — α , 3_{10} , π , β -складчасті листки і ін. (рис. 2.4). Подальший аналіз структур білків підтвердив існування в природі переважно α -спіралей, що пояснюється їх високою стабільністю. Спіралі типу 3_{10} (мають 3 амінокислотних залишки в одному витку і 10 атомів в циклі, утвореному водневим зв'язком) зустрічаються в природі рідко і утворюють короткі ділянки. Спіраль 3_{10} енергетично невигідна, оскільки в ній водневі зв'язки не знаходяться на одній лінії. Ці спіралі утворюють всього 1-2 витки і зустрічаються у гемоглобіні морської міноги, а також в білку павутини.

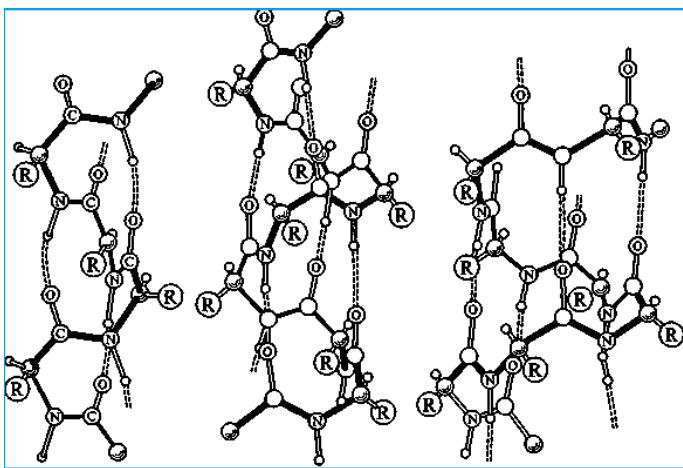
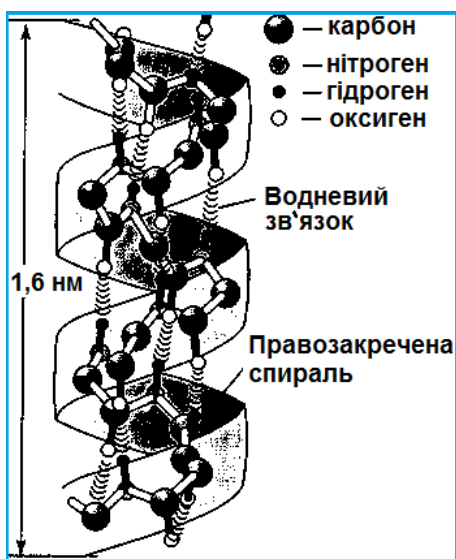


Рис. 2.4. Різні типи (зліва направо: 3_{10} , α і π) спіралей в поліпептидних ланцюгах білків (Г.Шульц, Р. Ширмер, 1982).

Переважаюча в білках α -спіраль має радіус 0,23 нм, відстань між витками складає 0,54 нм, середнє число амінокислотних залишків припадає на один оберт — 3,6, кут підйому витка спіралі — 26° . У природних білках існують тільки равозакручені α -спіралі, що

пов'язано з наявністю в них амінокислот L-ряду.

Всі вторинні структури стабілізовані водневими зв'язками між киснем карбонільної групи і воднем імідної групи пептидних зв'язків. Архітектоніка розташування атомів азоту і карбонільних груп в α -спіралі така, що створює можливість для утворення максимальної



кількості водневих зв'язків між цими групами, тому спіраль виявляється повністю насиченою водневими зв'язками, вона має щільно упаковану структуру, не має внутрішнього каналу і непроникна навіть для молекул води (рис. 2.5).

Рис. 2.5. Схематичне зображення α -спіралі (показано розташування водневих зв'язків; бічні групи (радикали амінокислотних залишків) не показані).

Довжина α -спіральних ділянок в білках різна: у глобулярних білках вона зазвичай не перевищує 15 амінокислотних залишків (3-4 оберти спіралі), а у фібрилярних білках набагато довша, і в ній можуть спостерігатися злами, найчастіше в місцях розташування залишків проліна, які не здатні до утворення відповідних водневих зв'язків.

Довгі стовбурові поліпептидні ланцюги, що складаються з декількох α -спіралей, виявлені в багатьох білках, зокрема в α -кератині, внутріклітинні волокна якого забезпечують міцність шкіри. Особлива спіраль виявлена у складі колагену, найбільш розповсюдженого білка ссавців.

β -Структури. Ці вторинні структури, дуже широко представлені у білках, були постульовані Л.Полінгом і Р.Корі і названі *паралельними «плоскими»* і *антипаралельними* β -складчастими листами.

Експериментальною моделлю для їх вивчення став β -фіброїн шовку, звідки власне і виникла назва β -структур, подібно до того як назва α -спіраль з'явилася у зв'язку з роботами

по вивченню структури α -кератина. Фіброїн шовку складається в основному з послідовності, що повторюється: $-(\text{Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala})_n-$.

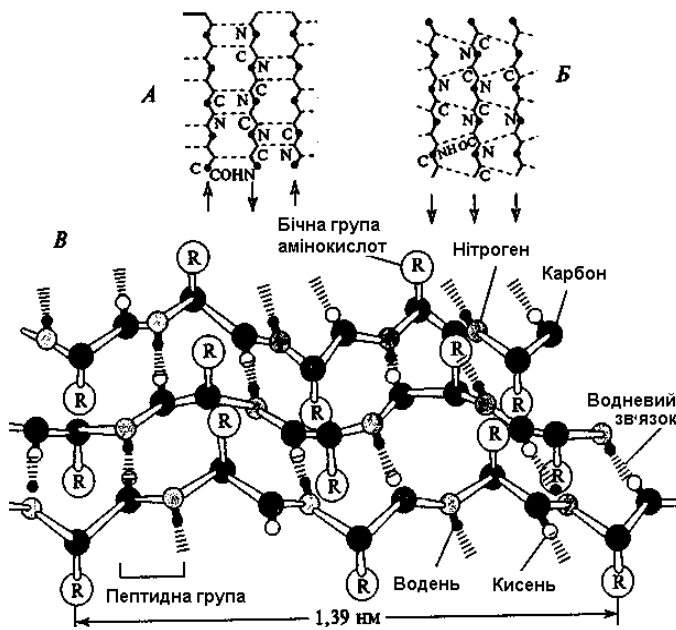


Рис. 2.6. β -складчасті листи:
 А – антипаралельна трьохланцюгова β -структура;
 Б – паралельна трьохланцюгова β -структура;
 В – детальніше зображення β -шара.
 Водневі зв'язки позначені пунктирними лініями, напрям ланцюгів – стрілками, α -атоми – точками.

На відміну від α -спірали в β -структурах водневі зв'язки виникають не уні ланцюга, а між паралельними або антипаралельними ділянками ланцюга (рис. 2.6.). Ці структури не так насичені водневими зв'язками, як α -спіраль, тому до їх складу можуть входити декілька ділянок поліпептидного ланцюга. Більшість складчастих листів містять не більше шести ланцюгів, і їх середня довжина (≈ 2 нм) відповідає розміру структурного домена. У глобулярних білків β -структури складають $\sim 15\%$, хоча їх число може бути і значно більше (наприклад, у вторинній структурі нейрамінідази — одного з каталітично активних білків вірусу грипу).

Радикали амінокислотних залишків розташовані по різні сторони від поверхні β -шара (Рис. 2.6.). Вони утворюють гребені, в яких нерідко зосереджуються бічні ланцюги гідрофобних амінокислот, і такі β -структури беруть участь в утворенні гідрофобних ядер глобулярних білків. У білках β -складчасті листи, як правило, загорнені вліво. Така закрученість відбувається як у фібрилярних (фібрин шовку), так і у глобулярних (карбоангідраза людини) білках.

Наявність у білках α -спіралей і β -структур була покладена в основу структурної класифікації білків (M. Levitt, S. Chotia, 1976), відповідно до якої розрізняють білки типу α , типу β (мають тільки β -структури), а також білки $\alpha + \beta$ і α/β . Білки $\alpha + \beta$ містять α -спірали і β -структури, виразно розділені в просторі уздовж ланцюга. Білки α/β мають складнішу будову, яка межується з ділянками α -спіралей і β -структур (нагадує листовий пиріг або сендвіч).

До найбільш відомих і детально вивчених білків типу α відносяться міоглобін, цитохром, білок вірусу тютюнової мозаїки і інсулін; до білків типу β : нейрамінідаза вірусу грипу, супероксиддисмутаза і конканавалін А, до білків типу $\alpha + \beta$ — рибонуклеаза, лізоцим курячого яйця і карбоангідраза, до типу α/β - карбоксипептидаза і триозофосфатизомераза.

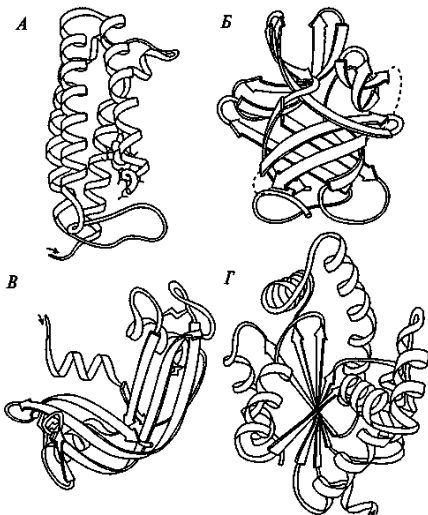


Рис. 2.7. Білки, що відносяться до різних структурних груп в залежності від представництва елементів вторинної структури: А — цитохром С (група α); Б — інгібітор трипсину з соєвих бобів (група β); В — рибонуклеаза (група $\alpha + \beta$); Г — аденілаткіназа (група α/β).

На рис. 2.7 представлені схематичні зображення тривимірних структур білків з різним розташуванням вторинних структур. Досить химерне на перший погляд розташування окремих елементів вторинної структури у багатьох білків визначає певне функціональне навантаження. Прикладом може бути структура зеленого

флюоресцируючого білку, в якому 11 β -шарів утворюють порожнистий циліндр, що захищає розташовану усередині хромофорну групу (Рис. 2.8).



Рис. 2.8. Схематичне зображення трьохвимірної структури зеленого флюоресцируючого білку, виконане з використанням спеціальної комп'ютерної програми. Одинадцять β -шарів утворюють порожнистий циліндр, усередині якого розташована хромофорна група.

Надвторинні структури є ансамблями вторинних структур, які енергетично вигідні. Відповідно до принципів кінетики такі утворення, ймовірно, переважні для формування (згортання) поліпептидного ланцюга в просторі по мірі їх синтезу, а також для надання стабільності вже сформованій просторовій структурі білка. Цей рівень організації властивий як фібрилярним, так і глобулярним білкам. У фібрилярних білках дві α -спіралі можуть бути закручені одна відносно іншої, утворюючи ліву надспіраль, період ідентичності якої складає близько 14 нм. Такі спіралі

знайдені в α -кератині, тропоміозині та в інших білках, що, надає їм певні функціональні властивості: міцність, еластичність, здатність до скорочення. У глобулярних білках частіше представлені надвторинні структури – складчасті листки (β -структури), між якими можуть розміщуватися α -спіралі (рис. 2.9.). Часто надвторинні структури містять у своєму складі атоми металів, що, забезпечує їх додаткову стабільність. До подібних утворень можна віднести так звані "цинкові пальці" (надвторинні структури з включеними в них атомами цинку), будова яких чудовим чином сприяє взаємодії окремих видів білків з ДНК.

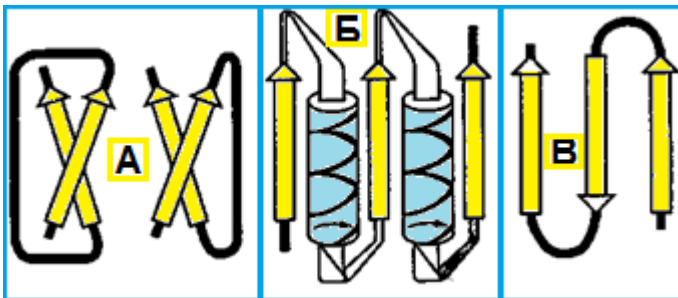


Рис. 2.9. Приклади надвторинних структур: А - $\beta\alpha\beta$ -ланцюг; Б - дві послідовно сполучені ділянки $\beta\alpha\beta$; В - антипаралельна трьохланцюгова β -структура.

Надвторинні структури певного виду відтворюються в багатьох білках, утворюючи структурні блоки. Їх вивчення привело до виникнення поняття блокового принципу структурної організації білків, що отримало закономірний розвиток у вченні про білкові домени.

організації білків, що отримало закономірний розвиток у вченні про білкові домени.

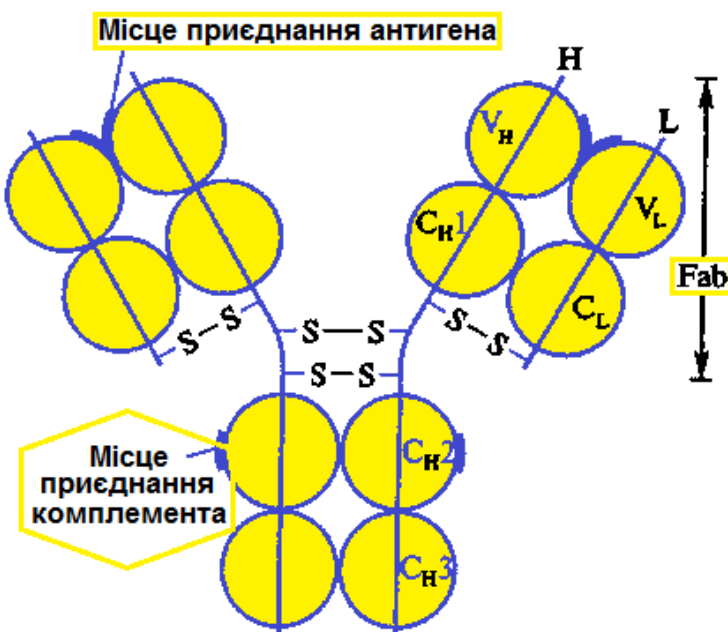


Рис. 2.10. Доменна структура імуноглобуліну G.

Молекула складається з двох важких (H) і двох легких (L) ланцюгів, сполучених бісульфідними містками. Домени позначені у вигляді кругів: C_H і C_L - константні домени важких і легких ланцюгів відповідно; V_H і V_L - варіабельні домени. Міждоменні ділянки важких ланцюгів мають певну рухливість: в області двох дисульфідних містків, які сполучають важкі ланцюги, розташована так звана шарнірна ділянка, що надає рухливість ділянкам Fab («лапкам») імуноглобуліну. Варіабельні домени утворюють функціональний домен, необхідний для

зв'язування антигена. Вуглеводні компоненти молекули не показані.

Домени. Аналіз електронної щільності показує наявність в білках чітко виражених глобулярних ділянок - структурних доменів. Молекулярна маса елементарних структурних доменів складає близько 20 кДа. Домени часто з'єднуються між собою короткими ділянками поліпептидного ланцюга, які виконують роль шарнірів, що забезпечують певну рухливість ділянок молекул білків один відносно другого. У межах одного поліпептидного ланцюга можуть зустрічатися декілька доменів. Один або декілька структурних доменів можуть утворювати функціональні домени. Останні ідентифікуються за властивостями: по здатності здійснювати ферментативну реакцію або приєднувати певні речовини (кофермент - у разі ферментів, антиген - у разі імуноглобулінів і так далі). "Активний центр" функціональних доменів, як правило, розташований на межі структурних доменів. Як приклад білка з досконало вивченою доменною структурою на рис. 2.10 приведена схема будови імуноглобуліну. Домени яскраво виражені у ферментів, що мають потребу для здійснення каталізу в додаткових речовинах небілкової природи (коферментах або простатичних групах, іонах металів), приєднання яких здійснюється у відповідних доменах. Такі коферментзв'язуючі домени виявлені у складі багатьох ферментів, які каталізують окислювально-відновальні реакції. На рис. 2.11 зображена просторова структура альдегідоксидоредуктази: коферментзв'язуючий домен є в кожному з двох ідентичних поліпептидних ланцюгів (субодиниць) цього ферменту.

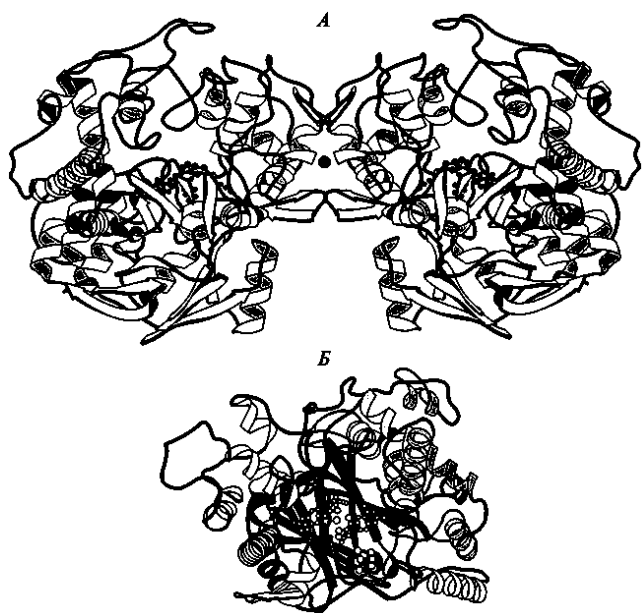


Рис. 2.11. Схематичне зображення молекули альдегідоксидоредуктази.

Молекула цього ферменту є димером, який складається з двох симетрично розташованих ідентичних поліпептидних ланцюгів (гомодимер):

А - загальний план будови молекули, в кожному з поліпептидних ланцюгів (субодиниць) якої є декілька доменів, утворених певними ділянками α -спіралей і β -структур. У центрі жирною точкою позначена вісь симетрії. Молекули коферментів зображені у вигляді чорних кулестрижневих моделей, розташованих поблизу центру кожної субодиниці;

Б - одна з субодиниць, яка складається з трьох доменів: домен I виділений чорним кольором, домен III - сірим; у центрі (у області домена I) розташовані молекули коферментів.

Домени виражені не тільки у ферментів, які зв'язують додаткові (небілкові) групи, але і у простих (однокомпонентних) ферментів — протеїнів. Різноманітністю доменів пояснюється здатність ферментів виконувати багато каталітичних функцій. Прикладом ферменту з двома різними структурними і одночасно функціональними доменами може бути ендонуклеаза з кліток дріжджів *Sacharomyces cerevisiae*. Вона відноситься до групи ферментів генної конверсії (homing), яка бере участь в сайт-специфічній інтеграції генів у хромосомі. Ендонуклеаза утворюється з більш складного білка-попередника в результаті автокаталітичного протеолізу (видалення частини поліпептидного ланцюга з молекули попередника). Таким чином, цей фермент має подвійну каталітичну функцію: вносить розриви до полінуклеотидних ланцюгів ДНК, діючи як ендонуклеаза (що необхідно для подальшої інтеграції генів у хромосомі), і здійснює обмежений протеоліз свого поліпептидного ланцюга. Подвійна функція пов'язана з наявністю двох доменів, що сильно

розрізняються по структурі: домен I відповідає за протеолітичну активність, домен II — за нуклеазну активність. Обидва домени приймають участь у зв'язуванні ДНК. (Рис. 2.12).

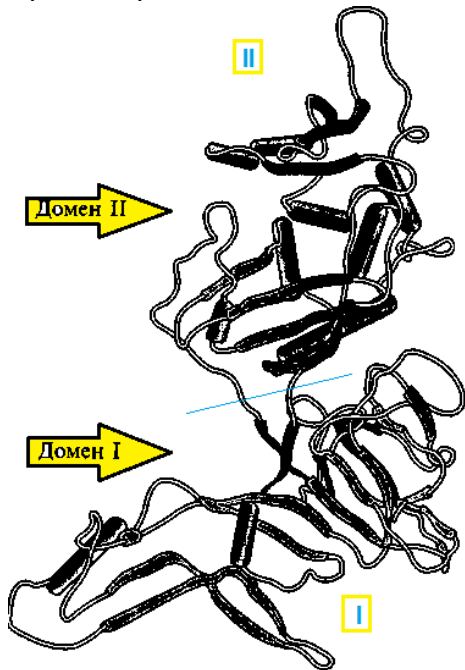


Рис. 2.12. Доменна структура ендонуклеази PI-SceI. (Венде В. та ін., 2000.). Домен I відповідає за протеолітичну активність, домен II — за нуклеазну активність. Оба домени зв'язують ДНК.

Структурно-функціональне дослідження деяких ферментів дозволили виявити ще одну особливість будови доменів — наявність в їх складі субдоменів, кожен з яких здатний виконувати певну каталітичну функцію. Таку складну субдоменну структуру має синтетаза вищих жирних кислот хребетних тварин: у кожному з двох її поліпептидних ланцюгів міститься по три домени. У складі двох доменів вдалося ідентифікувати декілька субдоменів, кожен з них каталізує певну реакцію в серії хімічних перетворень, що призводять до синтезу молекул пальмітинової і стеаринової кислот. Ще більш вражаючим прикладом поліфункціональності білків з різними функціональними доменами є лактоферин, білок молока ссавців з сімейства трансферинів — глікопротеїнів, що

переносять іони Fe^{3+} . Лактоферин здатний взаємодіяти з ДНК, РНК, білками, полісахаридами і в комплексі з ними виконує самі різні функції: розщеплює РНК як фермент рибонуклеаза, служить чинником транскрипції, інгібує синтез простагландинів, активує неспецифічну імунну відповідь організму і т.д. Молекулярна маса цього білка 80 кДа, (складається з 673 амінокислотних залишків). У єдиному поліпептидному ланцюзі лактоферину методом рентгеноструктурного аналізу виявлено два гомологічні домени (N- і С-частки), які містять залізосполучні центри (рис. 2.13).

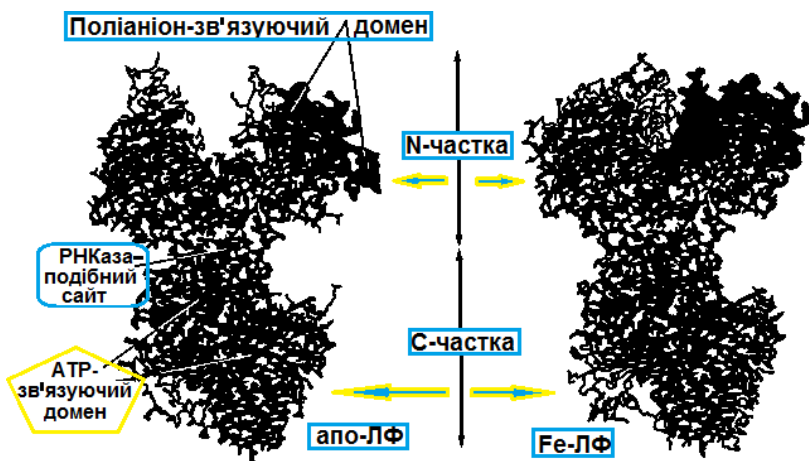


Рис. 2.13. Просторова структура поліфункціонального білка лактоферину, визначена методом рентгеноструктурного аналізу

Коферментзв'язуючі домени виявляються досить консервативними в еволюції, і в цілому структурні домени подібної будови зустрічаються у багатьох функціонально різних білків. Це відноситься, зокрема, до структурних доменів

імуноглобулінів, NAD-зв'язуючих доменів дегідрогенази і інших ферментів, наприклад триозофосфатізомерази і піруваткінази. Присутність схожих доменів у різних білків лягла в основу уявлень про модульний (доменний) принцип організації білків. Пізніше стало зрозумілим, що матрицями для синтезу таких структурно подібних (але не ідентичних) білків можуть служити мРНК, які виникають внаслідок альтернативного сплайсингу.

Третинна структура білка — це розташування в просторі всіх атомів білкової молекули. Іншими словами, під третинною розуміють тривимірну структуру білків, що характеризується певною упаковкою в просторі всіх ланок поліпептидного ланцюга. За формою упаковки в просторі білкові молекули прийнято поділяти на фібрилярні і глобулярні. Третинну структуру зазвичай розглядають у глобулярних білках, які мають різноманітнішу

просторову організацію і відповідно більш різноманітні функціональні можливості. Вивчення третинної структури здійснюється переважно методом рентгеноструктурного аналізу. Третинна структура міоглобіну представлена на рис.2.14.

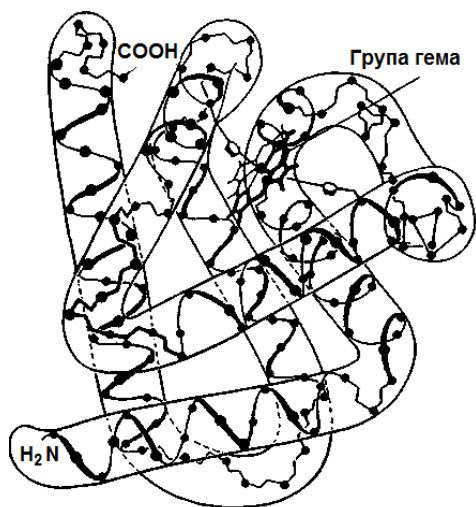


Рис. 2.14. Третинна структура міоглобіну (схематичне зображення молекули).

Основні принципи організації третинної структури білків. Для формування третинної структури найважливіше значення мають різні види зв'язків, що виникають між радикалами певним чином розташованих амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі. Ці зв'язки утворюються в основному за рахунок слабких взаємодій: водневих зв'язків, іонних і гідрофобних взаємодій (рис. 2.14). У ряді випадків третинна структура додатково підтримується міцними ковалентними (дисульфідними) зв'язками, які виникають між залишками цистеїна

усереднені поліпептидного ланцюга.

Слід зазначити, що саме порядок розташування амінокислотних залишків (первинна структура білка) визначає специфіку пакування в просторі всіх елементів білкової молекули. У живій клітині на третинну структуру білка величезний вплив має взаємодія поліпептидного ланцюга з природним розчинником (водою), а також з розчиненими в ній макро- і мікромолекулами (іншими білками, солями металів і так далі). При взаємодії з водним середовищем полярні і неполярні радикали амінокислот поведуться по різному. Полярні радикали (Ser, Thr, Tyr, Asp, Lys, Glu і ін.) гідрофільні, взаємодіють з диполями води і тому зазвичай розташовані на поверхні білкової глобули. Неполярні радикали (Ala, Leu, Ile, Phe і ін.), навпаки, гідрофобні і опиняються усереднені молекули білка, утворюючи гідрофобне ядро. Межі між гідрофобним ядром і зовнішньою поверхнею не завжди виражені, і частина гідрофобних радикалів може виступати на поверхню молекули, що суттєво для контакту між білковими глобулами при утворенні четвертинної структури білків, а також для взаємодії з іншими внутрішньоклітинними молекулами.

Зміна зовнішнього оточення (рН, іонної сили, температури та ін.) здатна викликати денатурацію білків — втрату ними нативної третинної структури, пов'язаної з порушенням внутрішніх молекулярних зв'язків, які підтримують просторову структуру.

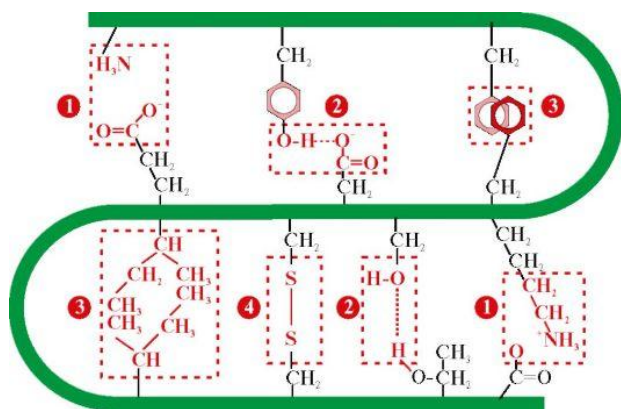


Рис. 2.15. Зв'язки, що стабілізують третинну структуру білків: 1 — іонні; 2 — водневі; 3 — гідрофобні; 4 — ковалентні.

При цьому найуразливішими виявляються водневі і іонні зв'язки. Не дивлячись на те що денатурація не супроводжується руйнуванням ковалентних (пептидних і дисульфідних) зв'язків, білок втрачає свої функціональні властивості, що підкреслює важливість його просторової організації. У певних умовах білки можуть

ренатурирувати — знову прийняти нормальну глобулярну структуру. Перші експерименти по денатурації-ренатурації білків були виконані в 60-і роки ХХ ст. К.Анфінсеном на рибонуклеазі і лізоцимі, а пізніше і на ряді інших білків (трипсиногені, сироватковому

альбуміні, α -амілазі). В ході ренатурації спочатку відновлюються елементи вторинної структури, а потім ділянки поліпептидного ланцюга завдяки силам слабких взаємодій розташовуються в просторі з утворенням доменів, і білок приймає в просторі так звану *розплавлену глобулу*. Уточнення взаємної орієнтації доменів завершує становлення просторової структури, внаслідок чого відновлюється функціональна активність білка (Рис. 2.15.).

Експерименти зі зворотної денатурації стали значним свідомством здатності білків до *самопакування* в просторі — придбання певної третинної структури, детермінованою послідовністю розташування амінокислотних залишків в поліпептидному ланцюзі. З цим пов'язана теорія існування *стереохімічного коду* — закономірностей формування просторової структури з даної первинної структури. Хоча стереохімічний код, який визначає співвідношення між первинною і третинною структурами білка, не розшифрований, зроблені спроби розкрити його основні принципи і передбачити на цій основі просторову структуру білків. Так, згідно теоретичним положенням, сформульованим Л.Б.Меклером, третинна структура білків заснована на *стереокомплементарності* амінокислотних залишків. Відповідно до цієї теорії тривимірні молекули поліпептидів будуються безпосередньо в ході їх синтезу на рибосомах в результаті послідовної комплементарної взаємодії амінокислотних залишків і проходять через стадію розплавленої глобули до «твердого» (компактного) стану. Як і генетичний код стереохімічний код взаємодії амінокислот, ймовірно, має не абсолютний характер, а частково вироджений, що має на увазі певні відхилення від точної запрограмованості третинних структур білків.

Вивчення закономірностей формування третинної структури білків здатне в перспективі сприяє рішення альтернативної задачі: складанню такої первинної структури, яка могла бути орієнтована на створення певної третинної структури, тобто *створення de novo білків, відсутніх в природі*. Поки що, вдається створити невеликі поліпептиди, які складаються з декількох десятків амінокислот і природні білки (міогемеретрин і цитохром), які складаються з α -спіралей, а також окремі поліпептиди, що містять не тільки α -спіралі, але і β -структури (альбебетин). Синтез цих білків на матрицях синтетичних мРНК, а також синтез відповідних генів (кДНК), їх клонування в клітинах бактерій з подальшим виділенням і аналізом структури запрограмованих поліпептидів дають цілком очікувані результати, що можна розцінювати як перші кроки дійсної *білкової інженерії*.

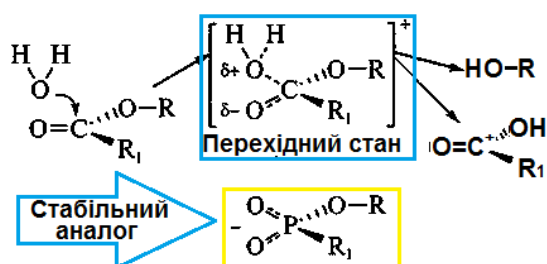
Одним з найбільш перспективних напрямків білкової інженерії є створення *каталітично активних антитіл* — своєрідної групи білків, які отримали назву «*абзими*».

Відомо, що загальною властивістю ферментів і антитіл (імуноглобулінів) є їх здатність специфічно зв'язувати певні молекули (ліганди) — субстрати і антигени. Ще у 1948 р. Л.Полінг, порівнюючи будову цих двох фундаментальних класів білків, прийшов до висновку, що фермент не настільки комплементарний субстрату, як антитіло — антигену. Відомо, що активний центр ферментів формується завдяки унікальному поєднанню певних амінокислотних залишків (радикалів), нерідко достатньо віддалених один від одного в поліпептидному ланцюзі білка, але які зближуються у просторі при формуванні третинної структури білка. При взаємодії з субстратом відбуваються індуковані ним конформаційні зміни в структурі ферменту, внаслідок чого досягається точне і відносно міцне (за рахунок сил слабких взаємодій) зв'язування субстрату з активним центром ферменту. У ензимології цю стадію каталітичного процесу прийнято називати перехідним станом реакції, в процесі якого формується фермент-субстратний комплекс та досягається оптимальна орієнтація реагуючих груп ферменту і субстрату.

На відміну від ферментів імуноглобуліни мають стандартний план будови. Величезна різноманітність антитіл в організмі пояснюється тим, що їх варіабельні ділянки формуються в клітинах імунної системи (В-лімфоцитах) як продукти експресії безлічі різних генів. Завдяки

великій кількості можливих поєднань варіабельних і константних ділянок поліпептидних ланцюгів імуноглобулінів виникає відповідна безліч антитіл, здатних зв'язувати різні антигени. Перші антитіла-ферменти були отримані в 1986 р. Р.Лейнором і П.Шульцем. Ними стали абзими з естеразною активністю, які були отримані імунізацією тварин стабільним аналогом перехідного стану з подальшим відбором клонів В-лімфоцитів, здатних продукувати відповідні антитіла.

У разів ферментативного каталізу, що здійснюється гідролітичними ферментами (естеразами) при гідролізі складних ефірів, в яких атом вуглецю пов'язаний з трьома іншими атомами, після приєднання молекули води утворюється нестабільний перехідний стан. При



цьому атом вуглецю знаходиться в стані тетраедра (рис. 2.16).

Рис. 2.16. Реакція гідролізу складного ефіру карбонової кислоти і структура фосфата — стабільного аналога перехідного стану.

Подальші роботи в області отримання каталітично активних антитіл показали, що абзими здатні прискорювати хімічні реакції в 10⁶—10⁷ разів, тоді як природні ензими — в 10⁹—10¹² разів. Отримані абзими, активні не тільки в реакціях розпаду, але і в реакціях синтезу (наприклад, в реакціях утворення пептидного зв'язку).

У природі каталітично активні антитіла виявлені у людей, страждаючих аутоімунними захворюваннями. ДНК-гідралізуючі антитіла виявлені і в крові хворих лейкозом, променевою хворобою і СНІДом. У крові хворих ревматичним артритом, а також людей, страждаючих раковими захворюваннями, виявлені антитіла з амілолітичною активністю.

Питання про існування каталітично активних антитіл в крові здорових людей залишається відкритим. Не виявлені вони і у хворих грипом, пневмонією і деякими видами раку. Значний інтерес у зв'язку з цим представляє виявлення каталітичних антитіл в молоці людини. Ці антитіла мають протеїназну активність, фосфорилують казеїн і інші білки молока, частина з них здатна гідролізувати ДНК і РНК, інші мають амілолітичну активність. Вважають, що абзими молока можуть грати певну роль в захисті новонароджених від вірусних і бактеріальних інфекцій.

Практичне значення абзимів може бути різноманітним. Воно пов'язане перш за все з тим, що широке природне різноманіття антитіл (1108) створює передумови для утворення біокаталізаторів із заданими властивостями, які відсутні в природі. Велике значення може мати застосування абзимів в біотехнології і медицині. У перспективі абзими можуть бути використані для розділення оптичних ізомерів як природних з'єднань, так і фармакологічних препаратів, що на теперішній час практично не можливо досягнути.

Конформація – основа властивостей білка. Фолдінг.

Формування просторової структури білка в живій клітині є непростю системою взаємодій білкової молекули, що утворилася в процесі трансляції, з білками, які є в клітині. Ці білки можуть вступати у взаємодію з поліпептидним ланцюгом (який синтезується) і ускладнювати формування його структури, запрограмованої в амінокислотній послідовності. У клітинах існує група особливих білків-помічників, безпосередньо призначених для полегшення формування просторової структури поліпептидів, які синтезуються. Процес формування просторової структури білка — фолдінг — процес утворення певних складок, вигинів у поліпептидному ланцюзі, тобто становлення третинної структури білка, яку іноді представляють як групу фолдів, — структур з певним набором і топологією розташування елементів вторинної структури. У 1987 р. було запропоновано називати білки, за допомогою яких здійснюється фолдінг, молекулярними шаперонами (molecular chaperones). Термін

«шаперони» застосовується відносно трьох різних груп білків: нуклеоплазмінів (вони є ядерними нуклеосомними білками), білків Hsp 70-Bip (білки теплового шоку Heat shock proteins і їх гомологів) і власне белків-шаперонів (шапероніни), які мають безпосереднє відношення до згортання поліпептидного ланцюга в нативний білок. Шапероніни є білковими комплексами бактерій, цитоплазми еукаріотичних клітин, матриксу мітохондрій і хлоропластів. Найбільш досліджені шапероніни *E.coli* (GROEL і GROES. GROEL) які складаються з 14 ідентичних протомерів з молекулярною масою 57 кДа кожен (Рис. 2.17.).

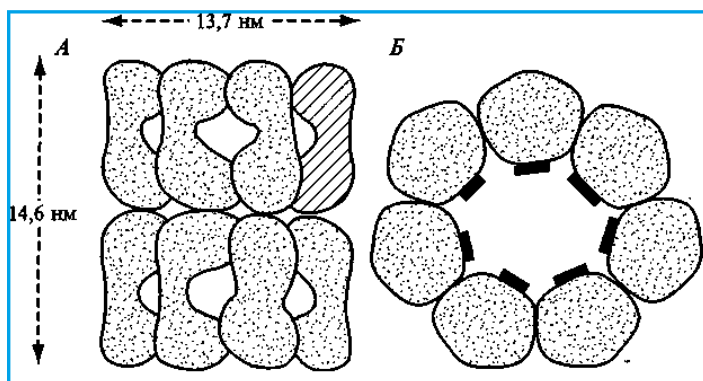


Рис. 2.17. Структура шаперонного комплексу GROEL:

А — вигляд збоку циліндра GROEL, який складається з двох кілець;

Б — вигляд зверху. Темні прямокутники — ділянки зв'язування поліпептиду.

Таблиця 2.2 Функції шаперонів.

| Джерело | Білки фолдингу | Шаперон | Функція |
|----------------------------|---|-----------------------------------|--|
| <i>E.coli</i> | Попередники секреторних білків; ДНК-реплікаційний комплекс | GROEL SECB DNAK/ DNAJ | Затримка згортання перед транспортом; реорганізація білкового комплексу |
| Фотосинтезуючі бактерії | Рібулозо-1,5-бісфосфат-карбоксилаза | GROEL/ GROES | Збірка олігомера |
| Хлоропласти | Рібулозо-1,5-бісфосфат-карбоксилаза | RUSBR | Збірка олігомера |
| Мітохондрії | Мітохондріальні білки-попередники. Білки-попередники в матриксі. | Hsp70 Hsp60 | Завершення транслокації; стабілізація не згорнутих структур в матриксі. Стабілізація не повністю згорнутих структур і згортання. Реекспорт попередників в міжмембранний простір. |
| Ендоплазматичний ретикулум | Секреторні білки. Субодиниці Т-клітинного рецептора. Запасні білки рослин. | Bip TRAP, або p28 b70 (Bip) | Завершення транслокації. Стабілізація неповністю згорнутих структур в каналцях. Збірка рецептора. Стабілізація синтезованих білків. |
| Цитозоль | Синтезовані поліпептиди. Мітохондріальні і секреторні білки-попередники. Білки-рецептори стероїдних гормонів. | Hsc70 Hsc70 Hsp90 | Стабілізація не повністю згорнутих структур. Розгортання перед транслокацією. Стабілізація неактивної форми рецептора. |
| Цитозоль | Білки, що трансформують ретровіруси. | Hsp90 | Стабілізація неактивної форми білка при проходженні через плазматичну мембрану. |
| Ядро | Гістони | Нуклеоплазмін | Збірка нуклеосоми. |

Четвертинна структура характерна для білків, побудованих з декількох поліпептидних ланцюгів. Вона є способом взаємного розташування в просторі окремих поліпептидних ланцюгів в молекулі білка, необхідний для виконання специфічних функцій. Окремі поліпептидні ланцюги, які входять до складу білків, що мають четвертинну структуру, називаються *протомерами*, або *субодуницями*, з яких формується *епімолекула* такого білка-мультимера.

Четвертинна структура підтримується виключно силами слабких взаємодій, тому вона є достатньо лабільною, менш міцною, за третинну та вторинну структури. Міжсубодуничні контакти з'єднуються водневими зв'язками. Істотну роль виконують і гідрофобні взаємодії на контактних *майданчиках субодуниць* (між гідрофобними радикалами амінокислотних залишків). Так, наприклад, епімолекула ферменту алкогольдегідрогенази ссавців, яка складається з двох субодуниць, утворюється завдяки гідрофобній взаємодії 18 амінокислотних залишків і 8 водневих зв'язків між протомерами. Певне місце у формуванні четвертинної структури грають і електростатичні взаємодії.

Білки, що мають четвертинну структуру, як правило, містять парне число субодуниць і є димерами, тетрамерами, гексамерами, октамерами і т. п. Число димерів і тетрамерів різко переважає серед вивчених білків. Парне число субодуниць, ймовірно за все, відображує загальний *принцип симетрії*, властивий живій природі. Білки з непарним числом субодуниць є відносно рідкісним явищем, і частина з них виконує дуже важливі і своєрідні функції у багатьох організмів. Так, *тримерами* є деякі з GTP-зв'язуючих білків (G-білки), головна функція яких полягає в передачі сигналів всередину клітини або в різні її компартменти, хоча частина з них виконує і інші функції (беруть участь в біосинтезі білка і інших енергоємних процесах). До G-білків належить трансдуцин – компонент комплексу білків (трансдуцин-родопсин-фосфодіестераза циклічних нуклеотидів), який передає та посилює світловий сигнал та забезпечує сприйняття та посилення (5×10^5 раз) світлового сигналу в сітчатці ока.

Просторова структура тримера Gi-білка представлена на рис. 2.18. На цьому ж малюнку приведені структури двох інших G-білків: GTP-зв'язуючого чинника елонгації трансляції (біосинтезу білка) EF-TU бактерій і білка Ras, що бере участь в проліферації клітин ссавців.

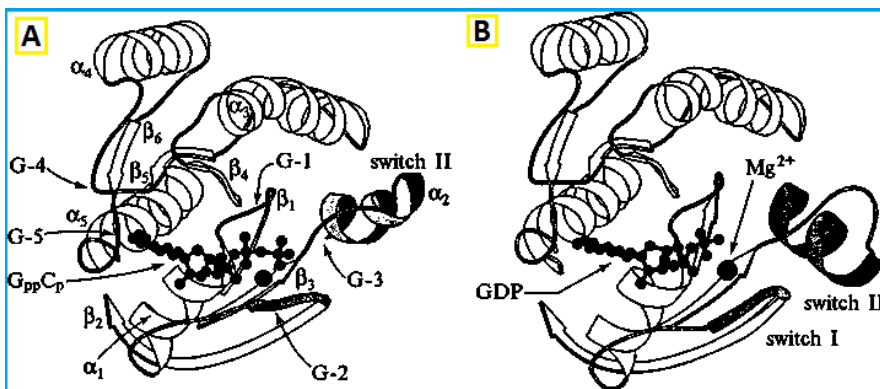





Рис. 2.18. Будова G-білків:
 A, B, — структура білка Ras.
 B — комплекс білка Ras з
 GDP — Mg²⁺;
 A — комплекс білка Ras з
 негідролізованим аналогом
 GTP (G_{ppCp}); β2—α5—α-
 спіралі; β1—β6 — β1- β2
 структури; G1—G5—
 гомологічні області,
 властиві багатьом G-
 білкам.

У складі білків з парним числом субодуниць можуть знаходитись ідентичні або різні по структурі протомери. Так, фермент альдолаза зі скелетних м'язів кролика складається з чотирьох однакових субодуниць, а гемоглобін ссавців (також тетрамери по структурі) містить в своєму складі дві пари різних субодуниць: дві субодуниці типу α і дві субодуниці типу β. Таким чином, четвертинна структура гемоглобіну відповідає формулі 2α2β. У цих вище приведених прикладах тетрамерних білків протомери просторово розташовані у вершинах тетраедра (рис. 2.19). Найбільш яскраві приклади четвертинної структури можна знайти серед каталітично активних білків — ферментів, для яких особливо характерний взаємозв'язок структури і функціональних властивостей.

Рис. 2.19. Модель четвертинної структури гемоглобіну:

-  – α -субодиниці;
-  – β -субодиниці;
-  – групи гема.



Серед білків, що взаємодіють з ДНК, виявлені молекули, які мають своєрідну тороїдальну (кільце) структуру. В цілому утворення замкнених структур (кілець, трубок або сферичних епімолекул) додатково стабілізує четвертинну структуру за рахунок збільшення загального числа контактів між протомерами. До таких білків відносяться, зокрема, «білки ковзаючого затиску (обруча)». Так, у *E.coli* знайдений білок кільцевої форми, який є інтегральною частиною білкового комплексу, що забезпечує реплікацію ДНК. Білки, які розплітають подвійні спіралі ДНК в ході реплікації називаються хеліказами, і також мають кільцеву структуру і є гексамерами. Число субодиниць в мультимерних молекулах тороїдальних білків варіює в широких межах (від 6-7 до 12-15).

Ще більшими молекулами представлені в природі білки ферритини, які скріплюють і депонують залізо у різних видів тварин і рослин. Так, в епімолекулі ферритину тварин, яка є сферичною, міститься 24 субодиниці, між ними розташовуються порожнини (канали) для проникнення оксидів заліза. Усереднені центральної порожнини ферритину комах можуть бути зв'язані 3500 атомів заліза на 1 молекулу білка-мультимера. Аналогічні канали виявлені і у ферритинів рослин (рис. 2.20). Серед ферментів достатньо часто зустрічаються білки, які включають різні по структурі і функціям субодиниці. Гетеродимерну структуру мають протеїнкінази (ферменти, які мають здатність фосфорилувати певні амінокислотні залишки в різних білках), одна з субодиниць яких є власне каталітичною (субодиниця типу С), а інша — регуляторною (R). Гетеромультимером, який складається з декількох різних субодиниць, є і РНК-полімераза. В цілому наявність різних молекулярних форм у білків, що мають четвертинну структуру, є достатньо поширене явище, обумовлене відносною рухливістю окремих субодиниць в епімолекулі. Існування таких множинних форм має фундаментальне значення для регуляції їх функціональної активності в клітині, окремих її компартментах, а також в тканинах і органах вищих організмів.

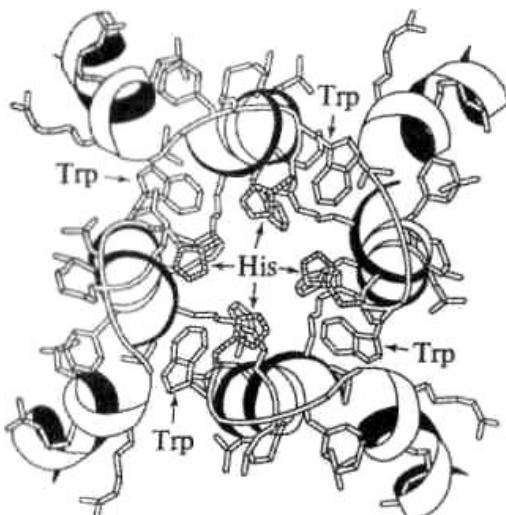


Рис. 2. 20. Структура молекули апоферритина з насіння гороху (комп'ютерне зображення).

В цілому наявність різних молекулярних форм у білків, що мають четвертинну структуру, є достатньо поширене явище, обумовлене відносною рухливістю окремих субодиниць в епімолекулі. Існування таких множинних форм має фундаментальне значення для регуляції їх функціональної активності в клітині, окремих її компартментах, а також в тканинах і органах вищих організмів.

Від *четвертинної структури* слід відрізнити *олігомерний стан білків*. Багато білків мають здатність утворювати структури з кількома поліпептидними ланцюгами, які змінюються в певній пропорції, проте це не пов'язано з виникненням або зникненням специфічних функцій. Так, сироватковий Альбумін бика може існувати не тільки у вигляді мономера (67 кДа), але і у вигляді димера, тримера і тетрамера, що, проте, не веде до появи нових функцій. Не мають, по суті, четвертинну структуру і білкові молекули розщеплювання (обмеженого протеоліза) білків-попередників, які складаються з декількох поліпептидних ланцюгів. Прикладами таких білків можуть служити хімотрипсин (виникає з білка-попередника — *прохімотрипсина* — і складається з трьох поліпептидних ланцюгів) і інсулін. Молекула інсуліну складається з двох поліпептидних ланцюгів — А і В, що містять відповідно 21 і 30 амінокислотних залишків. Ці ланцюги утворюють єдину структуру з дисульфідними зв'язками, яка утворюється з проінсуліну (рис. 2.21).

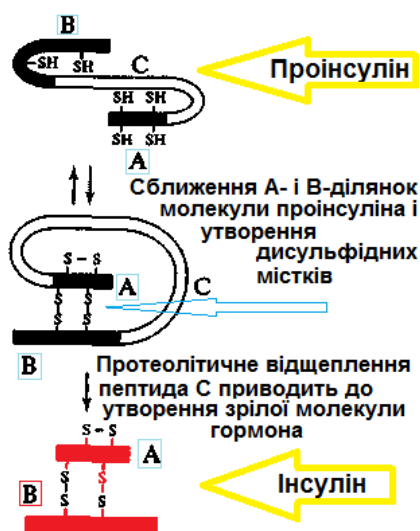


Рис. 2.21. Утворення активної форми інсуліну з проінсуліну.

До *четвертинної структури* не слід відносити і *надмолекулярні білкові і ферментні комплекси* — мультиензимні (поліферментні) комплекси і *метаболони*. Утворення таких структур пов'язане з необхідністю підтримки високих швидкостей метаболічних перетворень в живій клітині.

Принцип ускладнення життєвих форм в процесі біологічної еволюції цілком стосується і еволюції білків. Більшість сучасних білків складаються з декількох сотень амінокислотних залишків, і разом з тим в природі існують біологічно активні, короткі пептиди, які складаються не більше ніж з декількох десятків залишків. Скоріше за все, на ранніх етапах еволюції склався *матричний принцип* біосинтезу білків, який припускає, що довгі поліпептиди з'явилися в результаті нарощування або злиття коротших генів. Збільшення розмірів поліпептидного ланцюга відкривало можливість для утворення ряду вигинів (петель) і відособлення окремих фолдів, ланцюгів, що виникають в процесі згортання (фолдінга), в просторі. Це поступово привело до виникнення вторинної, надвторинної і доменної структури глобулярних білків, тобто до послідовної еволюції їх структури. З іншого боку, злиття генів або впровадження чужорідних (вірусних) генів могло привести до швидкої стрибкоподібної зміни структури білків, появи білкових кон'югатів, до яких, ймовірно, належать вищезазначені поліфункціональні білки. Незвичайні з погляду «традиційної» еволюції білкові структури могли, мабуть, виникати в результаті впровадження вірусних кДНК в геноми вже досить прогресивних форм життя. Виникнення в результаті мутацій алельних варіантів генів, їх рекомбінація ще більше збільшували різноманітність білкових структур, які не мали аналогів серед інших макромолекул.

Функції білків. Білки є найбільш поширеними зі всіх класів біомолекул; вони входять до складу всіх клітинних компонентів організмів.

Одним із шляхів перетворення компонентів амінокислотного пулу організму є синтез білків плазми крові, що беруть участь в підтримці рН крові, визначенні в'язкості, колоїдно-осмотичного тиску, в транспорті гормонів, ліпідів, жирних кислот, пігментів, жиророзчинних вітамінів, підтримці рівня катіонів крові, в згортанні крові, імунних і інших процесах.

Плазма містить понад 1000 білків, але незначна їх кількість визначається в повсякденній клінічній практиці. Більшість білків плазми — глікопротеїни, кількість вуглеводів в їх складі варіює від 1% до 40%. Дослідження білків плазми, окрім специфічної нозологічної інформації, дають певне уявлення про стан білкового обміну в цілому. Основна

маса білків плазми синтезується в печінці. Гепатоцити беруть участь в синтезі 95% альбуміну, в синтезі фібриногену, α - і β -глобулінів, компонентів системи зсідання крові. Велика частина β - та γ -глобулінів синтезується в клітинах імунної системи.

Відповідно до біологічних функцій можна виділити білки – переносники, сигнальні, захисні, структурні, рецепторні, регуляторні, ферменти та ін.

Ферментативна (каталітична) функція. Всі ферменти (біокаталізатори) по своїй хімічній природі є білками або комплексами білків з низькомолекулярними небілковими з'єднаннями (коферментами, кофакторами). Ферменти (Ф.) — протеїни, що містять хіральні ділянки для специфічних субстратів, і є високоефективними біокаталізаторами, які прискорюють хімічні реакції в 10—10¹⁶ разів. («фермент» — від латинського fermentum - «закваска», а синонім «ензим» від грецького «ензюме» означає «в дріжджах»).

Ензими можуть бути однокомпонентними (прості білки), двокомпонентними і багатокомпонентними; більшість з них - глобулярні білки.



Рис. 2.22. Комплементарна взаємодія білка з лігандом.

Комплементарність - це просторова та хімічна відповідність між взаємодіючими молекулами. Активний центр повинен не тільки відповідати ліганду, який входить в нього, але між функціональними групами радикалів активного центру і лігандом повинні утворюватися зв'язки (іонні, водневі, гідрофобні та ін.), які утримують ліганд в активному центрі.

У складі Ф. є активний центр — особлива ділянка в молекулі білка, з якою зв'язується субстрат з утворенням фермент–субстратного комплексу (Ф-С). У поліпептидній послідовності амінокислотні залишки, складові активного центру, можуть знаходитися далеко один від одного, проте завдяки специфічній для кожної білкової молекули упаковці, ці фрагменти просторово зближують. Формування комплексу Ф-С здійснюється, як правило, без ковалентного зв'язування, за рахунок водневих зв'язків, іон-дипольного або ван-дер-ваальсової взаємодії.

У багатьох випадках в безпосередній близькості до активного центру Ф. знаходиться небілковий компонент. Останній отримав назву кофермента (коензиму) або кофактора, а білкова частина — апо-фермента (апоЕ). У якості коферментів можуть виступати як органічні молекули (головним чином вітаміни), так і іони Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Se^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} та ін. У ряді випадків кофактори утворюють з Ф. міцні зв'язки.

В даний час зареєстровано близько 106 Ф. у ссавців їх приблизно 2400. Ф. класифікують не як індивідуальні хімічні сполуки, а за типом реакцій, які вони каталізують. Виділяють шість класів Ф. кожен з яких підрозділяється на підкласи і дрібніші групи.

Оксидоредуктази – окисно-відновлювальні Ф. Їх назва складається з назви відновника (електрона-донора), окислювача (електрона-акцептора) і назви класу. Наприклад, Ф. що каталізує окислення етанолу до ацетальдегіду за участю NAD^+ , носить назву — алкоголь: NAD^+ -оксидоредуктаза або алкогольдегідрогеназа.

Відомо більше 200 біохімічних реакцій окислення спиртових груп до карбонільних і декількох десятків перетворень карбонільних груп у карбоксильні, які протікають за участю нікотинамідних коферментів. Більшість з цих процесів зворотні, але біологічно значимим є тільки один напрям.

Трансферази. Каталізують перенесення різних груп з однієї молекули на іншу. Такого роду перетворення грають надзвичайно важливу роль в синтезі піримідинових і пурінових основ. В якості коферментів, які переносять одновуглецеві фрагменти, в цих реакціях виступають тетрагідрофолат і S-аденозилметіонін. Останній є головним метилуючим агентом у клітинах і бере участь в десятках реакцій, які каталізуються метилтрансферазами. Ензими, які каталізують перенесення альдегідних і кетогруп, представлені транскетолазою і трансальдолазою, що беруть участь в синтезі моно- і полісахаридів.

Ацетилтрансферази каталізують такі важливі біохімічні процеси як перенесення ацильних залишків. Глікозилтрансферази каталізують перенесення глікозильних залишків. Ці Ф. грають провідну роль в синтезі і першому етапі деструкції полісахаридів.

Дуже важливою групою Ф. є амінотрансферази, які каталізують реакції утворення і деградації амінокислот.

Гідролази. Каталізують процеси гідролітичного розщеплювання різних зв'язків. Ферменти, що гідролізують внутрішні пептидні зв'язки в білках, називають протеазами, а що каталізують відщеплення N-кінцевої амінокислоти — амінопептидазою, відщеплення C-кінцевої амінокислоти — карбоксипептидазою, гідроліз нуклеїнових кислот — нуклеазами. Значна частина гідролаз представлена травними ферментами (амілази, ліпази, фосфоліпази, пепсин та т. п.), за допомогою яких полісахариди, що поступають з їжею, жири і протеїни розщеплюються відповідно до моносахаридів, гліцерину і жирних кислот, пептидів і амінокислот. Подальша реутилізація мономерів, що утворилися, в ході процесів анаболізму, які протікають згідно спадковим програмам, приводить до побудови нових біополімерів, властивих даному організму.

Слід підкреслити і таку функцію протеаз, як процесинг білків і РНК. Процесингом називають утворення «зрілих» молекул білків з їх синтетичних попередників. Багато протеїнів реалізують свою активність поза межами клітини (деякі ферменти, гормони, імуноглобуліни), яка їх синтезує і секретує у вигляді пробілків. Попередники ферментів мають назву зимогенів. Вони мають на N-кінці первинного поліпептидного ланцюга спеціальну сигнальну послідовність, що складається з 15—20 амінокислотних залишків. Після відщеплення цієї сигнальної послідовності за допомогою мембранних протеаз білок активується не відразу, а після досягнення ним певної мішені.

Системи протеаз забезпечують перебіг таких важливих фізіологічних процесів, як згортання крові, регуляція АД, розщеплювання чужорідних антигенів після їх зв'язування з антитілом та ін. Порушення нормального функціонування якого-небудь з перерахованих процесів спричиняє розвиток важких патологічних станів. В зв'язку з цим багато протеаз є мішенями для біологічно активних речовин.

Ліази. Вони каталізують процеси негідролітичного розщеплення субстрату з утворенням кратного зв'язку (рідше за цикл), або приєднання за таким зв'язком. Декарбоксилази каталізують відщеплення CO_2 від карбонових кислот. Наприклад, піровиноградна кислота, яка утворюється при спиртовому бродінні глюкози, декарбоксилює під дією піруватдекарбоксилази з утворенням оцетового альдегіду.

Ферментативним шляхом відбувається декарбоксилювання ряду амінокислот з утворенням важливих нейромедіаторів. Так, L-глутамінова кислота під дією глутаматдекарбоксилази перетворюється на ГАМК. Інший Ф. цієї ж групи — декарбоксилаза ароматичних амінокислот — каталізує декарбоксилювання I-(3,4-диоксифеніл) - аланіна (L-ДОФА), який перетворює на норадреналін.

Ряд ліаз каталізують реакцію конденсації амінокислоти з ОН-групою 3'-кінцевого аденозина в транспортній РНК (тРНК). В результаті таких реакцій, які відбуваються з кожною з 20 амінокислот, що входять до складу білків, останні виявляються розподіленими в суворій відповідності з тРНК. Це має вирішальне значення при збірці білкових молекул на рибосомах, де розпізнавання здійснюється не по амінокислотними залишками, а за пов'язаними з ними тРНК.

Ізомерази. Каталізують процеси ізомеризації, за допомогою яких відбувається згортання конфігурації при асиметричному атомі вуглецю. Ензим каталізує згортання конфігурації в обох напрямках, що приводить до утворення рацемазної суміші. Такі ферменти отримали назву рацемаз.

За наявності в молекулі декількох хіральных центрів звернення конфігурації при

одному з них приводить до утворення диастереомерної пари. Ферменти, що каталізують такі процеси, називають епімеразами. Вони грають важливу роль у взаємоперетвореннях вуглеводів.

Слід зазначити, що не всі біохімічні процеси, які завершуються ізомеризацією якогонебудь субстрату, каталізують ферменти цього класу. Наприклад, перетворення лимонної кислоти в ізолимонну здійснюється за участю ліази.

Лігази (синтетази). Каталізують реакції конденсації або приєднання, які пов'язані з піролізом одного з пірофосфатних зв'язків в молекулі АТФ або ГТФ. Наприклад ДНК-лігази забезпечують з'єднання під час реплікації фрагментів Оказакі.

Принципи дії ферментів. В якості моделі Ф-С взаємодії більше 60 років проіснувала аналогія «замок-ключ», запропонована в кінці XIX ст. Edmond H. Fischer. Суть її в тому, що до ферменту (замку) підходить лише свій субстрат (ключ). У 1959 р. Daniel Edward Koshland була запропонована гіпотеза «індукованої відповідності». Згідно цієї загальноновизнаної в даний час моделі пов'язання фермента з відповідним йому субстратом в білку індукує невеликі конформаційні зміни. В результаті каталітичні групи Ф. орієнтуються таким чином, що стає можливим перетворення субстрата на продукт. Модель індукованої відповідності допускає також деяку конформаційну перебудову в молекулі субстрата, яка отримала назву напруги. Гіпотеза про виникнення конформаційних змін у ферменті і субстраті при їх скріпленні дозволяє пояснити той факт, що молекули, дуже близькі за будовою до дійсного субстрату, можуть зв'язуватися з ферментами., але при цьому не перетворюються на продукт, тобто діють як інгібітори.

Швидкість (10¹⁰–10¹⁶) ферментативної реакції залежить від природи реагуючих речовин (субстрата і фермента), їх концентрації, температури, концентрації коферментів, рН, а також від концентрації активаторів і інгібіторів ферментів.

Структурна функція. Білки є складовою структури біомембран, основою цитоскелета (мікротрубочки, мікрофіламенти), міжклітинного матриксу (колаген, еластин) і певних спеціалізованих тканин (кератини).

Колаген, найбільш поширений білок ссавців, утворює основу сухожиль, кісток, шкіри, зубів і хрящів. Структурною одиницею колагенового волокна є тропоколагенова молекула, яка складається з трьох поліпептидних ланцюгів, кожен з яких містить близько 1000 амінокислотних залишків. Залежно від функції колагену його поліпептидні ланцюги або ідентичні, або мають досить близькі послідовності.

Амінокислотний склад колагену незвичайний. По-перше, приблизно одну третину всіх залишків складають залишки гліцину, і, по-друге, має велику кількість залишків проліну. Крім того, в колагені зустрічаються залишки двох амінокислот, що зазвичай не виявляються в білках, - гідроксипроліна і гідроксилізіна. Бічні ланцюги цих амінокислот містять гідроксильну (ОН) групу, приєднану до одного з вуглецевих атомів замість атома водню. Гідроксилування здійснюється специфічними ферментами після включення проліну або лізіну в поліпептидний ланцюг колагену.

Кератин - важливий білковий компонент волосся, шерсті, нігтів, кігтів і пір'я. В одній з форм, яку називають ос-кератином, в основі структури поліпептидного ланцюга лежить права α -спіраль. У кератині два, а можливо і три ланцюги закручені один навколо іншого та утворюють певну закручену (coiled-coil) структуру, яка називається протофібрила. 11 протофібрилл формують мікрофібрилу, а декілька мікрофібрил - кератинове волокно. α -кератини легко розтягуються, оскільки при витягуванні розриваються водневі зв'язки і поліпептидні ланцюги набувають β -структурну конформацію. При цьому утворюються міжланцюгові водневі зв'язки і формуються β -шари. Кератини з такою структурою мають назву β -кератини.

Регуляторні білки. У всіх клітинах експресія генів контролюється регуляторними

білками, які зв'язуються з певною ділянкою ДНК і таким чином стимулюють або пригнічують транскрипцію гена. Для дії регуляторних білків необхідна присутність ліганду. Постійно відкривають все нові і нові регуляторні білки, на даний час відома, ймовірно, тільки мала їх частина. Регуляторний білок, який впливає на транскрипцію генів, називають чинником транскрипції. Білок, який пригнічує транскрипцію, називається репресором, а стимулюючий — індуктором.

Регуляторні білки – гормони беруть участь у різних фізіологічних процесах. Наприклад, гормон інсулін складається з двох α -ланцюгів, сполучених дисульфідними містками. Інсулін регулює обмінні процеси за участю глюкози, його відсутність веде до діабету.

У гіпофізі мозку синтезується гормон, який регулює ріст організму. Існують регуляторні білки, які контролюють біосинтез різних ферментів в організмі. Білкову і пептидну природу мають численні біорегулятори – гормони, медіатори і модулятори, які виробляються в ендокринній системі, нейронах головного мозку, імунній системі: прості білки (інсулін, глюкагон та ін.), глікопротеїни (тропні гормони гіпофіза та ін.), низькомолекулярні пептиди (окситоцин, вазопресин, опіоїдні пептиди мозку, пептиди тимоцитів та ін.).

Біорегулятори – природні регулятори життєво важливих функцій людського організму. Ця велика група біологічно активних речовин контролює серцеву діяльність, дихання, тонус м'язів і судин травлення, імунітет, а також вищу психічну діяльність - емоції, мислення, пам'ять. Біорегулятори ще називають «гормональною» або «біохімічною» зброєю.

Чіткого визначення терміну «біорегулятор», як і класифікації, на сьогодні не існує. Це численна і різноманітна група речовин. До біорегуляторів відносять гормони, цитокініни, простагландини, лейкотрієни, медіатори, ферменти і багато інших речовин. Загальною ознакою для всіх цих з'єднань є висока біологічна активність у дуже малих дозах -1×10^{-15} і навіть 1×10^{-18} молей.

Рецепторна функція. Білкову природу мають мембранні рецептори для фізіологічно активних з'єднань, які приймають хімічний сигнал від гормонів, нейромедіаторів (адренорецептори, холіноорецептори, рецептори гістаміну та ін.), біологічно активних речовин (БАР) та ін. Для лікаря і фармацевта дуже важливо знати принцип взаємодії ЛІКИ-РЕЦЕПТОРИ.

Клітини як правило, містять велику кількість різних мембранних, цитоплазматичних та ядерних рецепторів БАР: іонні канали, ферменти, нейромедіатори, транспортні системи і гени. Вони необхідні організму для нормального функціонування і адекватного реагування на зміни зовнішнього і внутрішнього середовища та для підтримки гомеостазу. Наявність у живих істот органів, які сприймають зовнішні сигнали, була відмічена вченими ще в глибокій старовині. Проте розуміння ролі рецепторів як внутрішньої системи «органів чуття», яка дозволяє організмам адаптуватися до навколишнього середовища, почало складатися тільки в кінці XIX ст. Засновником рецепторної теорії дії ліків слід вважати Р. Ehrlich (1907 р.). Він вперше запропонував термін «рецептор» і сформулював основний постулат: «*corpora non agunt nisi fixata*» — «речовини не діють, якщо не фіксуються». Це узагальнення стало теоретичною базою хіміотерапії. Р. Ehrlich припускав, що клітини містять так звані бічні гілки, або рецептори, в результаті селективної взаємодії з якими ЛР індукують свій ефект. Згідно цієї теорії, ліки мають два структурні фрагменти, один з яких, з'єднуючись з рецептором, дозволяє тим самим іншому фрагменту здійснювати біологічну відповідь. Численні дослідження підтвердили правильність теорії Р. Ehrlich про рецептори як ділянки тканин, які зв'язують ЛР та здійснюють реалізацію їх фармакологічних ефектів.

В узагальненому вигляді поняття «рецептор» можна сформулювати таким чином: рецептором може бути будь-яка високомолекулярна конформаційно рухома біоструктура, яка специфічно зв'язує хімічну сполуку (ліганд, ліки) на поверхні або поза клітиною і трансформує отриману інформацію в біологічну відповідь. До таких макромолекул

відносяться білки і нуклеїнові кислоти. Специфічну взаємодію ліганду з рецептором слід відрізняти від неспецифічного скріплення ендогенних або екзогенних БАР з білками плазми крові або мукopolісахаридами сполучної тканини. Білкові структури такого типу отримали назву «мовчазних» рецепторів. В результаті зв'язування з ними не реалізуються ніякі ефекти. Плазмові білки кількісно, а не якісно впливають на прояв ефектів ЛР.

На початку 90-х рр. було виявлено більше 30 груп різних рецепторів. В останнє десятиріччя, завдяки розшифровці генома людини, цей список значно розширився і продовжує поповнюватися.

Рецептори поділяють на 4 типи:

- рецептори, які здійснюють контроль за функцією іонних каналів (Н-холінорецептори, ГАВАА-рецептори, глутаматні рецептори);
- рецептори, зв'язані з ефектором через систему G-протеїни — вторинні посередники або G-протеїни — іонні канали (рецептори деяких білкових гормонів і пептидів — ангіотензину, брадикініну, ендотеліну і др.; біогенних амінів — адреналіну, дофаміну, гістаміну, серотоніну; ліпідів — канабіноїдів, простагландинів, лейкотрієнів, тромбоксанів; нуклеозидів і нуклеотидів — аденозина, АТФ, АДФ та ін., а також іонів Ca^{2+});
- рецептори, які здійснюють прямий контроль за функцією ефекторного ферменту (вони безпосередньо пов'язані з тирозинкіназою і регулюють фосфорилування білків — рецептори інсуліну і гормонів зростання);
- рецептори, які контролюють транскрипцію ДНК — розчинні цитозольні або ядерні білки (рецептори стероїдних і тиреоїдних гормонів).

Перші три типи рецепторів належать до мембранних, а останній — до ядерних. Найбільша кількість рецепторів — це білки, точніше ліпо- або глікопротеїни, які розташовуються на мембрані цитоплазми або мембранах органели клітини. Вони можуть пронизувати всю товщу мембрани або знаходитися з її внутрішнього боку. Якщо ліганди рецептора є гідрофільними молекулами, наприклад, нейромедіатори, то зв'язуючі ділянки рецептора повинні обов'язково знаходитися із зовнішнього боку клітини. Рецептори гідрофобних молекул не щільно зв'язані з мембранами, і тому комплекси, які утворюються з лігандами, можуть виходити з мембрани в цитоплазму.

В процесі еволюції утворилися також рецептори, які локалізуються поза клітиною. Їх ліганди, наприклад, стероїдні або тиреоїдні гормони, мають здатність за рахунок своїх гідрофобних властивостей проникати через мембрани шляхом пасивної дифузії або активного транспорту. Структура і функції внутрішніх рецепторів менш вивчені, ніж мембранних, оскільки перші важко виділити, не змінивши при цьому їх первинної структури. Відома присутність рецепторів різних лігандів на рибосомах, в ядрі, в комплексі Гольджі, в мікросомах.

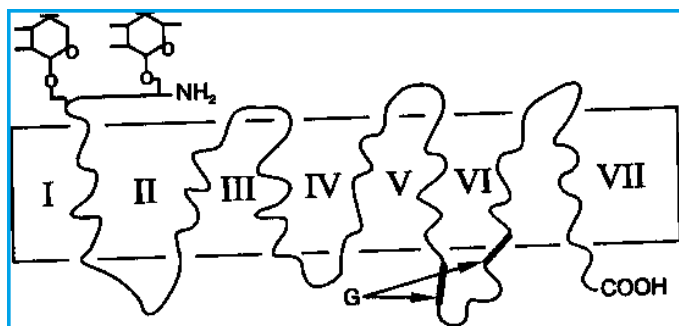


Рис.2.23. Схематичне зображення рецептора, пов'язаного з G-білками: G — домени, що забезпечують зв'язування з G-протеїнами

Рецептори, передача сигналів від яких здійснюється за участю G-протеїнів, мають один поліпептидний ланцюг з 7-ма трансмембранними α -спіралями, а ланцюг, що знаходиться ззовні мембрани з термінальною NH_2 -групою, глікозилований.

Вигини клітини у цитоплазму, розрізняються за кількістю амінокислотних залишків. Перший складається з 10—20 амінокислот, другий містить до 20 і третій — до 50 амінокислотних залишків. На третьому вигині розташовані ділянки зв'язування з G-протеїнами. Закінчується G-зв'язаний рецептор ланцюгом з 100 амінокислот та має кінцеву карбоксильну групу, яка

також забезпечує зв'язування з G-білками. Завдяки рентгено-структурному дослідженню (РСД) бичачого родопсину була вперше запропонована тривимірна (3D) модель рецептора, пов'язаного з G-білками.

На теперішній час в результаті розшифровки генома людини виявлено декілька сотень рецепторів, пов'язаних з G-білками. З них тільки 30 є мішенями поширених ЛР, а для 210 — ідентифіковані лише ендogenous ліганди. До цих груп належать рецептори пептидів, біогенних амінів, нуклеозидів і лейкотрієнів. Приблизно 160 рецепторів, виявлених в людському геномі, відносять до так званих «рецепторів-сиріт», оскільки їх ліганди і фізіологічні функції ще не встановлені.

Відособлену групу утворює родина рецепторів, в передачі сигналів від яких бере участь тирозинкіназа. До них належать інсулінові рецептори і рецептори чинників зростання. Тірозиновий домен знаходиться поза клітиною. Екстрацелюлярна частина містить ділянки, багаті цистеїновими залишками, які, ймовірно, і забезпечують вторинну структуру, необхідну для лігандів.

Характерною особливістю внутріклітинних рецепторів стероїдних гормонів є наявність домена, здатного зв'язувати поліпептидні ланцюги з лігандом за рахунок Zn-пальців: цистеїнові залишки оточують атоми Zn і забезпечують зв'язок з ДНК.

Взаємодія лігандів з рецепторами здійснюється завдяки утворенню або водневих та координаційних зв'язків, або комплексів з перенесенням заряду іон-іонної, іон-дипольної або дисперсійної взаємодії.

Транспортна функція. Білки зв'язують і здійснюють міжклітинний і внутріклітинний (трансмембранний цитоплазматичний) транспорт різних лігандів – біомолекул, іонів металів, чужорідних хімічних сполук (ксенобіотиків). Транспортними білками крові є сироваткові альбуміни (переносять жирні кислоти, білірубін, лікарські і токсичні з'єднання), гемоглобін еритроцитів (транспортує кисень), ліпопротеїни (транспортиують ліпіди), трансферин (транспортує залізо).

Гемоглобін (Рис. 2.19.) – це білок, що здійснює транспорт кисню від легенів до тканин і вуглекислого газу від тканин до легенів. Гемоглобін міститься в еритроцитах. Молекула гемоглобіну складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів - двох ідентичних α -ланцюгів (що позначаються α_1 та α_2) та двох ідентичних β -ланцюгів (що позначаються β_1 та β_2). Кожен ланцюг пов'язаний з гемом. Міоглобін - це білок, який переносить кисень у м'язових клітинах. Він складається з одного поліпептидного ланцюга і має один гем.

Третинна структура α - і β -ланцюгів гемоглобіну і ланцюга міоглобіну виявилися схожими. Гем складається з атомів вуглецю, азоту і водню, які утворюють плоске кільце - порфірин. У центрі цього кільця знаходиться атом заліза, пов'язаний з атомами кільця чотирма з шести своїх можливих координаційних зв'язків.

Дезоксигемоглобін - це гемоглобін, не пов'язаний з киснем. У дезоксигемоглобіні атом заліза знаходиться поза площиною порфіринового кільця і, крім того, є декілька сольових містків і водневих зв'язків, яких немає в оксигенованій формі білка.

Оксигемоглобін - це гемоглобін, пов'язаний з киснем. Кисень займає шосте координаційне положення атома заліза гема та розташовується поряд із далеким залишком гістидину. При зв'язуванні кисню атом заліза переміщується в площину порфіринового кільця. Одночасно відбуваються і деякі інші конформаційні зміни.

Гемоглобін плоду людини (фетальний гемоглобін) відрізняється від гемоглобіну дорослих тим, що в ньому два β -ланцюга замінені двома γ -ланцюгами. Гемоглобін плоду зв'язує ДФГ слабше, ніж дезоксигемоглобін дорослих, і тому має вищу спорідненість до кисню. В результаті, коли кров плоду збагачується киснем за рахунок материнської крові, яка є в плаценті, кисень переходить від матери до плоду з високою ефективністю.

Серпоподібноклітинна анемія – захворювання, яке виникає при заміні залишку

глутамінової кислоти в шостому положенні β -ланцюга гемоглобіну на залишок валіну. Ця єдина зміна приводить до зменшення розчинності дезоксигемоглобіна і до появи здатності агрегувати з утворенням довгих волокон. В результаті еритроцити набувають витягнутої форми, яка нагадує серп. Деформовані таким чином, вони можуть закупорювати капіляри, порушуючи нормальний кровообіг, або легко піддаватися лізису, що і є безпосередньою причиною анемії.

Скоротлива функція. Білки є молекулярними структурами, які реалізують скоротливу функція м'язів (актин, міозин), джгутиків і війок (тубуліни, динеїни). Скоротливі і рухові білки додають організму здатність скорочуватися, змінювати форму і переміщуватися. 40% від маси всіх білків, що містяться в м'язах, складає міозин (mys, myos, греч. – м'яз). Його молекула містить одночасно фібрилярну і глобулярну частини.

Такі молекули об'єднуються в великі агрегати, що містять 300–400 молекул. При зміні концентрації іонів кальцію в просторі, що оточує м'язові волокна, відбувається зворотна зміна конформації молекул – зміна форми ланцюгу за рахунок оберту окремих фрагментів навколо валентних зв'язків. Це приводить до скорочення і розслаблення м'язів. Сигнал для зміни концентрації іонів кальцію поступає від нервових закінчень у м'язових волокнах. Штучне скорочення м'язів можна викликати дією електричних імпульсів, що приводять до різкої зміни концентрації іонів кальцію. На цьому заснована стимуляція серцевого м'яза для відновлення роботи серця.

Захисна функція. Білки виконують функцію імунного захисту (імуноглобуліни, лимфокіни, інтерлейкіни), протидіють кровотечі і тромбоутворенню (білки згортаючої системи крові, антикоагулянти і фібринолітичні).

Захисні білки дозволяють уберегти організм від вторгнення бактерій, вірусів і від проникнення чужорідних білків (узагальнена назва чужорідних тіл – антигени). Роль захисних білків виконують імуноглобуліни (інша їх назва – антитіла), вони розпізнають антигени, що проникли в організм, і міцно зв'язуються з ними. У організмі ссавців, включаючи людину, є п'ять класів імуноглобулінів: M, G, A, D і E.

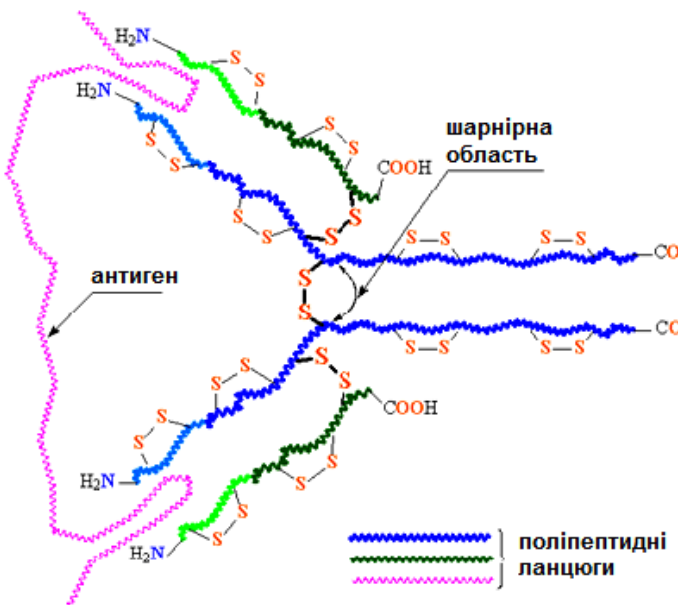


Рис.2.24. Структура імуноглобуліну (схематичне зображення).

Їх структура глобулярна, та всі вони схожі за будовою. Молекулярна організація антитіл показана на прикладі імуноглобуліну класу G (рис.2.24). Молекула містить чотири поліпептидні ланцюги, об'єднані трьома дисульфідними містками S-S (на рис. вони показані з потовщеними валентними зв'язками і крупними символами S), крім того, кожен полімерний ланцюг містить внутрішньоланцюгові дисульфідні перемички. Два великих полімерних ланцюга містять 400-600 амінокислотних

залишків. Два інших ланцюга майже удвічі коротші, вони містять приблизно 220 амінокислотних залишків. Всі чотири ланцюги розташовано таким чином, що кінцеві H_2N -групи направлені в один бік.

Молекула складається з чотирьох полімерних ланцюгів, сполучених дисульфідними містками -S-S-, які відмічені потовщеними валентними зв'язками і символами S. У центральній частині молекули знаходиться шарнірна ділянка, яка забезпечує незалежну

рухливість ділянок захоплення.

Після контакту організму з чужорідним білком (антигеном), клітини імунної системи починають виробляти імуноглобуліни (антитіла), які накопичуються в сироватці крові. На першому етапі основну роботу здійснюють ділянки ланцюгів, що містять кінцеві H_2N . Це ділянки захоплення антигенів. В процесі синтезу імуноглобуліну ці ділянки формуються таким чином, щоб їх будова і конфігурація максимально відповідали структурі антигена, який наблизився (як ключ до замку, подібно до ферментів, але завдання в даному випадку інші). Таким чином, для кожного антигена створюється строго індивідуальне антитіло, як імунна відповідь. Окрім імуноглобулінів «пластично» змінювати будову залежно від зовнішніх чинників не може жоден відомий білок. Ферменти вирішують задачу структурної відповідності реагенту іншим шляхом – за допомогою гігантського набору різноманітних ферментів з розрахунку на всі можливі випадки, а імуноглобуліни кожного разу наново перебудовують «робочий інструмент». Крім того, шарнірна ділянка імуноглобуліну забезпечує двом ділянкам захоплення деяку незалежну рухливість, в результаті молекула імуноглобуліну може «знайти» відразу дві найбільш зручні для захоплення ділянки в антигені з тим, щоб його надійно зафіксувати.

Далі включається ланцюг послідовних реакцій імунної системи організму, підключаються імуноглобуліни інших класів, в результаті відбувається дезактивація чужорідного білка, а потім знищення і видалення антигена (стороннього мікроорганізму або токсину).

Після контакту з антигеном максимальна концентрація імуноглобуліну досягається (залежно від природи антигена і індивідуальних особливостей самого організму) протягом декількох годин (іноді декількох днів). Організм зберігає пам'ять про такий контакт, і при повторній атаці таким же антигеном імуноглобуліни накопичуються в сироватці крові значно швидше і в більшій кількості – виникає набутий імунітет.

Імуноглобулін G. Приблизно 75% імуноглобулінів плазми представлено IGG — головним класом антитіл, що продукуються при вторинній відповіді. IGG краще, ніж інші імуноглобуліни, проходить у позасудинний простір, а також через плаценту, забезпечуючи пасивний імунітет новонародженим в перші тижні життя. Імуноглобуліни нейтралізують бактеріальні токсини і зв'язуються з мікроорганізмами, підсилюють фагоцитоз.

Імуноглобулін A — головний клас антитіл в секретах (сльоза, слина, респіраторні секрети, сечостатевої і шлунково-кишкочові секрети). Імуноглобуліни існують у вигляді імуноглобулінових одиниць або у вигляді димерів, зв'язаних секреторною одиницею (MM 60 000) і додатковим пептидним ланцюгом (J-ланцюг, MM 20000). IGA покривають мікроорганізми і пригноблюють їх здатність прикріплюватися до поверхні слизових оболонок.

Імуноглобулін M — головний клас антитіл, що секретується на ранніх стадіях первинної імунної відповіді. Ці імуноглобуліни є полімерами п'яти імуноглобулінових одиниць, об'єднаних навколо J-ланцюга. Вони в основному прикріплені до поверхні судин і є ефективними цитолітичними антитілами. Після народження рівні IGM прогресивно зростають, оскільки новонароджені піддаються антигенному стимулюванню. Визначення IGM у новонароджених використовується як індикатор внутрішньоматкової інфекції.

Імуноглобулін D виявлений на поверхні неактивованих В-лімфоцитів, де він, ймовірно, виконує функцію рецепторів для антигенів. Концентрація імуноглобулінів даного типу в плазмі дуже низька.

Імуноглобулін E представлений антитілами, пов'язаними з поверхнею тучних клітин. У плазмі IGE присутній в незначній кількості. Зв'язування антигену приводить до дегрануляції тучних клітин з вивільненням активних амінів (гістамін), що підвищують реакції гіперчутливості.

Приведена функціональна класифікація білків носить певною мірою умовний

характер, наприклад білок тромбін, згаданий серед захисних білків, по суті є ферментом, що каталізує гідроліз пептидних зв'язків, тобто, відноситься до класу протеаз.

Пріони.

Термін "пріон"(proteinaceous infectious particle) з'явився у зв'язку з дослідженням ряду нейродегенеративних захворювань з невідомою етіологією, таких, як скре́пі овець і хворобу Крейцфельда-Якоба у людини. І хоча ці хвороби відомі досить давно, природа їх залишалася загадкою достатньо довго. Пояснення такого повільного ходу досліджень полягало в незвичайному способі виникнення цих хвороб: вони можуть виникати спонтанно і в той же час можуть успадковуватися і передаватися інфекційним шляхом. Довгий час комбінація цих трьох властивостей здавалася нез'ясованою.

Патологічний і нормальний стани пріона не відрізняються первинною структурою (Рис. 2.25.). Для виникнення патології досить зворотної конформаційної зміни, т.б. пріонної конверсії. Інфекційність обумовлена тим, що полімер, який потрапив в клітину в результаті схрещування або із зовнішнього середовища, може приєднати до себе мономер і розростатися, конвертуючи білок в пріонну форму. При діленні полімери передаються дочірнім клітинам.

Основними властивостями пріонних білків є здатність до агрегації і до виникнення *de novo*, наявності безлічі патологічних конформаційних варіантів і спадкоємство патологічної конформації. Пріонним полімерам характерна також стійкість до денатуруючих агентів і деяких протеаз, наприклад, хімотрипсину. Останню властивість проявляють і амілоїдні агрегати, проте вони не успадковуються і не інфекційні, конформаційних варіантів для них теж доки не виявлено.

Впродовж тривалого часу усі відомі прояви пріонного феномену були пов'язані лише з одним білком PrP, що викликає спонгиформні енцефалопатії худоби і хвороба куру у людини. PrP - мембранний білок, є маркером стовбурових клітин і бере участь в їх оновленні (Zhang et al, 2006). Функціональна роль пріонного білка PrP поки не відома, але було показано, що PrP може зв'язуватися з іонами міді. Передбачається що такий комплекс, за допомогою ендоцитоза потрапляючи в клітину, потім дисоціює, і іон міді переноситься з ендоцитозного пухирця в цитоплазму.

Пріонна ізоформа білку відрізняється від клітинної тільки по вторинній структурі. Вона має в основному бета-складчасту структуру, а клітинна форма – в основному альфа-спіральну. Це вірно, як для білку ссавців PrP, так і для усіх інших знайдених пріонів, у тому числі і Sup35 .

Пріонна форма PrP дістала назву PrP^{Sc} (від хвороби scrapie). Вона є особливою ізоформою нормального клітинного білку PrP – PrP^C (від cellular) – яка відрізняється поганою розчинністю в детергентах, стійкістю до дії протеаз, а також схильністю до агрегації.

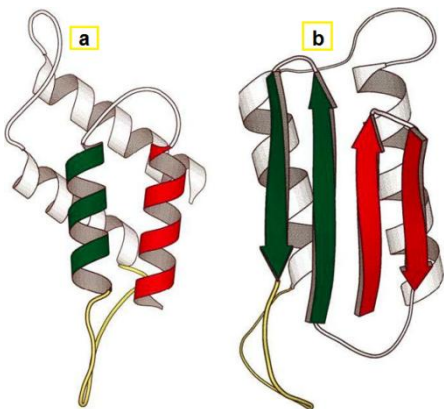


Рис. 2.25. Просторова організація пріонів: a - PrP^C; b - PrP^{Sc}.

Білок, з якого складаються пріони (PrP), можна знайти в усіх частинах тіла у здорових людей і тварин. Проте в уражених тканинах є присутнім PrP, який має аномальну структуру і стійкий до протеаз, що гідролізують білки. Нормальна форма називається PrP^C, а інфекційна — PrP^{Sc}. PrP^C — нормальний мембранний білок, який у людини кодується геном PRNP. Зріла форма PrP складається з 208 амінокислотних залишків і має молекулярну масу 35-36 кДа. У просторовій структурі PrP

виділяють неструктуровану N—кінцеву ділянку (у людини 23-125 амінокислотних залишків — а.з.) і глобулярний домен (а.з. 126-231), що складається з трьох α -спіралей і дволанцюгового антипаралельного β -листа.

Відомі декілька топологічних форм PrP: дві трансмембранні і одна закріплена на мембрані гліколіпідним якорем. Утворення PrP^C відбувається на ЕПР, подальше дозрівання — у комплексі Гольджі, звідки він за допомогою мембранних везикул доставляється до плазмолемі. Після цього він або закріплюється на мембрані після руйнування ендосоми, або ж піддається ендоцитозу і руйнується в лізосомах.

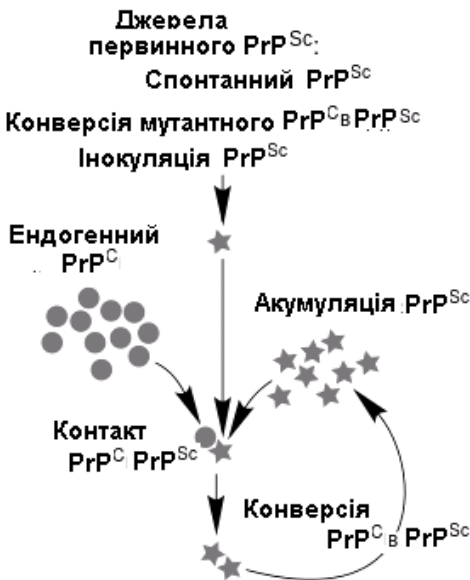


Рис. 2. 26. Гетеродимерна модель розмноження пріонів.

На відміну від нормальної, розчинної форми білку, пріони осаджують високошвидкісним центрифугуванням (стандартний тест на наявність пріонів). PrP^C має високу спорідненість до катіонів двовалентної міді. Можливо, це має якесь відношення до його структури або функцій. Є дані, що PrP відіграє важливу роль в прикріпленні клітин, передачі внутрішньоклітинних сигналів, а тому може бути залучений в комунікацію клітин мозку. Проте, функції PrP ще досліджені недостатньо. Інфекційна ізоформа пріона PrP^{Sc} здатна перетворювати нормальний білок PrP^C на інфекційну ізоформу, змінюючи його конформацію (тобто третинну структуру); це змінює взаємодії PrP з іншими білками.

Першою гіпотезою, що пояснює розмноження пріонів без участі інших молекул, зокрема нуклеїнових кислот, була гетеродимерна модель. Згідно з цією гіпотезою, одна молекула PrP^{Sc} приєднується до іншої молекули PrP^C і каталізує її перехід в пріонну форму. Дві молекули PrP^{Sc} після цього розходяться і продовжують перетворювати інші PrP^C на PrP^{Sc}. Проте модель розмноження (реплікації) пріонів повинна пояснювати не лише механізм, але і те, чому спонтанна поява пріонів так рідкісна. Манфред Ейген показав, що гетеродимерна модель вимагає, щоб PrP^{Sc} був фантастично ефективним каталізатором: він повинен підвищувати частоту перетворення нормального білку в пріонну форму в 10¹⁵ разів. Такої проблеми не виникає, якщо допустити, що PrP^{Sc} існує тільки в агрегованій (н., амілоїдній) формі, де кооперативність виступає як бар'єр для спонтанного переходу в пріонну форму. На додаток до цього, незважаючи на докладені зусилля, виділити мономірний PrP^{Sc} так і не вдалося.

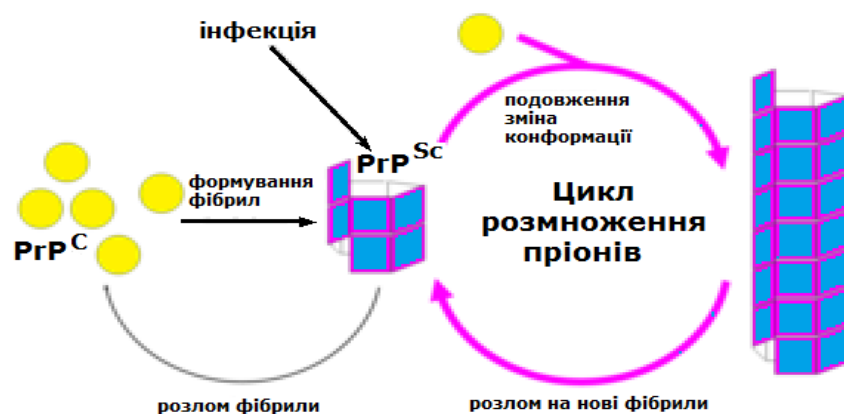


Рис. 2.27. Фібрилярна модель розмноження пріонів

Альтернативна фібрилярна модель припускає, що PrP^{Sc} існує тільки у вигляді волокнини, при цьому кінці волокнини зв'язують PrP^C, де він перетворюється на PrP^{Sc}. Якби це було тільки так, то чисельність пріонів зростала

б лінійно. Проте протягом розвитку пріонного захворювання спостерігається

експоненціальне зростання кількості PrP^{Sc}. Це можна пояснити, якщо взяти до уваги розкол волокнини. У організмі розламування волокнини здійснюється білками-шаперонами, які зазвичай допомагають очистити клітину від агрегованих білків.

Механізм реплікації пріонів має значення для розробки ліків. Оскільки інкубаційний період пріонних захворювань надзвичайно довгий, ефективним лікам зовсім необов'язково знищити усі пріони, досить знизити швидкість експоненціального зростання їх кількості. Моделювання передбачає, що найефективнішим препаратом був би такий, який зв'язується з кінцями волокнини і блокує їх зростання.

Функції PrP. Одним з пояснень нейродегенерації, яку викликають пріони, може бути порушення функціонування PrP. Проте нормальна функція цього білка вивчена не до кінця. Дані *in vitro* вказують на безліч різноманітних ролей, а експерименти на мишах, «нокаутованих» цим геном, дали відносно не багато інформації, оскільки у цих тварин спостерігалися лише малі відхилення від норми. Дослідження, проведені на мишах, показали, що розщеплювання PrP в периферичних нервах активує відновлення їх мієлінового шару швановськими клітинами і що відсутність PrP приводить до демієлінізації нервів. У 2005 році було висунуто припущення, що в нормі PrP відіграє роль в підтримці довготривалої пам'яті. Крім того, у мишей, позбавлених гена PRNP, спостерігається змінена гіпокаммальна довготривала потенція. У 2006 році вчені з Інституту біомедичних досліджень Уайтхед встановили, що експресія гена PRNP в гемопоетичних стовбурових клітинах потрібна для самопідтримки кісткового мозку. У дослідженні було виявлено, що довгоживучі гемопоетичні стовбурові клітини несуть PrP на клітинній мембрані, а кровотворні тканини із стовбуровими клітинами, позбавленими PrP, мають велику чутливість до клітинного виснаження.

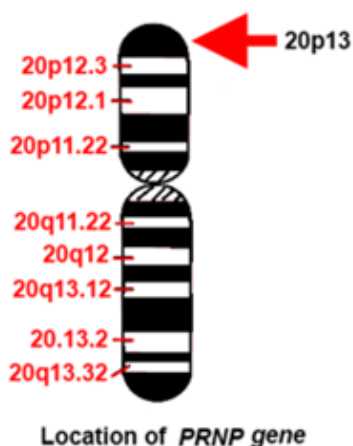


Рис. 2.28. Локалізація гена PRNP в 20-ій хромосомі.

Був ідентифікований ген, що кодує нормальний білок PrP-PRNP, локалізований на 20-ій хромосомі. При усіх спадкових пріонних захворюваннях має місце мутація цього гена. Було встановлено близько 30 різних варіантів мутацій, і усі мутантні білки більше схильні до укладання в пріонну форму. Такі мутації успадковуються аутосомно-домінантно.

Деякі мутації призводять до розтягування октапептидних повторів на N-кінці білка PrP. Інші мутації, які призводять до появи спадкової пріонної хвороби, можуть відбуватися в позиціях 102, 117 і 198 (синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера), 178, 200, 210 і 232 (хвороба Крейтцфельдта-Якоба) і 178 (фатальне сімейне безсоння).

За даними сучасних досліджень, основний шлях зараження пріонними захворюваннями – вживання зараженої їжі. Вважається, що пріони можуть залишатися в довкіллі в останках мертвих тварин, в гної, а також є присутніми в сечі, слині і інших рідинах і тканинах тіла. Через це зараження пріонами може статися і при використанні нестерильних хірургічних інструментів. Пріони також можуть довго зберігатися в ґрунті за рахунок зв'язування з глиною і іншими ґрунтовими мінералами. Також в 2011 році було опубліковано попередній доказ того, що пріони можуть передаватися з отримуваним з сечі людським гонадотропіном менопаузи, вживаним для лікування безпліддя.

До відкриття пріонів вважалося, що усі інфекційні агенти використовують для розмноження нуклеїнові кислоти. Нині вважається, що хоча пріони здатні до перенесення інформації без участі нуклеїнових кислот, вони нездатні передавати інформацію на нуклеїнові кислоти: пріонні захворювання не вдалося достовірно зв'язати ні з вірусними, ні з бактеріальними, ні з грибовими збудниками; інфекційність пріонів не пов'язана з

нуклеїновими кислотами; пріони стійкі до нуклеаз і ультрафіолетового випромінювання, що згубно позначаються на нуклеїнових кислотах; пріони не викликають імунної відповіді.

Мультикомпонентна гіпотеза. Низька інфекційність пріонів, отриманих з чистого білку *in vitro* привела до появи так званої мультикомпонентної гіпотези: для утворення інфекційного пріона потрібні інші молекули-кофактори.

У 2007 році біохімік Surachai Supattarone і його колеги з Дартмутського коледжу отримали очищені інфекційні пріони з PrP^C. Вони також показали, що поліаніонна молекула, яка знадобилася для утворення пріонів, мала високу спорідненість до PrP і утворювала з ним комплекси. Це дало вченим підстави припустити, що до складу інфекційного пріона входить не лише білок, але і інші молекули організму, у тому числі ліпіди і поліаніонні молекули.

У 2010 році Ма Цзиянь (Jiyan Ma) з колегами з Університету штату Огайо отримали інфекційний пріон синтезований з бактеріальних клітин рекомбінантного PrP, фосфоліпиду POPG і РНК, що теж підтверджує мультикомпонентну гіпотезу. Навпаки, в інших експериментах з одного тільки рекомбінантного PrP вдалося отримати тільки слабоінфекційні пріони. У 2012 році Supattarone і колеги виділили мембранний ліпід фосфатидилетаноламін як ендогенний кофактор, який здатний каталізувати формування великої кількості рекомбінантних пріонів різних штамів без участі інших молекул. Вони також повідомили, що цей кофактор потрібний для підтримки інфекційної конформації PrP^{Sc}, а також визначає штамові властивості інфекційних пріонів.

Вірусна гіпотеза стверджує, що ТГЕ (трансмісивна губчаста енцефалопатія) здатна до реплікації інформаційними молекулами (швидше за все, нуклеїновими кислотами), які зв'язуються з PrP. Відомі штами пріонів при ТГЕ, у тому числі губчастій енцефалопатії великої рогатої худоби і скрейпі, які характеризуються специфічними біологічними властивостями, що, на думку прибічників вірусної гіпотези, не пояснюється «чисто білковою» гіпотезою.

Дослідження з поширення губчастої енцефалопатії великої рогатої худоби у безклітинних системах (Castilla J et al, 2005) і в хімічних реакціях з очищеними компонентами (Deleault NR et al, 2007) чітко свідчать проти вірусної природи цього захворювання.

Пріонні захворювання людини: хвороба Крейтцфельдта-Якоба (CJD), варіант хвороби Крейтцфельдта-Якоба (vCJD), ятрогенна хвороба Крейтцфельдта-Якоба (iCJD), спадкова хвороба Крейтцфельдта-Якоба (fCJD), спорадична хвороба Крейтцфельдта-Якоба (sCJD), синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера (GSS), фатальне сімейне безсоння (FFI) Куру.

Потенційне лікування і діагностика. Завдяки комп'ютерному моделюванню вченим вдалося розробити сполуки, які можуть бути ліками проти пріонних захворювань. Н., є сполуки що можуть зв'язуватися з PrP^C і стабілізувати його структуру, знижуючи кількість шкідливих PrP^{Sc}. Нещодавно знайдені антипріонні антитіла, здатні проходити через гематоенцефалопатичний бар'єр і діяти на цитозольні пріони. В останнє десятиріччя був досягнутий деякий прогрес в інактивації інфекційних пріонів у м'ясі надвисоким тиском. У 2011 році було відкрито, що пріони можуть розкладатися лишайниками.

Велике практичне значення має проблема діагностики пріонних захворювань, зокрема, губчастій енцефалопатії великої рогатої худоби і хвороби Крейтцфельдта — Якоба. Їх інкубаційний період складає від місяця до десятиріч, впродовж яких людина не відчуває ніяких симптомів, навіть якщо процес перетворення нормальних мозкових білків PrP^C в пріони PrP^{Sc} вже почався.

Фактично не було способу виявити PrP^{Sc}, окрім як за допомогою перевірки тканини мозку нейропатологічними і імуногістохімічними методами вже після смерті. Характерною рисою пріонних захворювань є накопичення пріонної форми PrP^{Sc} білка PrP, проте в рідинах і тканинах тіла (кров і сеча), які легко отримати, він міститься в дуже низьких концентраціях. Дослідники намагалися розробити метод виміру частки PrP^{Sc}, але ще немає повністю визнаних методів діагностики пріонів в крові.

У 2010 році група дослідників з Нью-Йорка описала спосіб виявлення PrP^{Sc} навіть тоді, коли його частка в тканині мозку дорівнює одній на сто мільярдів (10^{-11}). Цей метод поєднує ампліфікацію з новою технологією, званою Surround Optical Fiber Immunoassay («оптичний імунологічний аналіз прилеглих волокон»), і деякими специфічними антитілами проти PrP^{Sc}. Після ампліфікації з усіма PrP^{Sc}, що можливо містяться в зразку, зразок позначається флуоресцентним барвником для специфічних антитіл і у кінці завантажується в мікрокапілярну трубку. Трубка поміщається в спеціальний апарат таким чином, щоб вона виявилася повністю оточеною оптичними волокнами і увесь світ, що випускається на трубку, поглинається барвником, заздалегідь збудженим лазером. Ця техніка дозволяє виявити PrP^{Sc} навіть після невеликої кількості циклів переходу в пріонну форму, що, по-перше, знижує можливість спотворення результату артефактами експерименту, і, по-друге, прискорює хід процедури. Дослідники перевіряли цим методом кров овець, що здавалися здоровими, насправді заражених скреїпі. Коли хвороба підтвердилася, був досліджений і їх мозок. Таким чином, дослідники отримали можливість порівняти аналізи крові і мозкової тканини тварин з симптомами хвороби з прихованою хворобою і неінфікованими. Результати наочно показали, що вищезазначена методика дозволяє виявити PrP^{Sc} в організмі задовго до появи перших симптомів.

Протеоміка. У 1997 році з'являється новий термін протеоміка (від протеїн і -ом). Це було пов'язано з новими методами дослідження макромолекул і появою вичерпних даних про послідовності багатьох білків людини, їх протеолітичних фрагментів, що дозволило ідентифікувати білки по молекулярній масі їх фрагментів методом мас-спектрометрії. Оскільки протеоміка оперує великим об'ємом даних, для обробки яких потребуються спеціалізовані алгоритми і великі обчислювальні потужності, вона тісно пов'язана з розвитком біоінформатики.

Протеоміка – наука, предметом вивчення якої є білки, їх функції і взаємодії в живих організмах, у тому числі - в організмі людини. Основне завдання протеоміки - кількісний аналіз експресії білків в клітинах залежно від їх типу, стану або впливу зовнішніх умов. Протеоміка здійснює порівняльний аналіз великих груп білків - від білків, залучених в тому або іншому біологічному процесі до повного аналізу їх набору (протеому). Термін "протеом" - увесь білковий комплемент, експресуємий геномом - "PROTEOME: entire PROTEin complement expressed by genOME". Протеоміка вимагає системного вивчення "протеому" клітини, органу та організму. Для виявлення і досліджень нових білків широко застосовуються нові технології, які після завершення міжнародного проекту "Геном людини" прийнято називати постгеномними. Комплексне вивчення "протеома" проводиться методами і технологіями, спрямованими на одночасний розподіл, а також наступну ідентифікацію і аналіз усіх білків об'єкту. Сучасні методи протеомних досліджень:

а) ізоелектрофокусування (ІЕФ) - метод розподілу білків під дією електричного поля в середовищі з градієнтом рН, який створюється спеціальними амфотерними речовинами, здатними проводити струм, створювати і підтримувати рН;

б) ідентифікація мікросеквенуванням заснована на розшифровці амінокислотної послідовності білку по частинам. Розроблені методи мікросеквенування дозволяють працювати з дуже малими кількостями пептидів (нанограмами). Можливе проведення прямого N-кінцевого секвенування білку, перенесеного на інертну мембрану, а також секвенування окремих пептидів, отриманих з білку після його ферментативного розщеплення, високоефективною рідинною хроматографією. Мікросеквенування дозволяє виявляти поодинокі амінокислотні заміни в білках, що вивчаються;

в) Мас-спектрометрія встановлює, які атоми входять до складу молекули, яка структура їх розташування і ізотопний склад, а також яка маса молекули. Розрізняють декілька модифікацій мас-спектрометричних методів:

– м'яка матрична іонізація (Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI) дозволяє аналізувати такі біополімери (полісахара, пептиди) і макромолекули, без ризику пошкодити їх структуру. Іонізація проводиться лазерним пучком, а матрикс (кристали кислот в суміші з органічним розчинником) використовується для захисту молекул від руйнівної дії лазера;

– тандемна мас-спектрометрія (MS/MS) проводиться на приладі, який об'єднує декілька аналізаторів, що дозволяє послідовно стабілізувати іони, ізолювати один пептид, його складові і ідентифікувати фрагменти. Застосовується в ідентифікації білкових плям після 2Д електрофорезу;

г) капілярний електрофорез - метод аналізу складних сумішей, що використовує електрокінетичні явища - електроміграцію іонів і інших заряджених часток і електроосмос - для розподілу і визначення компонентів. Модифікацією методу є капілярний електрофорез у чіпах. Ідентифікація білків після розподілу проводиться за допомогою мас-спектрометрії;

д) метод капілярного ізоелектрофокусування. Ізофокусування в каналі чіпа, покритого спеціальною плівкою, чіп заморожувався, плівка віддалялася і вміст каналу піддавався висушуванню при критичній точці для запобігання зміні позиції білкових плям. Після цього матрикс для MALDI додавався безпосередньо до вмісту чіпа. В результаті одночасно прочитується інформація про молекулярну масу і ізоелектричну точку пептиду;

є) двовимірний електрофорез (2Д електрофорез) дозволяє проводити розподіл білків, характерних для клітини або тканини; встановлювати присутність відомих мінорних білків; виявляти і ідентифікувати маркерні білки, що характеризують відомі зміни в цій тканині (Рис. 2.29.).

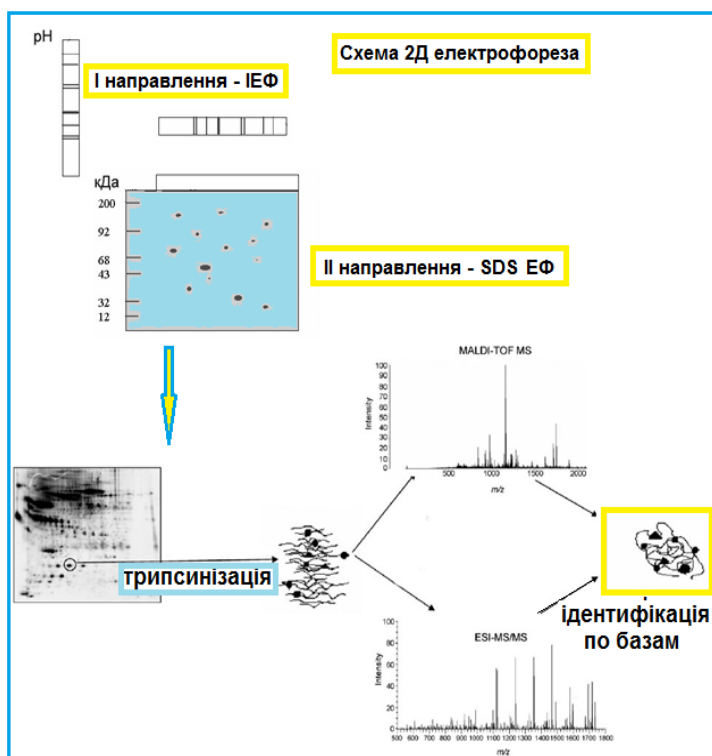


Рис. 2.29. Схема протеомних досліджень (2Д електрофорез)

- 1) Усі білки зразку піддаються солюбілізації і стають об'єктами аналізу;
- 2) Проводиться аналітичне фракціонування за двома незалежними фізико-хімічними властивостями поліпептидних ланцюгів, що відбивають особливості їх первинної структури - комбіноване використання електрофорезу (2D) і ізоелектричне фокусування (ІЕФ), забезпечує фракціонування по рН; електрофорез у присутності SDS (SDS-ЕФ) забезпечує розподіл по Мт.
- 3) Виявлення білкових фракцій після розподілу за допомогою високочутливих методів детекції білків (різні модифікації мас-спектрометрії).
- 4) Стандартизований опис білків на двовимірних електрофореграмах в системі прямокутних координат, в яких одна з координат є функцією молекулярної маси, а інша – ізоелектричною точкою для кожного виду поліпептидного ланцюга.

2Д електрофорез заклав основу для розшифровки молекулярної будови клітин і тканин людини і тварин, бактерій і вірусів і для детекції змін, які відбуваються при розвитку, старінні, захворюваннях, а також у відповідь на зміни довкілля. Протеомні методи використовуються для визначення маркерів захворювань і розробки нових ліків. Комбінація 2Д електрофорезу з фракціонуванням клітинних органел може дати інформацію про внутрішньоклітинну локалізацію специфічних білків.

Загальна кількість білків, що синтезуються в організмі людини під час онтогенезу

набагато більша ніж генів та ймовірно досягає 1 млн. Зрозуміло, що тільки вивчення протеому дозволить визначити функції багатьох генів і завершити вивчення генома людини. Тому й виник другий важливий напрямок сучасної молекулярної біології - *протеоміка*.

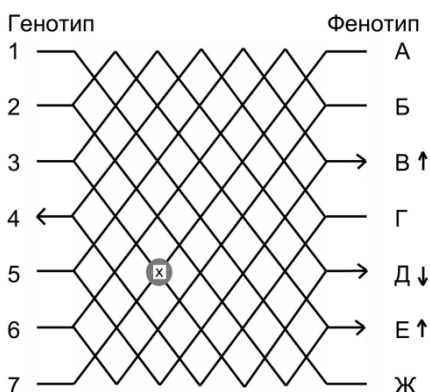
Протеом - поняття динамічне, тоді як геном стабільний і постійний, інакше було б неможливо передавати спадкову інформацію від покоління до покоління, забезпечувати збереження видів. Але стабільність генома не означає, що йому не притаманна мінливість. Протеом - набір білків даної клітини в даній фазі її розвитку, у даний момент часу - менше генома за загальним обсягом інформації. У клітинах людського організму ніколи не функціонують всі гени, працює лише їх частина. Н., в клітині печінки або легень, одночасно присутні не більше 10000 білків, причому в різних кількостях - від декількох молекул на клітину до декількох відсотків загального клітинного білка. Набір білків змінюється залежно від фази клітинного циклу, тканинної спеціалізації клітини, стадії її диференціювання, належності до нормальних або злоякісних клітин, стану стресу або спокою, дії позаклітинних фізіологічно активних речовин і таке інше. Білковий набір клітини залежить від безлічі чинників, схильний до змін, що робить його вивчення особливо складним.

Мінливість протеому пов'язана не тільки з диференціальною активністю генів в даний момент часу, а також залежить від процесів, що відбуваються під час реалізації генетичної інформації. Частина первинних РНК зазнає *альтернативного сплайсингу*. У результаті з одного гену утворюються декілька мРНК, які визначають синтез поліпептидів з різною первинною структурою. Таким чином, догма молекулярної біології - «один ген - один фермент» перетворюється на нову формулу: «один ген – один або декілька білків».

Модифікації білків також забезпечують їх величезну різноманітність. Якщо врахувати, що на великому білку є безліч місць, де ці модифікації можуть відбуватися, то легко собі уявити, яка практично нескінченна різноманітність форм однієї і тієї ж білкової молекули може виникнути. Переважна більшість модифікацій істотно позначається на біологічній активності молекули білка та на її спроможності взаємодіяти з іншими білками. Це дозволяє зробити висновок, що кількість різних білків клітини може перевищити кількість працюючих генів на порядок. Важливим розділом протеоміки є вивчення білок-нуклеїнових і білок-білкових взаємодій. Кожен білок при своєму функціонуванні взаємодіє з безліччю макромолекул, а також низькомолекулярними лігандами. У зв'язку з цим, один з керівників проекту «Геном людини» Крейг Вентер вважає, що для повного визначення функцій всіх генів може знадобитися не менше ста років.

Протеоміка в біології і медицині.

Розшифровка геномів організмів відкриває перед вченими перспективу відкриття базових відмінностей між нормальною і необластичною клітинами, між хазяїном і паразитом. Знання цих відмінностей призводить до розуміння причин захворювань: генетичних, інфекційних і до можливості лікування і попередження їх. Ці взаємодії можуть бути прямими - ген → білок → фенотип або здійснюються за допомогою складної мережі взаємодій на білковому рівні (рис.2.30). В останньому випадку, мутація в гені може



приводити або не приводити до захворювання; окрім цього, міра і тяжкість захворювання може змінюватися індивідуально. У ці складні взаємодії також включаються дії факторів довкілля. Епігенетична система відбиває взаємодії між генами і їх продуктами, а також вплив чинників навколишнього середовища.

Рис. 2.30. Комплексні взаємодії в системі генотип-фенотип на білковому рівні. X - гіпотетичний лікарський засіб; стрілки справа означають регуляторну дію лікарського засобу на фенотип (↑ - посилення експресії, ↓ - пригнічення експресії специфічних білків).

Таким чином, для більшості захворювань неможливо передбачити порушення фенотипу тільки за даними геноміки. Клітина реагує на зміни зовнішнього середовища зміною її білкового складу. У відповідь на зовнішню дію синтез одних білків збільшується, інших - зменшується. Таким чином, фенотип не лінійно залежить від проявів генотипу, оскільки системи епігенезу контролюють і модифікують експресію генів. Практично усі елементи епігенетичної системи - білки. Протеом живої клітини неймовірно лабільний. Основною функцією багатьох білків є перенесення інформації. Не існує фіксованого синтезу того або іншого білку, тому концентрація білків в клітині змінюється. При обробці клітини гормонами, токсинами або ліками, кількісні зміни спостерігаються не в одному, а в цілому ряду білків. Клітини - реактивні системи, в яких інформація передається не лише від генів до білків, але і в протилежному напрямку (рис. 2.31).

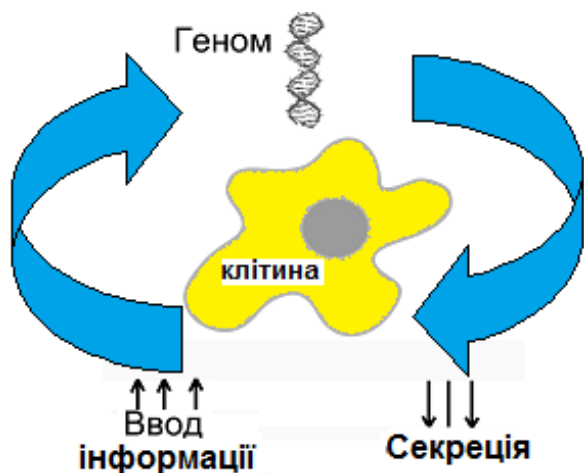


Рис. 2.31. Взаємодії генома з довкіллям.

Елімінація одного білку в організмі (н., в Knock-out миші) призводить до зміни усього молекулярного фенотипа. Більше того, будь-які ліки, які впливають на білок, наприклад, на іонний канал, опосередковано впливають на білковий склад усього організму.

Посттрансляційна модифікація визначає біофізичні властивості і біологічну активність молекул білків і є основою гетерогенності їх білкового набору. Охарактеризувати гетерогенність глікозилірованих білків можливо

з використанням капілярного електрофорезу в тандемі з мас-спектрометрією. У клінічній біохімії аналіз індивідуальних білків людини використовується для встановлення виду патологічного процесу (дистрофія, пухлинне зростання, запалення), визначення ураженого органу (інфаркт міокарду), встановлення природи патології (н., при діагностиці ензимопатій, інфекційних хвороб (гепатит)) та інших захворювань, оцінки течії різних фізіологічних процесів (вагітність, розвиток імунної системи) і виявлення ускладнень в їх течії (патологія вагітності).

В області розробки ліків основною проблемою є вплив препарату на активність білків. Основним методом вивчення дії ліків на протеом є 2Д електрофорез (нові ліки тестуються на накопичення їх в органах, н., в печінці). Ловастатин знижує рівень холестеролу в крові. Вважали, що специфіка його дії полягає в пригніченні HMG-кофермента А-редуктази. Проте, при аналізі ефекту ловастатину в комбінації з іншими засобами, які знижують холестерол, було визначено, що кількість білка HMG-Кофермент-А синтетази значно підвищується, тоді як кількість інших білків зменшуються. Встановлено, що основна дія ліків полягає не в пригніченні синтезу холестеролу, а в підвищенні активності білку - ліпопротеїнового рецептора, який видаляє з крові холестерин.

Превентивні ліки проти раку олтипраз підвищують експресію ряду білків, включаючи афлатоксин В1 альдегідредуктазу, який руйнує один з натуральних канцерогенів. Передбачалося, що ефект має місце в ендоплазматичному ретикулумі. При аналізі 2Д гелю з'ясувалося, що більшість змін відбуваються в розчинній і мітохондріальній фракції клітини. Окрім цього, при порівнянні екстрактів печінки самок і самців, встановлена кількісна залежність від регуляції на гормональному епігенетичному рівні не пов'язану з гоносомами.

Ці дані свідчать про те, що експресія генів в тканинах дуже пластична, візначається дією багатьма чинниками і майже завжди включає багато генів.

2Д електрофорез ідеально підходить для вивчення подібних динамічних змін. Як правило, результати 2Д корелюють з відомими механізмами функціонування білків. Так, якщо ліки посилюють проліферацію в пероксисомах за даними електронної мікроскопії, то і на 2Д електрофорезі спостерігатиметься збільшення кількості білків, характерних для цього типу органел. Подібні структурно-функціональні взаємодії означають, що ідентифікація білків-мішеней для нового лікарського засобу може допомогти відкрити механізми функціонування цих білків.

Ще одна важлива проблема в клінічній протеоміки - це пошук нових білків-маркерів захворювань, зокрема, онко-маркерів. Відмічені в табл.2.3. потенційні маркери раку простати представляють особливий інтерес з різних причин. Н., тимозин бета-15 може визначатися в сечі і, мабуть, має пряме відношення до молекулярних механізмів злоякісного переродження клітин. Відповідно, ген тимозину бета-15 і його продукти можуть стати не лише діагностичними маркерами, але і в перспективі мішенями для різних дій з метою пригнічення пухлинного зростання.

Таблиця 2.3. Потенційні маркери раку простати (РП).

| Назва маркера | Значення для діагностики раку простати (РП) |
|--|--|
| 1. Білок AGR2 (AGR2). | Секреторний білок, андроген-індукований, виявлений в РП, гіперекспресія в 89% випадків РП. Виявляється при інших пухлинах. |
| 2. Простат-специфічний мембранний антиген. | Маркер з прогностичним значенням (МПЗ). Високий рівень корелює із злоякісністю і метастазуванням, але визначається і при аденомі. |
| 3. Тимозин бета 15. | По імуногістохімії – МПЗ. «Сечовий» маркер, який перспективний при організації скринінгу. Виявляється при інших злоякісних пухлинах. |
| 4. Білок P63. | По імуногістохімії - МПЗ. |
| 5. Рацемізаза (alpha – mthylacyl CoA racemase, AMACR). | По імуногістохімії - МПЗ. |
| 6. Антиген простатних стовбурових клітин (Prostate stem cell antigen, PSCA). | Маркер клітинних поверхонь, показана гіперекспресія гена при РП до 80%; високий рівень експресії при метастазах РП. |
| 7. Високомолекулярний цитокератин 34betaE12 (High-molecular-weight keratin). | По імуногістохімії - маркер з прогностичним значенням. |

У 2002 році розпочато проект «Протеом Плазми Крові» (ППК). За масштабністю ППК цей проект можна порівняти з проектом «Геном людини». У реалізації ППК беруть участь 35 лабораторій у 13 країнах. На першій стадії проекту створена анотована база даних 3020 білків плазми крові людини, з яких 889 білків ідентифіковано. Наступний етап - побудова протеомів плазми, характерних для різних патологічних станів, і формулювання міжнародно-узгоджених їх діагностичних показників.

Ідентифікація нових білків сприятиме подальшій інтеграції молекулярної біології і фундаментальної медицини, яка призведе до відкриття нових діагностичних маркерів, виявлення білків - мішеней для фармакологічних препаратів. Великі надії покладають на вивчення протеому пухлин, що матиме діагностичне, клінічне та профілактичне значення.

Будова, функції і властивості ДНК.

Хімічний склад ДНК і її макромолекулярна організація. Типи спіралей ДНК. Молекулярні механізми рекомбінації, реплікації і репарації ДНК. Поняття про нуклеази і полімерази. Реплікація ДНК як умова передачі генетичної інформації нащадкам. Загальна

характеристика процесу реплікації. Дії, що відбуваються у вилці реплікації. Реплікація теломерів, теломераза. Значення недореплікації кінцевих фрагментів хромосом в механізмі старіння. Системи виправлення помилок реплікації. Коректорські властивості ДНК-полімераз. Механізми репарації пошкодженої ДНК. Поняття про захворювання репарації ДНК. Молекулярні механізми загальної генетичної рекомбінації. Сайт-специфічна рекомбінація. Генна конверсія.

У 1869г. Фрідріх Мішер досліджуючи ядра клітин гною і сперматозоїдів рейнського лосося відкрив нуклеїнові кислоти (НК). Генетична роль НК була встановлена після відкриття і пояснення трансформації (1944, О.Евері, Мак-Карті, Мак-Леод), трансдукції (1951, Ледерберг, Циндер) і розмноження бактеріофагів (1951, А.Херши, М.Чейз). Ці експерименти переконливо довели, що нуклеїнові кислоти відіграють основну роль у збереженні і реалізації генетичної інформації. Розрізняють два види нуклеїнових кислот: дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) - забезпечує збереження генетичної інформації, і рибонуклеїнові кислоти (РНК), які приймають участь в її реалізації.

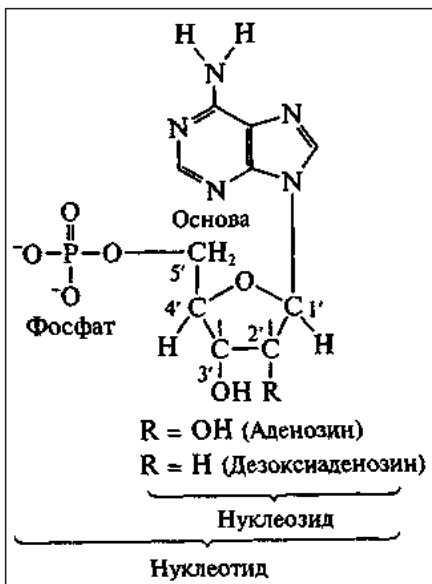


Рис. 3.1. Будова нуклеотиду.

Хромосома прокаріотичної клітини представлена дволанцюговою кільцевою молекулою ДНК (нуклеоїд), деякі мають декілька лінійних молекул ДНК.

Еукаріотичні клітини містять велику кількість молекул ДНК, яка нерівномірно розподілена по хромосомах у вигляді комплексів з численними білками. Віруси також мають генетичний матеріал: ДНК або РНК. В ядрі утворюються багато видів різних за функціями РНК.

Будова нуклеїнових кислот. Нуклеїнові кислоти є біологічними полімерами. Мономерними ланками НК є нуклеотиди (Рис.3.1) — фосфорні ефіри нуклеозидів, які побудовані з пентози і гетероциклічної основи. У РНК

вуглеводний компонент — D-рибоза, в ДНК — D-2-дезоксирибоза.

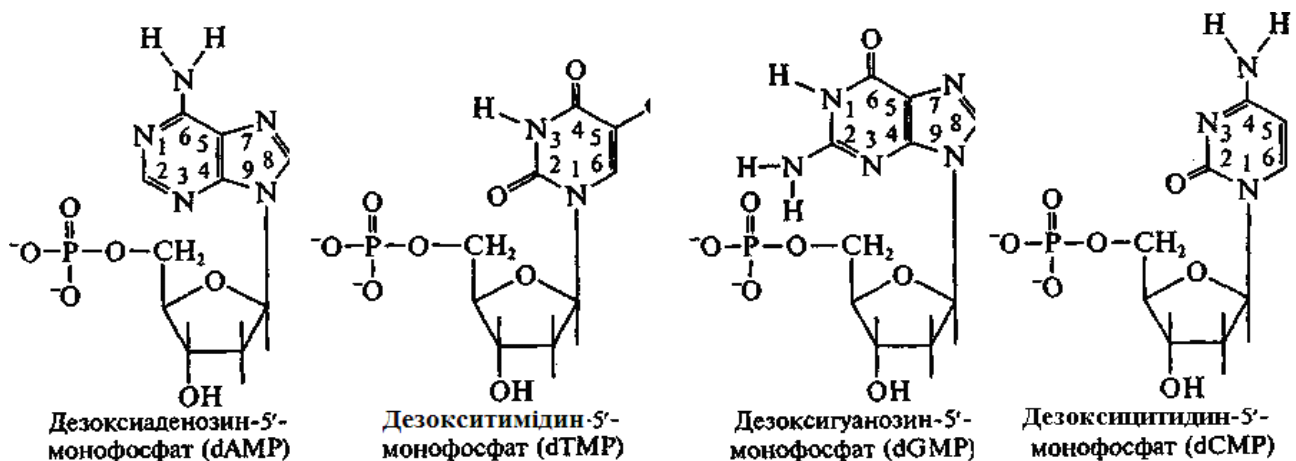
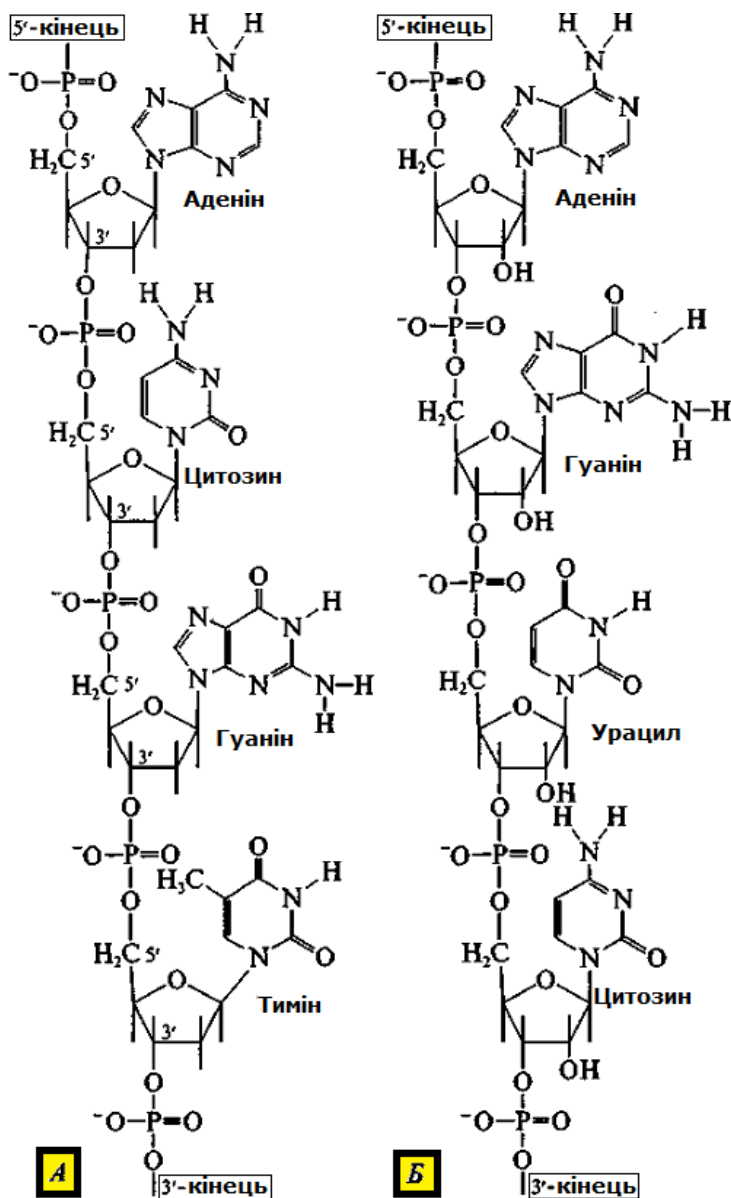


Рис. 3.2. Нуклеотиди ДНК.

Зв'язок між вуглеводним залишком і гетероциклічною основою в нуклеотиді здійснюється за допомогою N-глікозидного зв'язку.

В якості гетероциклічних основ ДНК містить два пурина: аденін (А) і гуанін (G) і два піримідини: тимін (Т) і цитозин (С). У РНК замість тиміну міститься урацил (U). До складу ДНК входять 4 нуклеотида (рис. 3.2)



Мономерні залишки в нуклеїнових кислотах пов'язані між собою фосфодіефірними зв'язками. Цей зв'язок здійснюється тільки за рахунок 3'-ОН одного нуклеотидного залишку і 5'-ОН іншого. Такий міжнуклеотидний зв'язок називають 3',5'- фосфодіефірний. Ланцюги ДНК і РНК мають певну полярність, або напрям, оскільки всі міжнуклеотидні фосфодіефірні зв'язки орієнтовані уздовж ланцюга однаково. Завдяки полярності кожен полінуклеотидний ланцюг має 5'-кінець і 3'-кінець (Рис. 3.3). Із-за наявності 2'-ОН групи у рибозі міжнуклеотидні зв'язки в РНК значно мобільніше, ніж в ДНК; вони легко гідролізуються у присутності луку. Після закінчення циклу синтезу ДНК деякі пуринові і піримідинові основи можуть піддаватися хімічній модифікації.

Рис. 3.3. Зв'язок між нуклеотидами в полінуклеотидному ланцюзі: А — полідезоксирибонуклеотид; Б — полірибонуклеотид (нуклеотидну послідовність прийнято зображувати зліва направо, від 5' до 3'-кінця)

Модифікація пуринів і піримідинів характерна і для РНК (Рис. 3.4). У ній є 2'-О-метілнуклеотиди, а також може спостерігатися інший

спосіб зв'язування між урацилом і рибозою (так звана псевдоуридилова кислота). Модифіковані нуклеотиди досить часто зустрічаються в тРНК. Як і у ДНК, модифікація основ і рибозних залишків в РНК відбувається після завершення синтезу РНК, а не на стадії біосинтетичних попередників.

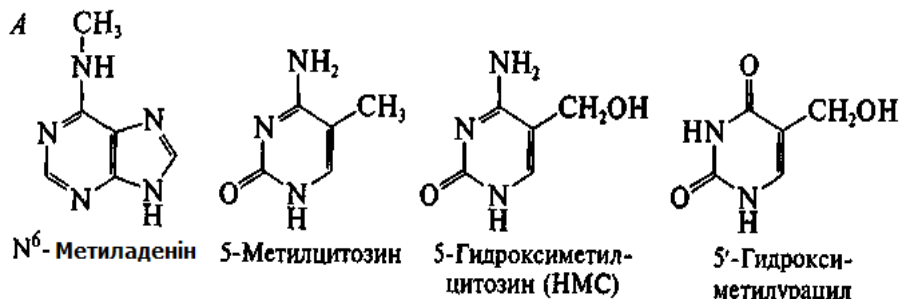


Рис. 3.4.А Структурні формули мінорних пуринових і піримідинових основ, виявлених у складі ДНК.

Конформації компонентів

нуклеїнових кислот. Усі п'ять гетероциклічних

основ, що входять до складу нуклеїнових кислот, мають плоску конформацію. В той же час для залишків рибози і дезоксирибози плоска конформація (коли атоми вуглецю C1', C2', C3', C4' і гетероатом кисню знаходяться в одній площині) енергетично не вигідна. Серед численних теоретично можливих конформацій цих залишків в полінуклеотидах реалізуються тільки дві: або C2'-ендо-, або C3'-ендоконформації (рис. 3.5).

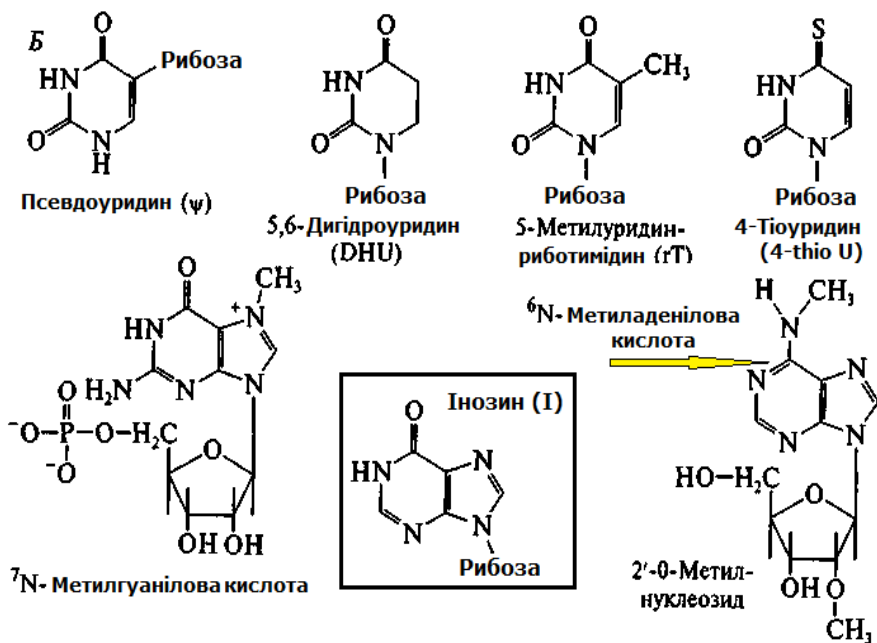


Рис. 3.4.Б Структурні формули мінорних пуринових і піримідинових основ, виявлених у складі РНК.

Нуклеотидна одиниця із 3'-ендоконформацією вуглеводного залишку має меншу довжину, ніж 2'-ендоізомер (Рис.3.6). Найважливішою характеристикою у визначенні конформації нуклеотидної ланки є взаємне розташування вуглеводної і гетероциклічної частин, яке

визначається кутом обертання навколо N-глікозидного зв'язку. Теоретичний аналіз конформації нуклеозидів і рентгеноструктурні дослідження показали, що існують дві області дозволених конформацій, таких, що називаються син- і анти-конформаціями (Рис. 3.7).

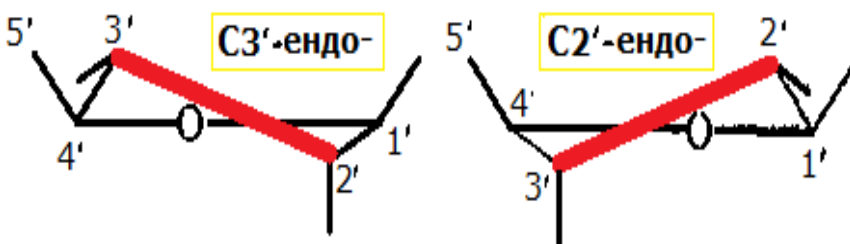
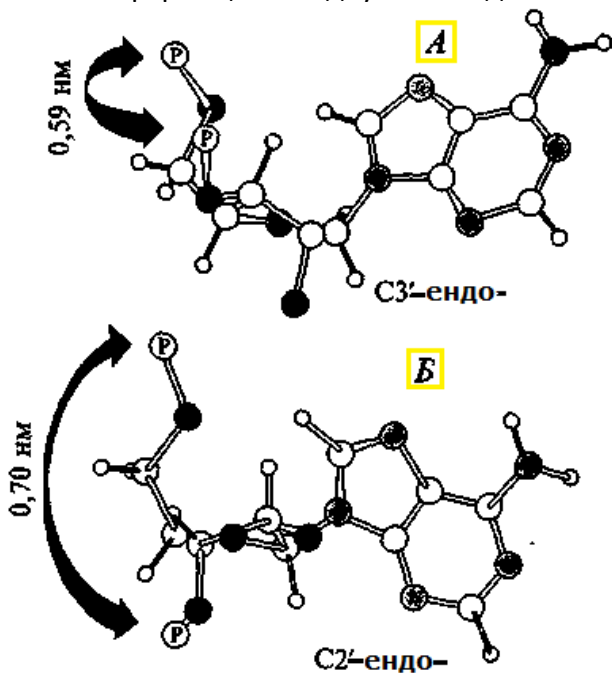


Рис. 3.5. Дві конформації вуглеводних залишків, що зустрічаються в ДНК і РНК. С1', О і С4' розташовані в одній площині. С2' або С3' знаходяться в ендоконформації, коли вони виведені над площиною, у напрямку зв'язку С4'-С5'.

У вільних нуклеозидах і нуклеотидах перехід від С2'-ендо- до С3'-ендо- і між син- і анти-конформаціями відбувається досить легко. Якщо ж нуклеотидний залишок вбудований



в полінуклеотидний ланцюг, то його конформація за цих зовнішніх умов виявляється фіксованою: в звичайних формах полінуклеотидів мономерні ланки мають виключно анти-конформацію.

У полірибонуклеотидах вуглевод найчастіше знаходиться в 3'-ендоконформації, тоді як в полідезоксирибонуклеотидах він може бути як в 3'-ендо-, так і в 2'-ендоконформації. Це призводить до того, що число конформацій, можливих для ДНК, більше, ніж для РНК.

Рис. 3.6. Можливі конформації нуклеотидних одиниць: А — С3'-ендоконформація; Б — С2'-ендоконформація.

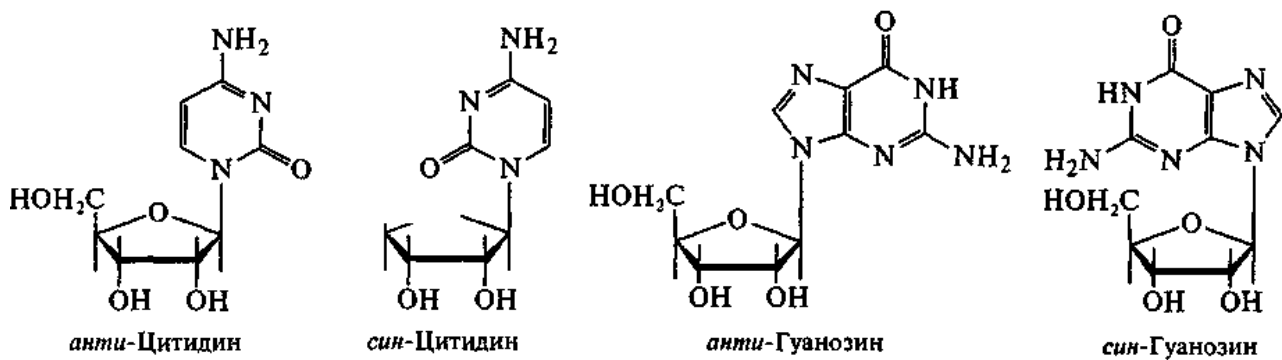


Рис. 3.7. Анти- і син-конформації в нуклеотидах.

Макромолекулярна організація ДНК. Подвійна спіраль ДНК (модель Уотсона-Кріка).

У 1953 р. Дж.Уотсон і Ф.Крік запропонували модель структури ДНК. При побудові моделі вчені ґрунтувалися на таких даних:

1. ДНК є полімером, що складається з нуклеотидів, сполучених 3'-5'-фосфодиефірними зв'язками.

2. Склад нуклеотидів ДНК підкоряється правилам Чаргафа: у ДНК вміст пуринових нуклеотидів (А+Г) завжди дорівнює вмісту піримідинових нуклеотидів (Т+С); число залишків А завжди дорівнює числу залишків Т, число залишків Г - числу залишків С.

3. Рентгенограми ДНК, уперше отримані М. Уілкінсом і Р. Франклін, вказують на те, що молекула має спіральну структуру і містить більше ніж один полінуклеотидний ланцюг.

4. Кислотно-лужне титрування ДНК доводить, що її структура стабілізується водневими зв'язками. Титрування і нагрівання нативної ДНК викликає помітні зміни її фізичних властивостей, зокрема в'язкість, переводячи її в «денатуровану» форму, без втрати ковалентних зв'язків.

На основі цих даних Д.Уотсон і Ф.Крік запропонували тривимірну модель ДНК, яка пояснювала результати рентгеноструктурного аналізу і характерну для ДНК парність основ (Рис. 3.8.). Згідно їх моделі молекула ДНК є правильною правою спіраллю, утвореною двома полінуклеотидними ланцюгами, закрученими один відносно одного і навколо загальної осі. Два полінуклеотидні ланцюги, розташовані по периферії молекули, мають антипаралельну орієнтацію (Рис. 3.8). Це означає, що якщо рухатися уздовж осі спіралі від одного її кінця до іншого в одному ланцюзі, фосфодиефірні зв'язки мають напрям 3' → 5', а в іншій — 5' → 3', тобто на кожному з кінців лінійної молекули ДНК розташовані 5' — кінець одного ланцюга і 3'-кінець іншого ланцюга. Діаметр спіралі постійний уздовж усієї її довжини і дорівнює ≈ 2,0 нм.

Гідрофільні пентозофосфатні остови ланцюгів розташовані на зовнішній стороні подвійної спіралі. Гідрофобні пуринові і піримідинові основи обох ланцюгів укладені стопкою з інтервалом 0,34 нм і спрямовані всередину спіралі; площини кілець гетероциклічних основ перпендикулярні головній осі спіралі. Довжина витка спіралі, який відповідає її періоду ідентичності, складає 3,40 нм. На один виток спіралі припадає 10 нуклеотидних залишків в одному ланцюзі. Подвійна спіраль стабілізується за допомогою водневих зв'язків між пуринами одного ланцюга ДНК і піримідинами іншого, а саме, між А = Т, Г ≡ С. Основи, що утворюють пари, об'єднані водневими зв'язками, дістали назву комплементарних пар.

УАТ-парі основи сполучені за допомогою двох водневих зв'язків: одна — між аміно- і кетогрупами, інша — між двома атомами азоту пурину і піримідину відповідно. У GC-парі є три водневих зв'язки: два з них утворюються між аміно- і кетогрупами відповідних основ, а третя — між атомами азоту пурину і піримідину. У зв'язку з цим послідовність основ в одному ланцюзі визначає їх послідовність в іншому.

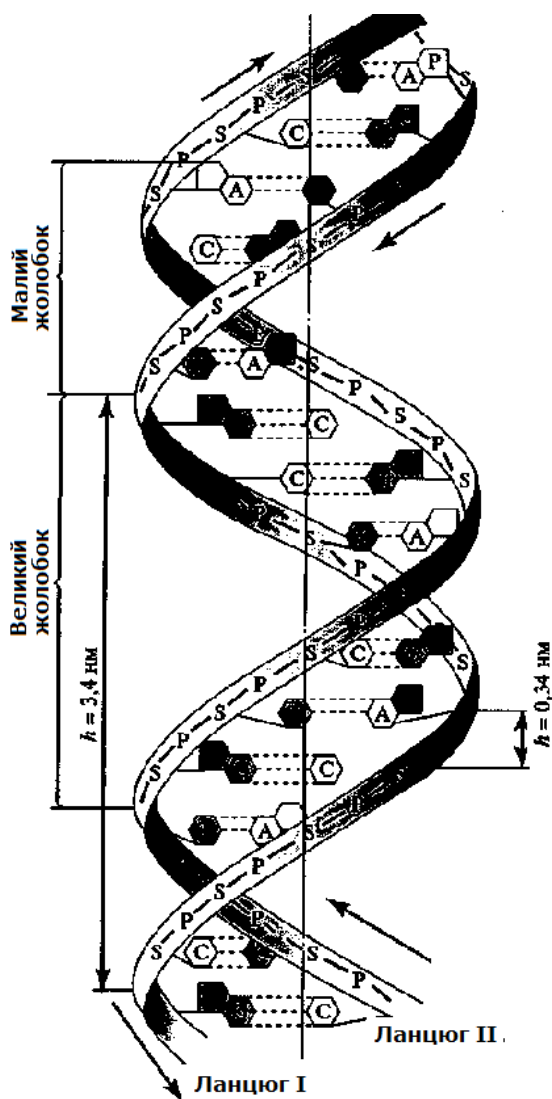


Рис. 3.8. В-форма подвійної спіралі ДНК:
P — фосфат; *S* — дезоксирибоза.

оптично один відносно одного. Такий вид комплементарної взаємодії називають електронною, при цьому ГЄС-пари істотно стабільніші, ніж А=Т-пари. Утворення пар між двома пуринами, двома піримідинами (А-С або G-Т) некомплементарне і порушує геометрію спіралі. Модифіковані пуринами і піримідинами, що зустрічаються в ДНК, утворюють також водневі зв'язки.

Гетероциклічні основи НК досить гідрофобні, у водному розчині їм «вигідніше» розташуватися один над одним, зменшуючи тим самим контакт з молекулами води. При утворенні таких стопок у взаємодію вступають функціональні групи однієї основи і π -електронні системи сусідньої з ним по вертикалі основи. «Вертикальні» взаємодії (стекинг-взаємодії) зумовлені ван-дерваальсовськими силами.

Сахарофосфатний остов розташований зовні і заряджений негативно. Основи повернуті всередину спіралі і розташовуються стопкою, один над одним. Лівий ланцюг зверху вниз має напрям $5' \rightarrow 3'$, а правий — $3' \rightarrow 5'$.

Стекинг-взаємодії основ у подвійній спіралі ДНК залежать як від складу комплементарних пар, так і від їх послідовності. На існування таких взаємодій в розчинах полінуклеотидів вказують відхилення їх фізико-хімічних характеристик.

Комплементарність основ у двох полінуклеотидних ланцюгах — ключова властивість ДНК.

Пізніше було встановлено, що модель Д.Уотсона і Ф.Кріка описує структуру однієї з декількох форм подвійної спіралі, названу В-формою. Це основна форма двоспіральної ДНК, в якій більша частина її молекул існує в клітині.

Взаємодії між гетероциклічними основами в нуклеїнових кислотах. Специфічна макромолекулярна структура ДНК визначається двома типами взаємодій між гетероциклічними основами нуклеотидних залишків: взаємодіями між основами в комплементарних парах і вертикальними міжплощинними взаємодіями основ, розташованими один над одним (стекинг-взаємодіями, від англ. stacking — укладатися в стопку). Утворення пар комплементарних основ (А=Т і ГЄС-пар) було уперше постульовано Д.Уотсоном і Ф.Кріком при створенні моделі подвійної спіралі ДНК. Обидві пари близькі за формою і мають однакові розміри (див. Рис.3.8). Окрім уотсон-кріковських пар (А=Т, ГЄС) гетероциклічні основи здатні утворювати безліч пов'язаних водневими зв'язками пар іншої структури. Квантово-механічні розрахунки показують, що уотсон-кріковські пари (А=Т і ГЄС, у РНК ще А = U) енергетично найбільш вигідні. У цих парах центри з підвищеною і зниженою електронною щільністю основ розташовані

Так, коефіцієнт молярної екстинкції (поглинання в УФ-світлі) полінуклеотидів менший, ніж сума коефіцієнтів молярної екстинкції мономерів (гіпохромний ефект), що до нього

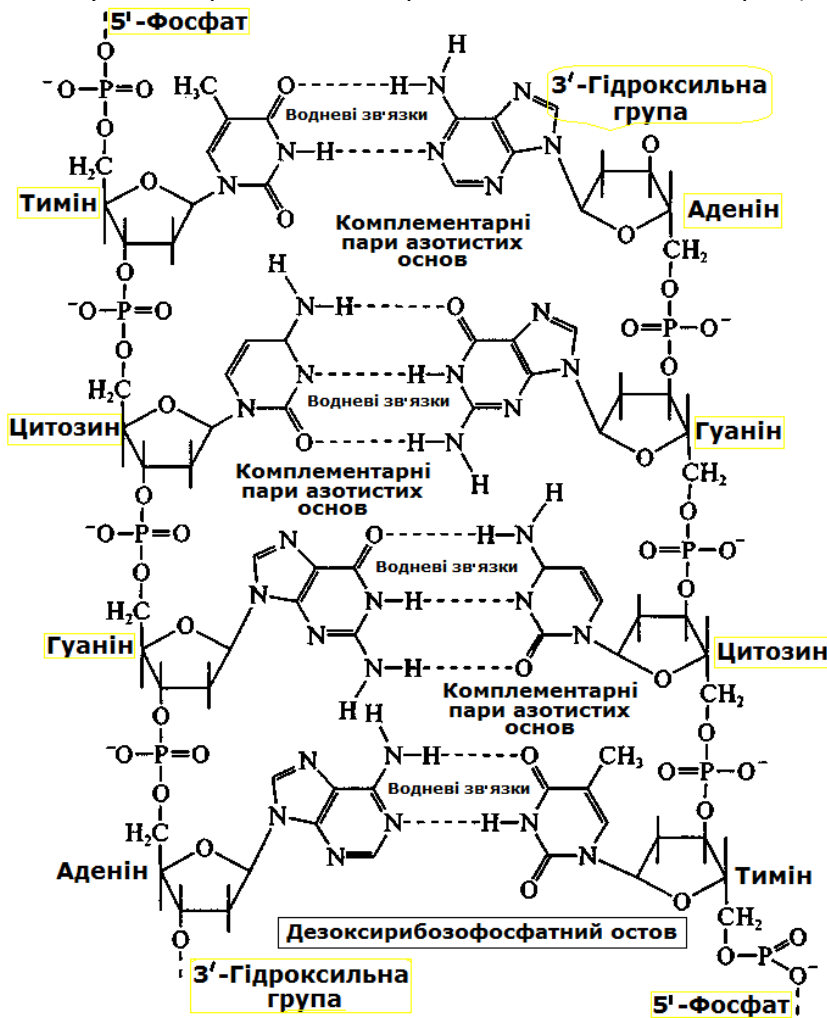
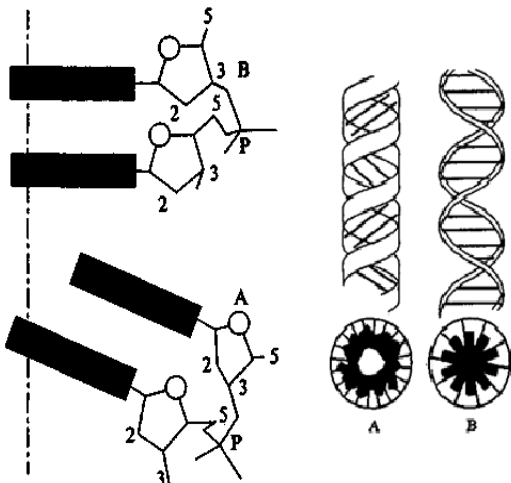


Рис.3.9. Два антипаралельних ланцюга ДНК.

СЗ'-ендоконформація цукру призводить до зменшення відстані між фосфатними групами і, отже, до зменшення відстані між нуклеотидними парами уздовж осі спіралі. Це збільшує кількість нуклеотидів на виток спіралі (11 нуклеотидних залишків). При цьому пари основ в А-формі утворюють з віссю спіралі кут близько 20° і дуже сильно відсунуті від осі спіралі до периферії молекули: зміщення досягає 0,4-0,5 нм., тобто майже половину радіусу (Рис. 3.9).



Внаслідок цього А-ДНК при вигляді зверху (уздовж осі спіралі) нагадує трубу. У А-ДНК в стекінгу беруть участь основи, що належать різним ланцюгам, тобто має місце як одно-, так і дволанцюговий стекінг. Це обумовлено величиною кута нахилу площин основ до осі спіралі (позитивна величина) і кутом повороту.

Рис. 3.10. Просторова структура сусідніх ланок полінуклеотидного ланцюга в А- і В-формах ДНК і подвійної спіралі ДНК. Вертикальна лінія ліворуч — вісь спіралі; ■ — азотисті основи навколо осі спіралі. Для порівняння у В-ДНК є тільки одностанцюговий стекінг.

РНК, як правило, є одним полінуклеотидним ланцюгом, але, накручуючись сама на себе, вона може утворити коротку ділянку подвійної

входять.

Поліморфізм подвійної спіралі. Праві спіралі утворюють два сімейства: А-сімейство (конформація цукру СЗ'-ендо) і В-сімейство (конформація цукру С2'-ендо). Структури в межах кожного з сімейств залежать від умов: концентрації солі, температури та ін. і можуть мати різне число пар на виток спіралі, різний нахил пар основ до осі спіралі і так далі.

А-сімейство ДНК. Ще до відкриття подвійної спіралі Р.Франклін отримала експериментальні свідчення існування дуже впорядкованої структури в орієнтованих витягуванням і підсушених волокнах ДНК. Ця структура дістала назву А-форми ДНК. Цій формі довго не надавали особливого значення, оскільки вона виникала у зневодненому середовищі.

спіралі. Виявилось, що подвійна спіраль з ланцюгів РНК має структури А-форми при 100%-й вологості (у цих умовах ДНК завжди існує у В-формі). Це відкриття поставило А-конформацію в ряд біологічно значимих. Зараз вже отримані підтвердження біологічної ролі А-ДНК.

У несприятливих умовах деякі бактерії перетворюються на спори і можуть знаходитися в такому неактивному стані досить довго, поки не з'являться відповідні умови для розмноження. Їх ДНК оточена споровими білками і знаходиться в А-формі. У цьому стані ДНК приблизно в 10 разів більш стійка до дії ультрафіолетового випромінювання ніж ДНК у В-формі у бактеріях, які активно розмножуються. Споріві білки сприяють перетворенню ДНК бактерій з В-форми в А-форму, щоб захистити ДНК у несприятливих умовах.

Гібридні спіралі ДНК-РНК утворюються при транскрипції послідовностей нуклеотидів ДНК в послідовність комплементарних нуклеотидів РНК, при цьому приблизно 40 н.п. в області активного центру РНК-полімерази представляють такий гібрид. Гібридна спіраль ДНК-РНК формується також, коли зворотна транскриптаза здійснює синтез ДНК на РНК-матриці і в ході реплікації при утворенні коротких молекул РНК-праймерів. Відмічено, що обидва ланцюги комплексу — ДНК і РНК — побудовані з нуклеотидів із 3'-ендоконформацією цукру. Структура таких гібридних спіралей (гетеродуплексів) нагадує А-ДНК, при цьому В-ДНК повинна перейти в А-форму до утворення гібриду з РНК.

Таблиця 3.1. Характеристика деяких конформаційних станів ДНК

| Показник | А-форма | В-форма | С-форма | D- форма | Z- форма |
|--|-----------|------------|------------|------------|-------------------------|
| Число пар нуклеотидних залишків | 11 | 10 | 9,3 | 8,0 | 12 |
| Кут нахилу площин основ до осі спіралі, град | 20 | -2 | -6 | -6 | -7 |
| Кут, повороту основ навколо осі спіралі, град | 32,7 | 36 | 38,6 | 45,0 | -30 |
| Відстань пар комплементарних від осі спіралі, нм | 0,425 | 0,063 | 0,213 | 0,143 | — |
| Відстань між нуклеотидними залишками по висоті спіралі, нм | 0,256 | 0,338 | 0,332 | 0,304 | 0,340 |
| Кут між площинами комплементарних основ, град | 8 | 5 | 5 | — | — |
| Конформація дезоксирибози | C3'-ендо- | C2'- ендо- | C2'- ендо- | C2'- ендо- | C2'-ендо- C3'-ендо - |

Примітка. А-форма отримана з розчинів, що містять іони лужних металів, окрім Li⁺; рентгеноструктурний аналіз — при відносній вологості 75 %. В-форма отримана з підпосолених розчинів, що містять Li⁺; рентгеноструктурний аналіз — при відносній вологості 66 %. С-форма отримана в тих же умовах, що В-форма, але в розчинах з іншим співвідношенням катіонів; рентгеноструктурний аналіз — при відносній вологості менше 66 %. D— форма виділена з фага T2; містить залишки глюкозилізованого оксиметилцитозина; рентгеноструктурний аналіз — при відносній вологості 60%. Z-форма — монокристали полі-(dG — dC) в слабкому сольовому розчині.

В-сімейство ДНК. Для ДНК В-сімейства характерна структурна різноманітність. ДНК з випадковими послідовностями може знаходитися у В-, С-, D - і інших конформаційних станах. На структуру ДНК впливають тип і концентрація катіонів, а також температура. Характеристика відмічених конформаційних станів представлена в таблиці 3.1. Між цими різними формами здійснюються взаємні переходи, які зумовлюються наводненням біомолекули і відмінностями в іонній силі довкілля. Вважають, що у біологічному плані А-форма ДНК бере участь в транскрипції і передачі інформації від ДНК до РНК; а В-форма ДНК

— в реплікативних процесах. С-форма найбільш придатна для упаковки ДНК у складі надмолекулярних структур хроматину - у зберіганні інформації.

Z-форма ДНК. Ліва спіраль, що дістала назву Z-форми ДНК, була виявлена у полінуклеотиді з послідовністю (dG-dC). У розчині з низькою іонною силою цей полінуклеотид утворює подвійні спіралі B-типу. При високій концентрації солей ($MgCl_2$, NaCl) або додаванні спирту подвійна права спіраль переходить в ліву Z-форму.

Особливість Z-ДНК — чергування конформацій нуклеотидних залишків: дезоксицитидин має стандартну конформацію, тобто - цукор C2'-ендо-, основа — анти-, у дезоксигуанозина цукор знаходиться в C3'-ендоконформації, а основа має син-конформацію. Таким чином, геометрія лівої подвійної спіралі визначається чергуванням *син-* і *анти-* конформацій нуклеотидів. Стекінг основ має характерні лише для цієї спіралі властивості: він є між залишками цитозина протилежних ланцюгів, а залишки гуаніну взагалі не взаємодіють один з одним, контактуючи з атомами сусідніх дезоксицитидинів.

B-форма і Z-форма переходять одна в одну при зміні іонної сили розчину або концентрації катіонів, нейтралізуючих негативний заряд на фосфодиефірному каркасі. Для здійснення переходу B→Z не потрібно розходження ланцюгів. Ініціюються розриви водневих зв'язків у декількох пар основ, після чого гуанін «закріплюється» в син-конформації, водневі зв'язки відновлюються і основи знову утворюють уотсон-кріківські пари. Область переходу переміщується уздовж спіралі у вигляді невеличкої петлі.

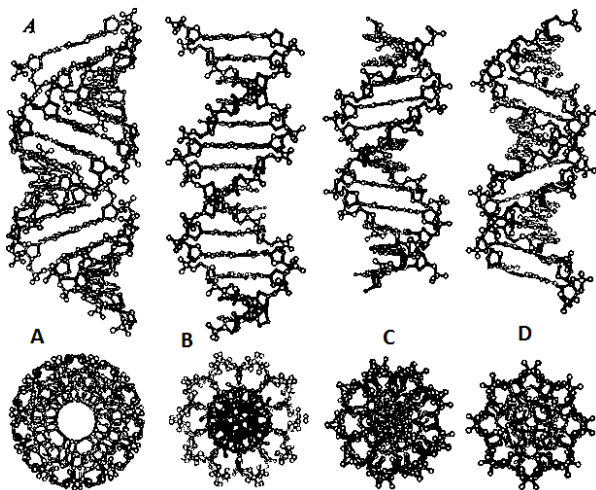


Рис. 3.11. А-, В-, С- і D- форми ДНК (вигляд збоку і згори). Скелетна модель (В.Зенгер, 1987).

Нуклеосомні частки утворюються тільки В-формою ДНК. Перехід в Z-форму руйнує структуру нуклеосом і структуру хроматину. Можливо, Z-форма виконує регуляторну роль, тим більше що перехід B→Z обернений. Регуляція експресії генома може включати суперспіралізацію, пов'язану з білками, специфічними до Z-ДНК, а також зв'язування з певними катіонами типу спермідина і метилуванням дезоксицитидина.

Усередині подвійної спіралі існує конформаційна мікрогетерогенність: залежно від послідовності нуклеотидних пар конформації пентоз в нуклеотидних залишках дещо відрізняються. Це змінює міжнуклеотидні відстані уздовж осі спіралі, а також кут нахилу пар основ до цієї осі. Відмінності у вторинній структурі ДНК, залежні від послідовності нуклеотидів надзвичайно важливі для її функціонування.

Кожна форма ДНК має малий і великий жолобки певного розміру. У Z-ДНК є тільки один малий жолобок, через який проходить вісь спіралі; він глибокий і вузький, з двох сторін обмежений фосфатними групами.

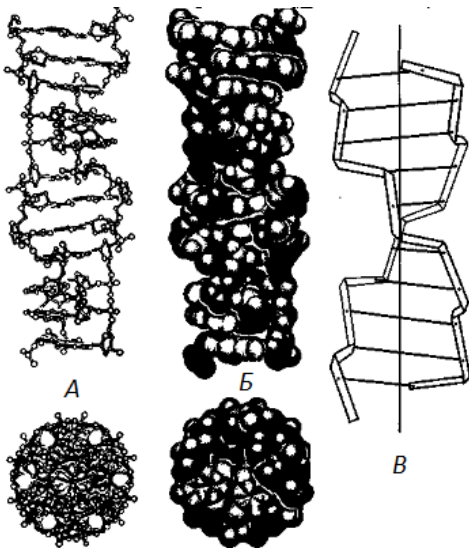
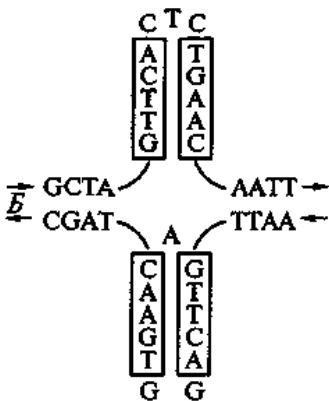


Рис.3.12. Z-форма ДНК: А — скелетна модель (вигляд збоку і згори); Б — об'ємна модель (вигляд збоку і згори); В — зигзагоподібна лінія, що сполучає фосфатні групи в Z-ДНК. Вертикальна пряма — вісь спіралі, горизонтальні відрізки — пари основ і цукру. Після залишків гуаніна зигзагоподібна лінія йде вертикально, після залишків цитозина — горизонтально.

З різними ходами жолобків пов'язана специфічна здатність форм ДНК до комплексоутворення. Більшою мірою вони доступні молекулам води і іонам металів. Стабілізуюча дія молекул води спрямована на посилення стекінг-взаємодій; у разі послаблення останніх молекули води конкурентно взаємодіють з протон-донорними і протон-акцепторними центрами основ, дестабілізуючи подвійну спіраль. Гідратація ДНК відіграє важливу роль в перетворенні А-форми на В-форму ДНК, і навпаки. Катіони зв'язуються в основному з пентозофосфатним

остовом, розташовуючись переважно в малому жолобку подвійної спіралі. Усе це підкреслює динамічність структури ДНК і можливість конформаційних переходів під дією чинників довкілля.

Біспіральні структури в молекулах ДНК можуть виникати і в межах одного полідезоксирибонуклеотидного ланцюга. Для цього в послідовності ДНК мають бути присутніми інвертовані, або «паліндромні» повторювальні послідовності завдовжки від декількох до багатьох тисяч пар основ.



Паліндром (послідовності нуклеотидів, що «біжать назад»; від грец. «палін» — назад, «дроме» — біжу) є дволанцюговою послідовністю ДНК, яка однаково читається в обох ланцюгах, якщо читати відповідно до їх орієнтації. Як приклад можна привести послідовність: 5'GGT:AAC3'

3'CCA:TGG5'

Рис. 3.13. Паліндром ДНК в лінійному (А) і шпильковому (Б) станах.

Віссю симетрії є центральна точка, відносно якої послідовність залишається однаковою при читанні в протилежних напрямках.

Завдяки наявності власної симетрії другого порядку паліндроми можуть утворювати шпилькові структури хрестоподібної форми (Рис.3.13). Такі послідовності сприяють специфічним нуклеїново-білковим взаємодіям і беруть участь в процесах регуляції.

Різноманітність форм ДНК. ДНК може знаходитися в лінійній або кільцевій формі (Рис.3.14). Бактеріальні плазмідні, більшість хромосом бактерій, мітохондріальні і хлоропластні ДНК, геноми вірусів ссавців представлені єдиною кільцевою дуплексною (подвійною) молекулою ДНК. Геноми деяких дрібних вірусів бактерій, рослин і тварин є ковалентними замкнутими одностанцюговими кільцями. Одностанцюгова кільцева ДНК відносно мала: ДНК φX174 і M13 містить 5300 і 6000 нуклеотидів і має довжину 1,5 - 2 мкм.

Проте для реплікації будь-якої з вірусних ДНК потрібне перетворення одностанцюгового кільця на відповідне дволанцюгове, з якого потім утворюються одностанцюгові кільцеві ДНК вірусного потомства. Більше того, експресія генетичної інформації в таких геномах завжди здійснюється у фазі дволанцюгової ДНК, оскільки саме вона є субстратом для транскрипції послідовностей ДНК в РНК. Третинна структура і лінійних і кільцевих форм ДНК характеризується також *супер (понад)спіралізацією*.

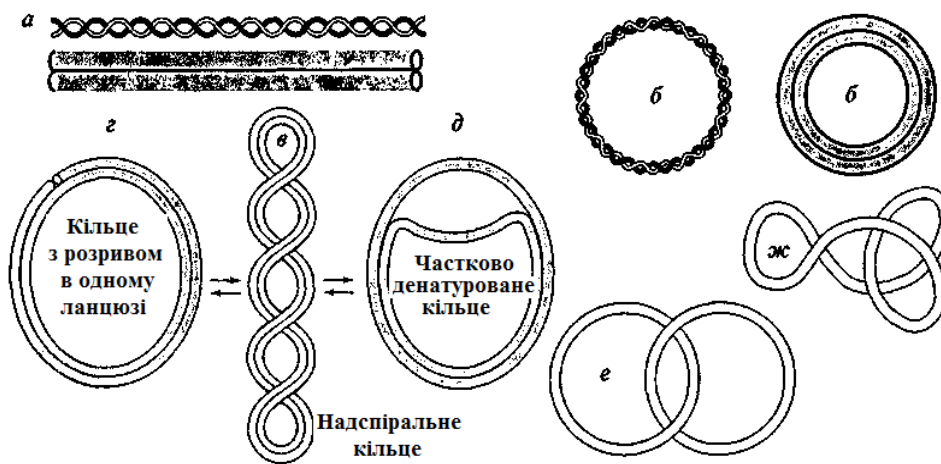


Рис.3.14. Форми ДНК:
 а – лінійна, б – кільцева
 дволанцюгова; в – по-
 надспіральна кільцева;
 релаксовані кільцеві
 форми: розрив одного з
 двох ланцюгів (г),
 локальне розходження
 двох ланцюгів (д);
 катенан (е) і вузол (ж).
 Схематичне зобра-
 ження.

Надспіралізація ДНК. Топоізомери.

У живих організмах молекули ДНК або дуже довгі, або замкнуті в кільце двоспіральні молекули, тому процеси, пов'язані з передачею спадкової інформації стикаються з топологічними проблемами: виникнення позитивної (+) або негативної (-) суперспіралізації ДНК, утворення катенанів або вузлів.

До таких процесів належить реплікація ДНК. Рух реплікативної вилки уздовж ДНК супроводжується розходженням ланцюгів. Вони занадто довгі для того, щоб дозволити реплікативній вилці обертатися уздовж головної осі ДНК. В результаті відбувається позитивна *понадспіралізація* у *батьківській* ДНК: зростає кількість обертів на ділянці ДНК з одночасним зменшенням кількості пар основ на один оберт. Дві копії негативно *суперспіралізуються*. Для них характерне зменшення кількості обертів на відрізку ДНК з одночасним збільшенням кількості пар основ на один оберт. До моменту закінчення реплікації, коли реплікативні вилки зустрічаються, утворюються вузли або (у разі кільцевих молекул) катенани. Напруження при надспіралізації відбувається і в процесі транскрипції. «Переплутування» довгих ниток здійснюється в процесі конденсації і сегрегації хромосом, організації хроматину.

Кільцева ДНК, яка не містить розривів ні в одному з ланцюгів, може існувати в різних топологічних формах. Ці форми характеризуються порядком зчеплення Lk — цілочисельною величиною, що визначає кількість обертів одного ланцюга відносно іншого, порівняно з ДНК, що знаходиться в конформації плоского кільця. Правим виткам відповідають позитивні значення Lk , лівим — негативні. Кожна топологічна форма ДНК (топоізомер) може існувати в нескінченному числі конформації, які визначаються двома параметрами — крученням Tw і *райзінгом* Wr (*writhe* — *скручуватися*): Tw — число витків подвійної спіралі в цьому конформері; Wr — число витків суперспіралі, що утворюється при перекручуванні двоспіральної ДНК навколо себе. Зв'язок цих трьох параметрів між собою визначається рівнянням: $Lk = Tw + Wr$. Коли ДНК знаходиться в релаксованому стані (без жодної напруги), вона може бути розташована в одній площині, тоді $Lk = Tw$. Якщо збільшити або зменшити число витків подвійної спіралі, зберігаючи ковалентну безперервність обох ланцюгів, то така зміна компенсуватиметься утворенням витків надспіралі (Wr). Wr може бути як позитивною, так і негативною величиною.

Кільцеві ковалентнезамкнуті клітинні ДНК завжди мають негативну суперспіралізацію. Міру суперспіралізації ДНК зручно характеризувати щільністю спіралізації яка дорівнює Wr/Tw і не залежить від довжини ДНК. Для багатьох природних ДНК *понадспіралізація* $\sigma = -0,05$. *Понадспіралізована* ДНК має значний запас енергії в порівнянні з її релаксованою формою. Отже, локальне розплітання подвійної спіралі ДНК з негативними надвитками призведе до скидання напруги, що є енергетично вигідним. Це виразно проявляється в тому, що негативна надспіралізація стимулює перехід ДНК з правої В-форми в ліву Z- форму.

Негативна надспіралізація ДНК полегшує зв'язування з нею білків, які розкручують подвійну спіраль.

Вирішують топологічні проблеми *ДНК-топоізомерази* — ферменти, що змінюють топологію ДНК. Топоізомерази релаксують суперспіралізовані ДНК, знімаючи їх внутрішню напругу шляхом внесення одно- і дволанцюгових розривів з подальшим їх відновленням (лігуванням). По механізмі дії розрізняють ДНК-топоізомерази I і II. ДНК-топоізомерази I —

мономерні білки, релаксують ДНК без затрати енергії шляхом внесення одноланцюгових розривів. ДНК-топоізомерази II функціонують у вигляді димерів (у еукаріот) і тетрамерів (у прокаріот), здійснюють АТР-залежне розщеплення обох ланцюгів ДНК з подальшим перенесенням ланцюгів через розрив і його лігування.

Для внесення одноланцюгового розриву в ДНК усі ДНК-топоізомерази використовують залишок тирозину, який здійснює нуклеофільну атаку фосфатної групи ДНК з утворенням фосфотирозину. В результаті ферменти виявляються ковалентно зв'язаними з 5'- або 3'-кінцями ДНК в одноланцюговому розриві.

Топоізомерази підтипу 1-5' зв'язуються переважно з *одноланцюговими ділянками* ДНК, здійснюючи її розрив з утворенням 5'- фосфодіефірного зв'язку з тирозином активного центру ферменту. Через розрив, що утворився, проходить або одноланцюгова ДНК (зняття витка), або дволанцюгова (утворення вузла або катенана). Ферменти цього типу знімають тільки *негативну суперспіралізацію* і характерні для прокаріот.

Топоізомерази підтипу 1-3' зв'язуються з *дволанцюговою ДНК*, розривають один ланцюг з утворенням 3'-фосфодіефірного зв'язку з тирозином активного центру ферменту. Через розрив проходить другий ланцюг дуплексу, зменшуючи щільність суперспіралізації ДНК; знак суперспіралізації істотної ролі не відіграє. Такі топоізомерази характерні для еукаріот.

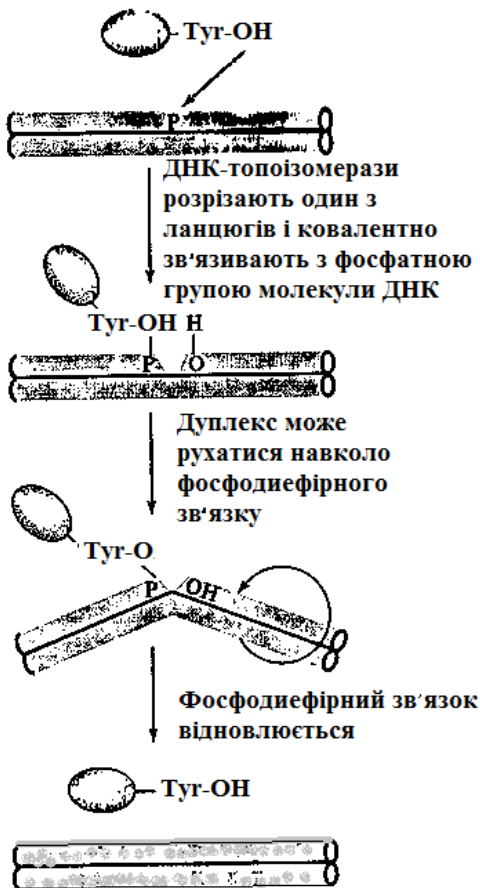


Рис.3.15. Реакції, що каталізуються топоізомеразами I.

Топоізомерази типу II зв'язуються з дволанцюговою ДНК і здійснюють розрив обох ланцюгів з утворенням двох 5'-фосфодіефірних зв'язків з тирозинами активного центру. У щілину, що утворилася, проходить друга дволанцюгова ДНК, і результатом є зміна числа позитивних або негативних супервитків на 2 (ферменти типу I змінюють кількість супервитків на одиницю за крок). Цей фермент здатний катенирувати, декатенирувати і розв'язувати вузли інтактною ДНК. Для багаторазового повторення циклу потрібно АТР (АТФ).

Топоізомераза II *E.coli* (ДНК-гіраза) відноситься до ферментів типу II, але не вимагає АТР. Вона індукуює утворення негативних супервитків в релаксованій кільцевій ДНК. Гіраза взаємодіє з ДНК таким чином, що остання намотується навколо білку. При цьому виникає позитивна суперспіралізація в місцях молекули ДНК зв'язаних з білком. Потім фермент розриває обидві нитки ДНК і переносить подвійну нитку з внутрішньої сторони на зовнішню, після чого скріплює обидва розриви, перетворюючи позитивну петлю на негативну. Це особливо важливо для ініціації реплікації, а також - для її елонгації і термінації.

ДНК-топоізомераза II є життєво важливим ферментом будь-якого еукаріотичного організму. З'ясована роль ДНК-топоізомерази у формуванні вищих рівнів структури хроматину, а саме, участі в утворенні петель хроматину під час конденсації хромосом.

Реплікація ДНК.

Генетична інформація клітинних організмів - нуклеотидна послідовність ДНК. Для збереження унікальних властивостей організму необхідне точне відтворення цієї послідовності в кожному поколінні. Під час ділення клітини кожна з 2-х дочірніх клітин повинна отримати точну копію ДНК, це означає, що перед діленням ДНК повинна подвоїтися. Так, кишкова паличка при утворенні кожного покоління повинна подвоювати повний геном розміром 4×10^6 н.п., а соматичні клітини людини – копіювати 6 млрд. н.п.

Реплікація — складний біологічний процес реакції матричного синтезу, який забезпечує подвоєння молекули ДНК. Відбувається за напівконсервативним механізмом та за принципом комплементарності. Реплікація – ферментативний, енергозалежний процес. Реплікація визначає саморепродукцію на молекулярному рівні і лежить в основі розвитку та розмноженні організмів, забезпечення існування окремих організмів, популяцій та видів.

Модель ДНК Уотсона і Кріка, дозволила зрозуміти принцип реплікації ДНК. Оскільки кожен з ланцюгів ДНК має послідовність нуклеотидів комплементарну другому ланцюгу, то при подвоєнні ДНК ланцюги повинні розходитися, а потім кожен стає матрицею для побудови нового комплементарного ланцюга (напівконсервативний механізм).

Механізм ДНК хімічної реакції, який відбувається при реплікації, полягає в перенесенні залишку дезоксирибонуклеозидмонофосфату від дезоксирибонуклеозидтрифосфату на кінцевий нуклеотидний залишок зростаючого в процесі синтезу нуклеотидного ланцюга.

Оскільки формування нового полінуклеотиду йде на полірибонуклеотидній матриці при безперервному замиканні водневих зв'язків між комплементарними пуриновими і піримідиновими основами матриці і дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, то умовою функціонування цього механізму є одноланцюгова *структура матриці*. У зв'язку з цим істотним моментом в біосинтезі є розщеплення подвійної спіралі ДНК на два ланцюги, на яких буде здійснюватися комплементарний синтез дочірніх ланцюгів. У результаті з однієї молекули ДНК утворюються дві молекули, абсолютно ідентичні материнській молекулі ДНК. Після одного раунду реплікації один ланцюг в кожній з двох дочірніх ДНК є материнським (консервативним), а інший — новосинтезованим. Такий спосіб подвоєння молекул ДНК називається *напівконсервативним* (у 1958 р. М.Мезельсон і Ф.Сталь отримали експериментальний доказ напівконсервативного механізму реплікації ДНК).

Білки і ферменти, що беруть участь в реплікації ДНК.

Процес реплікації ДНК здійснюється за участю великої кількості білків, які утворюють складний і ефективно працюючий реплікативний комплекс.

ДНК-полімерази. Комплементарне копіювання одноланцюгової матриці каталізують ДНК-залежні ДНК-полімерази (ДНК-полімерази). Деякі ДНК-полімерази отримані в чистому вигляді, описані їх фізичні і ферментативні властивості. Хоча ці властивості не зовсім ідентичні, механізм каталізу всіх ферментів у загальних рисах однаковий.

Полімеризація нуклеотидів в процесі реплікації відбувається тільки в одному напрямку: від 5'-кінця до 3'-кінця ($5' \rightarrow 3'$) ланцюга, а ланцюг ДНК що синтезується буде антипаралельним по відношенню до ДНК-матриці (Рис. 3.16). ДНК-полімераза байдужа до послідовності нуклеотидів матриці. ДНК синтезується надзвичайно швидко: в межах від 50 нуклеотидів/с у еукаріот і до 500 нуклеотидів/с у бактерій.

Нормальне розмноження клітин вимагає високої точності копіювання ДНК-матриці, для цього існують спеціальні механізми, один з яких — механізм самокорекції. ДНК-полімераза перевіряє комплементарність кожного нуклеотида матриці двічі: один раз —

перед включенням його до складу зростаючого ланцюга і другий раз — перед тим, як вставити наступний нуклеотид.

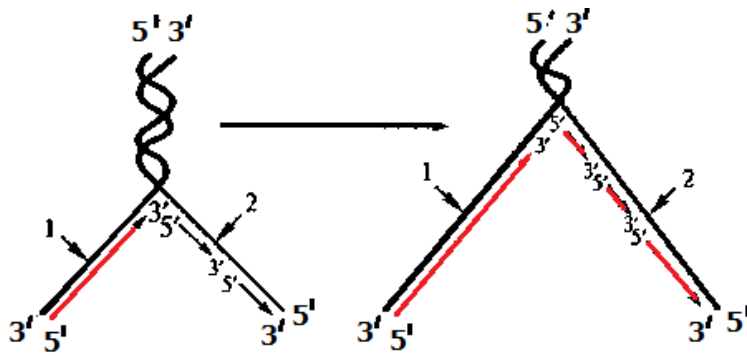


Рис. 3.16. Синтез ланцюгів ДНК в реплікативній вилці.

Черговий фосфодіестерний зв'язок в процесі реплікації утворюється лише в тому випадку, якщо останній 3'-кінцевий нуклеотид дочірнього ланцюга буде комплементарний матриці. Якщо на попередній стадії полімеризації

відбулася помилка, то реплікація зупиняється до тих пір, доки неправильний нуклеотид не буде видалений. Для цього фермент переміщується у зворотному напрямку і вирізає останній нуклеотид. Деякі ДНК-полімерази мають також 3'→5'-екзонуклеазну активність, завдяки якій і відбувається відщеплення некомплементарного нуклеотида, після чого полімеризація відновлюється. В результаті самокорекції частота помилок в ДНК у кишкової палички не перевищує 10^{-9} - 10^{-10} н. за один раунд реплікації.

ДНК-праймаза. ДНК-полімерази не здатні ініціювати синтез нових ланцюгів ДНК, вони можуть лише додавати дезоксирибонуклеотиди до 3'-кінця наявного ланцюга. Щоб молекули ДНК-полімерази могли почати синтез ДНК, їй необхідна *приманка (праймер - primer)*, короткий олігодезоксирибонуклеотид або олігорибонуклеотид, комплементарний відповідній ділянці ДНК-матриці, у якої на кінці є вільна 3'-ОН-група. Нездатність молекул ДНК-полімераз самостійно, без приманки синтезувати ДНК принципово відрізняє їх від інших ферментів матричного синтезу — РНК-полімераз.

На стадії ініціації реплікації коротку РНК-приманку з рибонуклеозидтрифосфатів синтезує фермент ДНК-праймаза. ДНК-праймаза може бути окремим ферментом (у бактерій) або входити як субодиниця в ДНК-полімеразу (у еукаріот). Праймаза — це фермент, відмінний від РНК-полімераз, які синтезують різні клітинні РНК. Після синтезу РНК-праймера, ДНК-полімераза продовжує нарощувати дочірній ланцюг. Новосинтезований ланцюг ДНК містять на 5'-кінці декілька рибонуклеотидів: у прокариот — від двох до п'яти нуклеотидів, у еукаріот їх у два рази більше. Надалі праймери заміщаються сегментами ДНК.

Оскільки два ланцюги в молекулі ДНК антипаралельні, а ДНК-полімерази здатні нарощувати полінуклеотидний ланцюг тільки у напрямку 5'→3', один і той же фермент не може забезпечити збірку дочірніх ланцюгів одночасно у напрямку 5'→3' і 3'→5' відповідно до переміщення реплікативної вилки при розплітання молекули ДНК. Спрямування розплітання подвійної спіралі при реплікації збігається з напрямком синтезу ДНК лише для одного матричного ланцюга, в той же час воно протилежне напрямку синтезу ДНК по другому ланцюгу. На одному матричному ланцюзі з напрямком 3'→5' синтез ДНК може проходити безперервно. На другому ланцюзі, орієнтованому у напрямку 5'→3', ДНК синтезується короткими фрагментами (1000 - 2 000 н. у прокариот і 100 - 200 н. у ДНК еукаріот. (Рис. 3.16).

Ланцюг, який синтезується безперервно, отримав назву *ведучого*, або *лідуючого*, а інший, зібраний з фрагментів Оказакі, *відстаючим*. Синтез кожного з цих фрагментів починається з РНК-приманки. Такий механізм реплікації називається *переривчастим*. Провідний ланцюг потребує тільки одного акту ініціації, а для синтезу відстаючого ланцюга повинно відбутися декілька актів ініціації. Через деякий час РНК-праймери віддаляються, проміжки «забудовуються» ДНК-полімеразою і фрагменти зшиваються спеціальним ферментом ДНК-лігазою в один безперервний відстаючий ланцюг.

ДНК-лігаза. ДНК-лігази сполучають 5'-фосфатну і 3'-гідроксильну групи нуклеотидів,

що знаходяться на протилежних кінцях одноланцюгового розриву в дуплексі ДНК. В результаті утворюється фосфодієфірний зв'язок, що ліквідує цей розрив.

ДНК-лігаза *E.coli* — це одиночний поліпептид (мол. маса 75 кДа). Для утворення фосфодієфірного зв'язку між кінцями нуклеотидних ланцюгів ДНК-лігази використовують енергію гідролізу АТФ або NAD. Реакція протікає в три стадії:

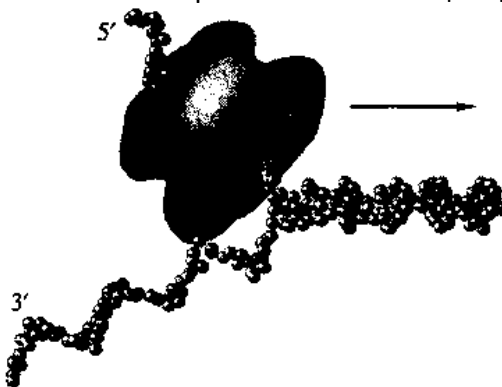
I. *Реакція аденілування ДНК-лігази.* Фермент взаємодіє з АТФ (ДНК-лігаза фагів і ссавців) або NAD (ДНК-лігаза *E.coli*) з утворенням ферменту.

II. *Реакція трансаденілування.* Залишок аденілової кислоти з аденілатлігази перекидається на вільну фосфатну групу 5'-вуглецевого атома рибози кінцевого нуклеотида.

III. *Реакція лігування.* Між зближеними нуклеотидами відбувається утворення фосфодієфірного зв'язку з виділенням АМР (АМФ).

ДНК-хеліказа. Для здійснення комплементарного копіювання дволанцюгової ДНК вона повинна поступово розкручуватися. Розкручування (розплітання), спіралі відбувається тільки в локальній ділянці ДНК. Цю реакцію здійснює хеліказа (ДНК-залежна АТФаза), що використовує енергію гідролізу АТФ (АТФ) для розплітання подвійної спіралі ДНК.

Хелікази мають кільцеву (тороїдальну) структуру, утворену шістьма субодинацями. Такі гексамерні хелікази кільцеподібної форми виявлені у фагів, вірусів, бактерій, архей,



еукаріот. Зовнішній діаметр хеліказного кільця 12-14 нм, внутрішній діаметр — 2-4 нм, достатній для взаємодії з одно- та дволанцюговою ДНК. Хеліказа, яка за рахунок гідролізу АТФ рухається в одному напрямку по одному з ланцюгів ДНК, розплітаючи перед собою подвійну спіраль, внаслідок чого виникає «вилка» (Y) – дві одноланцюгові гілки (Рис. 3.17). Хелікази часто функціонують у складі комплексу, який переміщує реплікативну вилку і здійснює реплікацію розкручених ланцюгів.

Рис. 3.17. Схема розкручування подвійної спіралі ДНК-хеліказою.

Білки, що зв'язуються з одноланцюговою ДНК, або SSB-білки (Single Strand Binding Proteins) здатні споріднюватися з одноланцюговою ДНК незалежно від послідовності основ і взаємодіють з нею по всій довжині розділених ланцюгів. SSB- білок *E.coli* є тетрамером (мол. маса 88 кДа), молекула характеризується високим ступенем асиметрії, перевагою дикарбонових амінокислот над діамінокислотами. Білок кооперативно зв'язується з одноланцюговою ДНК, зберігаючи її в розтягнутому стані. Суть кооперативного способу зв'язування полягає в тому, що зв'язування однієї молекули білка полегшує зв'язування іншої, доки вся ДНК не буде вкрита білком SSB. Якщо хелікази викликають локальне розкручування подвійної спіралі, то SSB-білки стабілізують одноланцюгову ДНК, забезпечуючи умови для комплементарного синтезу. SSB-білки видаляють можливі елементи вторинної структури ДНК; зв'язування одноланцюгової ДНК з SSB-білками стимулює ДНК-полімеразу і підвищує точність її роботи. У еукаріот таким білком є ядерний реплікативний білок А (RPA - гетеротример з субодинацями 70, 32-34 і 11 -14 кДа).

Початок реплікації. Ділянка ДНК, здатна до автономної реплікації, отримала назву *реплікона*. Реплікон містить всі необхідні гени і регуляторні послідовності, які забезпечують регульоване подвоєння ДНК. Ділянка реплікона, в якій починається реплікація, називається репліка тором – областю початку реплікації (replication origin), у *E.coli* — *oriC*.

При ініціації реплікації ініціатор, що кодується репліконом (у *E.coli* — білок Dna A), взаємодіє з реплікатором. Ціла хромосома *E.coli* є репліконом; у еукаріот репліконом називають ділянку ДНК, реплікація якого протікає під контролем єдиної точки початку

реплікації. Точка початку реплікації має специфічну послідовність основ, багату парами А-Т, що, ймовірно, полегшує розділення ланцюгів.

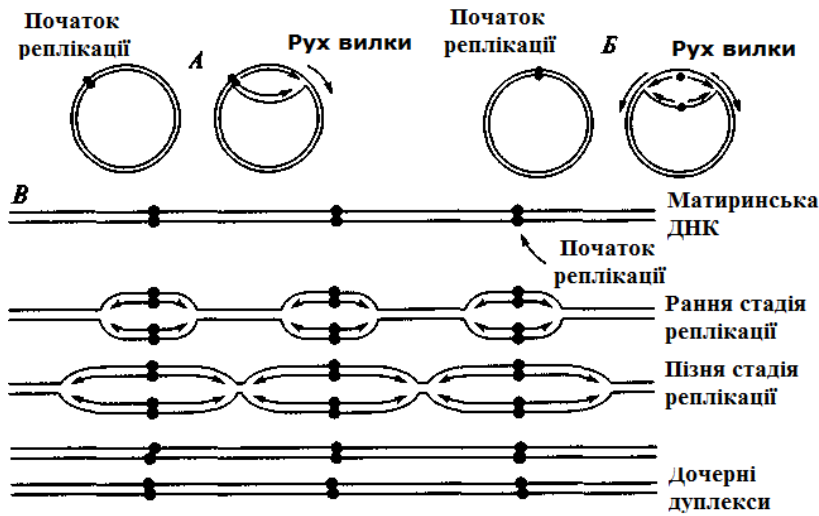


Рис. 3.18. Напрямки реплікації:
 А — однапавлена реплікація в кільцевій молекулі ДНК;
 Б — двонапавлена реплікація в кільцевій молекулі ДНК;
 В — множинна двонапавлена реплікація в еукаріотичній хромосомі (поліреплікон).

В результаті ініціації раунду реплікації в точці *ori* утворюється одна або дві реплікативні вилки. При однапавленій реплікації виникає одна реплікативна вилка

(плазмід *ColF1*), і синтез закінчується в точці *ori*. При двонапавленій реплікації (хромосома *E.coli*) ініціюється дві реплікативні вилки, які переміщуються в протилежних напрямках до тих пір, доки вони не зустрінуться (Рис. 3.18).

Для геномів еукаріотичних хромосом характерна наявність множинних точок початку реплікації, розкиданих по хромосомі на відстані 20 тис. н.п. (поліреплікаційна організація). Після ініціації реплікація продовжується в двох напрямках від кожної точки до тих пір, поки реплікативні вилки двох сусідніх точок реплікації не зіллються.

Реплікація хромосоми *E.coli*. Реплікація краще всього вивчена у кишкової палички.

Білки і ферменти, які беруть участь в реплікації. Основні білки і ферменти, що входять до складу реплікативного комплексу *E.coli*, а також їх функції вказані в таблиці 3.2. У *E.coli* є три ДНК-полімерази — I, II і III (назви подані в порядку їх відкриття).

ДНК-полімераза I — була виділена А.Корнбергом і співр. у 1958 р. Це мультифункціональний поліпептид (мол. маса 109 Да), добре зв'язується з одноланцюговою ДНК або із зонами розриву фосфодіефірних зв'язків в біспіральній ДНК. Вона володіє ДНК-полімеразною активністю, а також здійснює гідроліз фосфодіефірних зв'язків, як в одному ланцюзі ДНК, так і на неспареному кінці дуплексної ДНК, причому за один акт вирізає один нуклеотид із 3'-кінця ланцюга (3'→5'-екзонуклеаза). Друга реакція також полягає у відщепленні нуклеотидів, але гідроліз починається з 5'-кінця дуплексної ДНК у напрямку до 3'-кінця (5'→3'-екзонуклеаза). Ці різні активності властиві різним сайтам поліпептидного ланцюга ДНК-полімерази I. При обробці ферменту трипсином поліпептидний ланцюг розщеплюється на великий і малий фрагменти. Великий, С-кінцевий фрагмент («фрагмент Кльонова») зберігає ДНК-полімеразну і 3'→5'-екзонуклеазну активності; малий, N-кінцевий фрагмент має тільки 5'→3'-екзонуклеазну активність.

ДНК-полімераза I і властива їй екзонуклеазна активність відіграють велику роль в реплікації і репарації хромосомної ДНК *E.coli*. Екзонуклеазна активність 3'→5' забезпечує контроль за приєднанням кожного нуклеотида і вирізанням помилкових нуклеотидів із зростаючого кінця ланцюга. Якщо ця активність пригнічена в результаті мутацій в гені, що кодує ДНК-полімеразу I, то при реплікації генома часто відбуваються мутації — заміни основ. Екзонуклеазна активність 5'→3' здійснює руйнування праймерів, необхідних для синтезу фрагментів Оказакі. У клітині *E.coli* є декілька сотень молекул ДНК-полімерази I. В цілому ДНК-полімераза I має більше відношення до дозрівання реплікуючої ДНК, ніж безпосередньо до полімеразних процесів в реплікативній вилці.

ДНК-полімераза II (мол. маса 90 кДа) — представлена одним поліпептидним

полімеразним ланцюгом, що має 3'→5'-екзонуклеазну активність. Вона погано з'єднується з односторонніми ДНК, але краще працює з біспіральною ДНК, яка має односторонні проломи і має лише 10% ДНК полімеразної активності в порівнянні з ДНК-полімеразою I. Основною функцією ДНК-полімерази II є репарація ДНК.

Таблиця 3.2. Білки, що входять до складу реплікативного комплексу *E.coli*.

| Білки | Ензиматична активність | Біологічна функція |
|---|--|--|
| Dna A | | Впізнання області початку реплікації і залучення до місця зборки решти білкових компонентів реплісоми |
| Dna B | ДНК-ХЕЛІКАЗА | Розкручування подвійної спіралі ДНК в реплікативній вилці |
| Dna 3 | | Забезпечення взаємодії хелікази і праймази з ДНК, що знаходиться в комплексі з SSB-білком |
| Dna G SSB | Праймаза | Синтез РНК-праймерів. Взаємодія з односторонньою ДНК; активація ДНК-полімерази і стабілізація розплетеного дуплексу |
| ДНК-полімераза 1 | ДНК-полімераза 3'-5'- ендонуклеаза 5'-3'- ендонуклеаза | Дозрівання реплікуючої ДНК (забудовування проломів). Корекція помилок. Вирізання РНК-приманки (праймера) |
| ДНК-полімераза III (αθε) — кофермент β-білок | ДНК-полімераза | Синтез лідируючого і відстаючого ланцюгів ДНК. Активація ДНК-полімерази і ДНК-залежної АТРази; здійснення функції «ковзаючого затиску», що забезпечує процесивність реплікації |
| γ-Комплекс (γ, δ, δ', χ, Ψ) | ДНК-залежна АТФаза | Зв'язування приманки з матрицею; активація ДНК-полімерази |
| τ-Білок | | Збірка і димеризація холоферменту ДНК-полімерази |
| Лігаза | Лігаза | Лігування фрагментів ДНК |
| Топоізомераза I | Топоізомераза | Релаксування негативної суперспіралізації |
| Топоізомераза II (ДНК-гіраза) | Топоізомераза | Індукція утворення негативних надвитків, розділення катенанів |

ДНК-полімераза III (мол. маса 103 кДа) — відіграє головну роль у реплікації ДНК у *E.coli*. У кожній клітині міститься тільки 10-20 копій ферменту, приблизно стільки ж, скільки реплікативних вилок. ДНК-полімераза III є основним компонентом мультиферментного комплексу, що ініціює формування реплікативних вилок в точках реплікації, бере участь в елонгації лідируючого ланцюга у вилці і РНК-праймера з утворенням фрагментів Оказакі.

ДНК-полімераза III складається з десяти типів субодиниць (α,β,γ,δ,δ',ε,θ,τ,χ,ψ). Реплікацію здійснює повний фермент — холофермент, що містить всі субодиниці. Холофермент не має 5'→3'-екзонуклеазної активності, у зв'язку з чим для реплікації відстаючого ланцюга необхідна участь ДНК-полімерази I. Полімеразну реакцію здійснює каталітичний кор з α,ε, θ-субодиниць, в якому α-субодиниця має полімеразну активність, ε-субодиниця — 3'→5'-екзонуклеазну активність, функція θ-субодиниці не зрозуміла. Окрім субодиниць, що утворюють полімеразний кор, ДНК-полімераза III - холофермент містить ще сім субодиниць (β,γ,δ,δ',τ,χ,ψ). Ці поліпептиди мають безліч копій, регулюють і підсилюють дію каталітичного ядра (кора) ДНК-полімерази III.

Відмінна риса холофермента ДНК-полімерази III - виключно висока процесивність. Мірою процесивності є довжина фрагмента знов синтезованої макромолекули, яку комплекс (або фермент) здатний створити в одному циклі, не відділяючись від матриці. Встановлено, що холофермент ДНК-полімерази III синтезує провідний ланцюг ДНК завдовжки в 59 909 н. із

швидкістю більше 599 н./с в одному циклі, жодного разу не дисоціюючи від ДНК-матриці.

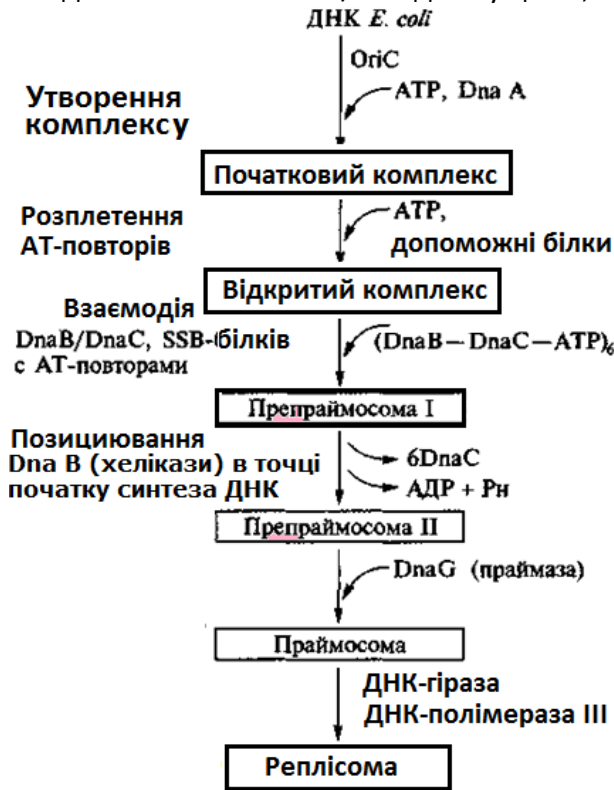


Рис. 3.19. Схема ініціації реплікації хромосоми *E.coli*.

Ініціація реплікації (Рис. 3.19). Хромосома *E.coli* містить єдину область початку реплікації (*oriC*), розмір якої складає 258 н.п.

В *oriC* є п'ять консенсусних дев'ятинуклеотидних сайтів зв'язування ініціаторного білка *Dna A*, названого *Dna A*-боксами. У лівій частині *oriC* разом з *Dna A*-боксами знаходяться АТ-багаті 13-нуклеотидні повтори. Білок *Dna A* розпізнає область початку реплікації і повертає до *oriC* решту білкових компонентів, що беруть участь в ініціації реплікації.

Спочатку білок *Dna A* в комплексі з АТР взаємодіє з *Dna A*-боксами. За допомогою електронної мікроскопії початковий комплекс виглядає як компактна еліпсоїдна структура, що містить ~20 мономерів *Dna A*, яка закриває

oriC. У цьому комплексі частково розплітаються АТ-багаті повтори і формується відкритий комплекс. У процесі беруть участь допоміжні білки, які допомагають *Dna A* розкручувати і згинати ДНК (їх позначають *IME*, *FIS*-фактори і так далі).

Білок *Dna B* (хеліказа) у вигляді гексамерів в комплексі з шістьма мономерами білка *Dna C*, кожен з яких зв'язує одну молекулу АТР, а саме $(Dna B-dna C-ATP)_6$, взаємодіє з одноланцюговими ділянками частково розплетеної ДНК. У цьому комплексі хеліказна активність *Dna B* блокована. Транслокація *Dna B* (хелікази) від місця її первинного входження в комплекс до місця старту реплікативної вилки, яка асоціюється з АТР-залежним звільненням з комплексу білка *Dna Z*, викликає активацію хелікази. Далі хеліказа взаємодіє з білком *Dna G* (праймазою), і цей комплекс грає ключову роль в ініціації реплікації на *oriC*. Обидва ферменти забезпечують зв'язане функціонування двох реплікативних вилок, які рухаються в протилежні сторони: хеліказа починає розплітати дуплекс ДНК, праймаза синтезує перші приманки. У сформованому праймуючому комплексі присутність білка *Dna A* не потрібна, і він після звільнення з комплексу повторно використовується для реплікації на іншому *oriC*.

Складний комплекс білків, що здійснює ініціацію реплікації, отримав назву *праймосоми* (у *E.coli* мол. маса праймосоми 106 кДа). Праймосома у свою чергу є компонентом ще складнішого комплексу — *реплісоми*, яка здійснює процес повної реплікації. Схема ініціації реплікації хромосоми *E.coli* і утворення *реплісоми* представлена на Рис. 3.19. При утворенні *реплісоми* відбувається АТР-залежне формування димерного комплексу холофермента ДНК-полімерази III, пов'язаного з 3'-кінцями праймерів.

Елонгація реплікації. Модель напівконсервативної переривчастої реплікації ДНК в реплікативній вилці представлена на Рис. 3.20. Дуплекс батьківської молекули ДНК розплітає АТР-залежна хеліказа. Одноланцюгові ділянки, що утворюються, кооперативно покриває *SSB*-білок. ДНК-полімераза III рухається по одному з матричних ланцюгів у напрямку розкриття вилки і синтезує провідний ланцюг ДНК. По іншому, матричному ланцюгу в тому ж напрямку рухається праймосома. Час від часу праймаза, що входить до складу праймосоми (білок *Dna G*), синтезує РНК-приманки для відстаючого ланцюга. Друга молекула холофермента ДНК-

полімерази III подовжує ці приманки - синтезує фрагменти Оказакі завдовжки від 1000 до 2000 нуклеотидів до тих пір, поки не досягне попередньої приманки.

Вирізання сегментів РНК з 5'-кінця кожного фрагмента Оказакі здійснює ДНК-полімераза I, використовуючи свою 5'→3'-екзонуклеазну активність. Заповнення пропусків (проломів) між фрагментами Оказакі каталізується також ДНК-полімеразою I. Вона низькопроцесивна, неміцно утримується на матричному ланцюзі і досить швидко відділяється від нього після вирізання РНК. Після полімеразної дії вказаного ферменту між двома сусідніми фрагментами Оказакі залишається тільки одноланцюговий розрив, який

зшиває ДНК-лігаза. Таким чином, з фрагментів Оказакі утворюється безперервний новий ланцюг.

Холофермент ДНК-полімерази III може утворювати димер при участі τ-білка, у зв'язку з чим провідний і відстаючий ланцюги реплікуються одночасно. Подолання антипаралельності ланцюгів при реплікації в цьому випадку здійснюється за рахунок виникнення «петлі» (модель А.Корнберга), де черга фосфодієфірних зв'язків на висхідному відрізку змінюється на зворотну і це дозволяє ДНК-полімеразі III здійснювати синтез фрагментів Оказакі на відстаючому ланцюзі ДНК в тому ж напрямку, що і на провідному ланцюзі (Рис. 3.21).

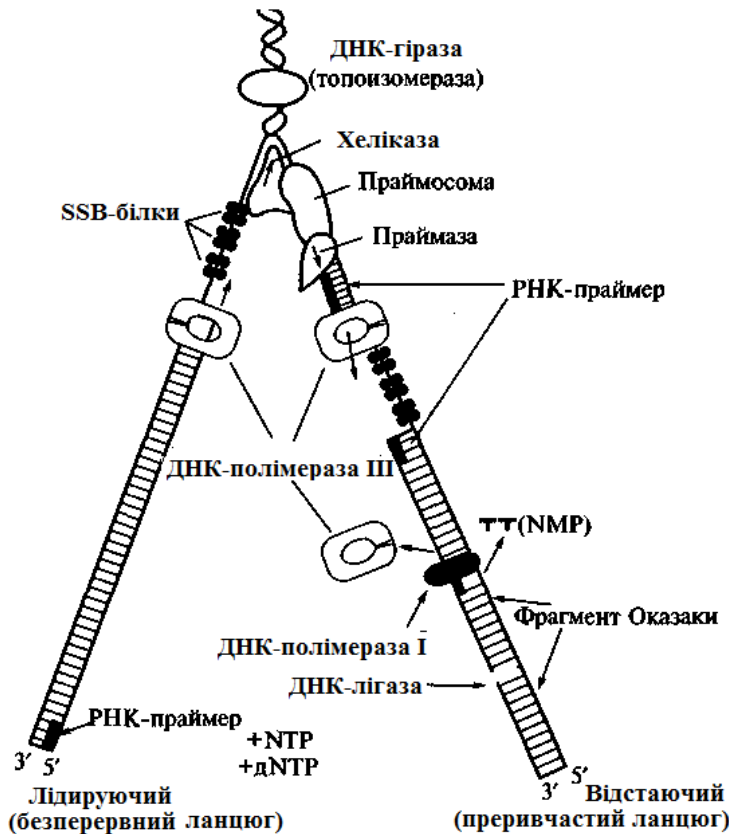


Рис. 3.20. Схема синтезу ДНК в реплікативній вилці у прокариот.

Незвичність ситуації під час синтезу ДНК в реплікативній вилці полягає в тому, що один і той же білковий комплекс здійснює як високопроцесивний безперервний синтез ведучого ланцюга ДНК, так й переривчастий синтез фрагментів Оказакі відстаючого ланцюга з кожного нового праймера. Відомо, що холофермент ДНК-полімерази III включає корфермент, який зв'язує β-білок і білки γ-комплексу.

Роль γ-комплексу полягає в розпізнаванні РНК-приманки на матричній ДНК. Він зв'язується з єдиним праймером провідного ланцюга ДНК або з кожним з праймерів фрагментів Оказакі відстаючого ланцюга, що робить можливим приєднання праймером корфермента і β-білка. Дві молекули β-білка входять до складу реплікативного комплексу разом з білками γ-комплексу, зв'язуючись з ДНК позаду білків γ-комплексу і залишаючи 3'-кінець праймера доступним для ДНК-полімерази. Димер β-білка утворює кільце навколо молекули ДНК і стимулює АТФазну активність білків γ-комплексу. Обидва види білків, будучи пов'язаними з дуплексом праймер-матрицею, забезпечують приєднання до цього комплексу корфермента ДНК-полімерази III. Потім ДНК-полімераза III за наявності чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, використовуючи праймер, з високою ефективністю синтезує провідний ланцюг ДНК. Ті ж самі білки беруть участь і в синтезі відстаючого ланцюга ДНК, але в цьому випадку синтез ДНК багато разів ініціюється на великій кількості праймерів.

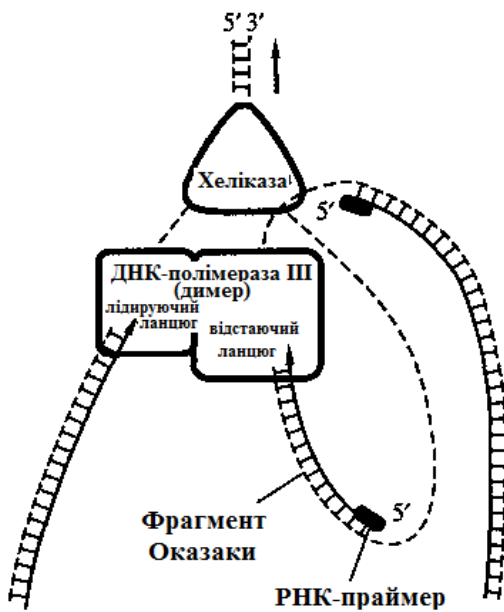


Рис. 3.21. Подолання антипаралельності ланцюгів при реплікації за рахунок виникнення петлі (модель А.Корнберга)

Таким чином, ДНК-полімераза III має здатність впізнавати молекулярне оточення, що створюється матричною ДНК, здійснює термінацію синтезу ДНК за наявності сигналу у вигляді дуплексу ДНК-приманка і знову ініціює синтез ДНК на наступному праймері. Крім того, реплікативний комплекс може розпізнавати пошкодження ДНК і припиняти реплікацію відповідної ділянки, зупиняючись або дисоціюючи від матриці. Реплікація таких ділянок ДНК відновлюється після ліквідації пошкоджень ферментами репарації. Для ДНК-полімерази, що дисоціювала, це стає можливим завдяки тому, що 3'-кінець синтезованого ланцюга ДНК в місці зупинки реплікації залишається пов'язаним з β -білком, що полегшує повторне входження ДНК-полімерази в реплікативний комплекс.

Термінація реплікації відбувається тоді, коли зустрічаються дві реплікативні вилки при подвоєнні кільцевих молекул ДНК. Безперервне зростання лідируючого і відстаючого ланцюгів уздовж кільцевої матриці неминуче приводить до поєднання 3'-гідроксид- і 5'-фосфорильного кінців одного ланцюга, або в точці початку реплікації (однонаправлена реплікація), або — при двонаправленій реплікації — в середині кільця. Кільця в цих місцях зустрічі з'єднуються ДНК-лігазою. ДНК-гіраза може розчепити зачеплені кільця, використовуючи свою можливість вносити тимчасовий дволанцюговий розрив.

Регуляція реплікації. При кожному клітинному поділі кожна молекула ДНК повинна подвоюватися, тобто на кожному *oriC* повинен відбуватися в точності один акт ініціації реплікації. Інакше поступово відбувалася б втрата реплікона або його неконтрольоване накопичення. Таким чином, до регуляції реплікації пред'являються досить жорсткі вимоги: регуляторна система повинна відчувати відхилення в обидві сторони від середнього числа копій даного реплікона і відповідним чином міняти частоту ініціації на *oriC*. Очевидно, що частота ініціації має бути узгоджена також із швидкістю зростання клітин. Існують тонкі механізми регуляції реплікації на рівні ініціації нових раундів.

Позитивним регулятором цього процесу є білок Dna A. Серед моделей, що пояснюють механізм регуляторної дії білка Dna A, найбільшого поширення набула модель титрування Dna A: весь синтезований білок Dna A зв'язується (титрує) Dna A-боксами *oriC* хромосоми. Як тільки кількість молекул ініціатора перевищує число внутрішньоклітинних A-боксів (всі Dna A-бокси зайняті білком) Dna, ініціюється синтез ДНК. Після запуску ініціації на одному *oriC* звільняються молекули Dna A, різко підвищуються його внутрішньоклітинна концентрація і синхронна ініціація синтезу ДНК на інших доступних областях початку реплікації. При цьому асоціація з мембранами першої *oriC* захищає її від повторного використання.

Відмічена активація реплікації транскрипцією, при якій перед РНК-полімеразою має місце локальна позитивна надспіралізація ДНК, а вслід за нею — негативна. Це полегшує утворення відкритих комплексів при ініціації синтезу ДНК.

Сегрегація бактерійних репліконів по дочірнім клітинам при діленні. Стабільна підтримка будь-якого реплікона вимагає не тільки узгодження його реплікації з клітинним діленням, але і впорядкованого розподілу молекул ДНК дочірнім клітинам. Вважається, що правильна сегрегація досягається у бактерій за рахунок прикріплення ДНК до мембрани, причому просторова організація ділянок прикріплення, зони зростання мембрани і клітинної стінки забезпечує автоматичне «розтягування» двох копій ДНК по різним дочірнім клітинам.

Реплікація хромосом у еукаріот.

Механізми реплікації ДНК у еукаріот менш вивчений із-за більшої складності. Основні результати отримані на модельній системі з ДНК вірусу SV40, а процес реплікації досліджували в заражених клітинах людини *in vitro*. У цій системі вірусний білок - Т-антиген, виконує багато функцій, необхідних для реплікації вірусної ДНК. Він є білком-ініціатором, має ДНК-хеліказну активність і необхідний для правильної взаємодії з ДНК ферментним комплексом, що синтезує праймери. В той же час вірус SV40 використовує для реплікації своєї невеликої хромосоми багато білків клітин-хазяїна, що дозволяє досліджувати функціонування реплікативного комплексу клітин людини в такій відносно простій системі.

ДНК-полімерази еукаріот. У клітинах еукаріот є щонайменше шість різних ДНК-залежних ДНК-полімераз: α , β , δ , ϵ , γ , ξ . Чотири з них — α , β , δ , ϵ — безпосередньо беруть участь в реплікації хромосомної ДНК (таблиця. 3.2).

ДНК-полімераза α — перша ДНК-полімераза, виявлена в клітинах еукаріот. Вона представлена в клітині у вигляді міцного комплексу з ДНК-праймазою, що здійснює синтез РНК-приманок. Комплекс ДНК-полімераза α -праймаза є єдиним у еукаріот ферментативним ансамблем, здатним ініціювати синтез ДНК *de novo*. На багатих піримідином ділянках матриці праймаза комплексу синтезує РНК-приманки довжиною приблизно 10 нуклеотидів, які потім елонгуються ДНК-полімеразою без дисоціації комплексу від матриці. В ході реплікації в клітинних ядрах ДНК-полімераза α -праймаза синтезує приманку лідируючої нитки в ділянці *ori* і приманки фрагментів Оказакі відстаючого ланцюга.

Як правило, ДНК-полімераза α не має коректорської 3'→5'-екзонуклеазної активності, екзонуклеазний центр в даному ферменті редукувався.

ДНК-полімераза β є найменшою за розміром і найпростішою по будові ДНК-полімеразою в клітинах еукаріот. Основна функція ДНК-полімерази у клітині пов'язана з ексцизійною репарацією ядерної ДНК. Існують експериментальні вказівки на можливість участі цього ферменту в рекомбінаційних подіях і в реплікації ДНК, зокрема в процесингу фрагментів Оказакі. Так, ДНК-полімераза здатна замінити ДНК-полімеразу 1 в клітинах *E. coli*, мутантах по гену ДНК-полімерази 1, ініціюючи реплікацію із 3'-кінця РНК/ДНК гібрида в районі *ori*.

ДНК-полімераза δ — гетеродимер, що складається з каталітичної субодиниці (125 — 130 кДа) і субодиниці 48-55 кДа, є необхідною для подолання ферментом структурних бар'єрів в природних одноланцюгових матрицях і для зв'язку з чинником процесивності PCNA.

Обидві ферментативні активності — ДНК-полімеразна і 3'→5'-екзонуклеазна — пов'язані з високомолекулярним поліпептидом.

Окрім чинника, у присутності якого процесивність цього ферменту збільшується на два порядки, холофермент включає чинники RFC і RPA. Три молекули PCNA утворюють кільцевий тример з отвором для двониткової ДНК в центральній частині, який є рухомою платформою, що переміщується по ДНК, або «ковзаючою скріпкою» у формі тора (бублика), утримуючу ДНК-полімеразу в ході полімеризації на матриці, що забезпечує високопроцесивний синтез ДНК. Хоча PCNA і прокаріотичний чинник процесивності субодиниця в ДНК-полімерази III *E. coli* мають низьку гомологію на рівні первинної структури, обидва білки формують близькі по просторовій геометрії структури «ковзаючої скріпки».

ДНК-полімераза ϵ , виділена з клітин HeLa, містить два поліпептиди — каталітичний 261 кДа і поліпептид 55 кДа. Каталітичний поліпептид має ДНК-полімеразну і 3'→5'-екзонуклеазну активність. Особливістю холофермента ДНК-полімерази в порівнянні з ДНК-полімеразою δ є його менша залежність від допоміжних чинників (PCNA, RFC і RPA), а також низька (майже на порядок) швидкість синтезу ДНК.

Таблиця 3.3. Білки реплікативного комплексу еукаріотичних організмів.

| Білок | Молекулярна маса (кДа) субодиниць | Ензиматична активність | Біологічна функція |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|---|
| ДНК-полімераза: α (альфа) | 160-185* 67-70 54-58 46-50* | ДНК-полімераза Праймаза | Синтез праймерів на обох ланцюгах ДНК. Транспорт ДНК- полімерази в клітинне ядро. Зв'язування пуринового нуклеотида, приєднання праймази до ДНК-полімерази. |
| β (бета) | 39-40* | ДНК-полімераза | Заповнення проломів при ексцизійній репарації ДНК, участь в рекомбінації, процесінг фрагментів Оказакі. |
| γ (гамма) | 125-140* 35-40 | ДНК-полімераза 3'→5'-екзо-нуклеаза | Реплікація і репарація мітохондріальної ДНК. |
| δ (дельта) | 125-130* 48-55 | ДНК-полімераза 3'→5'-екзо-нуклеаза | Синтез лідируючого ланцюга ДНК генома в реплікативній вилці. Зв'язок з фактором процесивності PCNA. |
| ϵ (епсілон) | 230-261* 55 | ДНК-полімераза 3'→5'-екзонуклеаза | Синтез відстаючого ланцюга геномної ДНК в реплікативній вилці. |
| ξ (дзета) | 173* 29 | ДНК- полімераза 3'→5'-екзонуклеаза | Синтез ДНК на пошкодженій матриці при SOS-відповіді. |
| T-антиген | | ДНК-хеліказа | Розкручування подвійної спіралі ДНК в реплікативній вилці. |
| RPA (реплікативний білок А) | | | Білок, що зв'язується з одноланцюговою ДНК, забезпечує оптимальну для синтезу ДНК конформацію матриць. |
| RFC реплікативний фактор 3) | | ДНК-залежна АТРаза | Зв'язування приманки з матрицею; стимулювання ДНК-полімерази. |
| PCNA (ядерний антиген проліферуючих клітин) | | | Чинник процесивності реплікації; виконує функції «ковзаючого затиску». |
| Лігаза I | | Лігаза | Лігування фрагментів ДНК. |
| FEN1 або MF1 (чинник дозрівання) | | Екзонуклеаза | Вирізання РНК- приманки. |
| РНКаза H1 | | Ендонуклеаза | Вирізання РНК- приманки. |
| Топоізомераза I | | Топоізомераза | Релаксація як позитивних, так і негативних супервитків ДНК. |
| Топоізомераза II | | Топоізомераза | Релаксація позитивних надвитків. |

* Каталітична субодиниця.

Ця відмінність, можливо, пов'язана з різною функцією ДНК-полімераз в реплікативній вилці. Один холофермент, ДНК-полімераза ξ , здійснює швидкий і процесивний синтез лідируючого ланцюга, використовуючи для елонгації єдину приманку синтезовану ДНК-полімеразною δ -праймазою в районі *ori*, і дисоціює тільки після досягнення кінця реплікона, тоді як декілька холоферментів ДНК-полімерази можуть одночасно синтезувати фрагменти Оказакі в «зоні Оказакі», подовжуючи приманки, що синтезуються ДНК-полімеразною β -праймазою на початку кожного фрагмента.

Слід зазначити, що у вищих еукаріот участь ДНК-полімерази ϵ в синтезі ланцюга, що запізнюється, не доведено. Так, при реплікації ДНК вірусу SV40 в безклітинній системі обидва ланцюга на етапі елонгації синтезує ДНК-полімераза δ .

ДНК-полімераза γ локалізована в мітохондріях, її функція пов'язана з реплікацією і репарацією мітохондріальної ДНК, вона кодується ядерним геномом. ДНК-полімераза γ здатна направляти високопроцесивну полімеризацію на одноланцюгових ДНК-матрицях у

відсутності допоміжних чинників. Охарактеризовані також інші ДНК-полімерази еукаріот: η , θ , τ , REVI. Всі ці ферменти беруть участь в репарації ДНК.

Останніми роками разом з поглибленим вивченням будови і властивостей окремих ДНК-полімераз еукаріот велика увага приділяється взаємодії цих ферментів з допоміжними чинниками і механізму функціонування їх у складі багатокomпонентних реплікативних і репаративних комплексів. Список білків, що взаємодіють з ДНК-полімеразами, постійно росте і включає не тільки відомі чинники PCNA, RFC і RPA, але і ключові чинники регуляції клітинного метаболізму, такі, як білки групи MCM (minichromosome maintenance factors), чинники розпізнавання ділянок ori реплікації ORC (origin recognition complex) і ін.

Принципове значення має встановлення того факту, що функціонування реплікативних ДНК-полімераз α, δ, ϵ в ході клітинного циклу регулюється за допомогою специфічних модифікацій посттрансляцій, зокрема фосфорилування.

У клітинах еукаріот синтез ДНК відбувається в основному в специфічних щільних структурах («реплікативних фабриках»), приєднаних до дифузного ядерного матриксу. У складі «реплікативних фабрик», пов'язаних з ядерним матриксом, виявлений мультибілковий 21S комплекс («синтесома»), що включає не менш ніж 30 білків (таб. 3.3).

Ініціація реплікації у еукаріот. Швидкість синтезу ДНК у еукаріот нижча, ніж у прокаріот (~50 нуклеотидів в 1 с у людини). Мабуть, з цієї причини ініціація синтезу ДНК еукаріот відбувається в багатьох точках хромосоми, тобто еукаріотичні хромосоми мають полірепліконну організацію.

Ініціація реплікації у еукаріот відбувається на специфічних множинних послідовностях нуклеотидів — реплікаторах, або оріджинах реплікації. Найбільш вивчені реплікатори дріжджів (ARS — autonomously replicating sequences). У дріжджів на ділянці ДНК завдовжки 5 тис.н.п. знаходиться три окремі реплікатори (ARS). У ссавців області початку реплікації розташовуються на відстані ~100 тис.н.п. один від одного. Встановлено, що синтез ДНК в окремих репліконах відбувається в двох напрямках, причому переміщення реплікативної вилки здійснюється переважно в одному напрямку, який може змінюватися залежно від стадії розвитку організму. Частота використання окремих реплікаторів змінюється в онтогенезі, зменшуючись в клітинах дорослого організму. Реплікатори еукаріот різні між собою по послідовності, але мають декілька ділянок гомології: ДНК-розщеплюючі елементи, ділянки прикріплення до ядерного матриксу, піримідинові тракти, канонічні послідовності, що взаємодіють з білками реплікативного комплексу, АТ-багаті послідовності, ділянки вигинів ДНК та інші.

Ініціація реплікації чітко регулюється. Полірепліконна організація вимагає, щоб в кожному циклі клітинного ділення кожен реплікатор «спрацював» тільки один раз, інакше на хромосомі утворюються розгалужені структури.

Для дріжджових ARS-послідовностей ініціація відбувається один раз в кожній S-фазі клітинного циклу. У вищих еукаріот достатньо довгі ділянки хромосом, що містять декілька сусідніх репліконів, починають синтез ДНК в S-фазі приблизно одночасно, але кожна така ділянка має характерний для нього час ініціації реплікації: одні активуються на початку S-фази, інші — пізніше, а треті — в кінці. Таким чином, існує заборона на повторну ініціацію реплікації в тому ж циклі клітинного ділення, хоча одночасно може відбуватися ініціація на інших, реплікаторах, що не спрацювали раніше.

Деякі дані вказують на те, що подібна заборона знімається в ході мітозу, коли ядерна оболонка розпадається. Порушення заборони на повторну ініціацію призводить до ампліфікації (появі множинних копій) тієї або іншої ділянки хромосоми, де відбулася «зайва» ініціація реплікації.

Елонгація реплікації. Чотирьохсубодинична ДНК-полімераза α утворює функціональні комплекси з рядом ферментів і допоміжних білків. У комплексі, що здійснює реплікацію

лідуючого ланцюга, ДНК-полімераза α пов'язана з ДНК-полімеразою δ , а в комплексі, що синтезує відстаючий ланцюг, — з ДНК-полімеразою ϵ . У еукаріот обидва комплекси зв'язано один з одним в реплікативній вилці подібно до того, як зв'язані холоферменти синтезу лідуючого і відстаючого ланцюгів у прокариот.

Еукаріотична ДНК-праймаза на відміну від аналогічного білка прокариот утворює постійний комплекс з ДНК-полімеразою α , роль якого обмежується синтезом праймерів при реплікації обох ланцюгів ДНК.

Білок PCNA і чинник реплікації C (RFC) також утворюють стабільний комплекс з ДНК-полімеразою δ , а в певних умовах стимулюють і активність ДНК-полімерази ϵ . У багатьох відношеннях PCNA і RFC є функціональними аналогами відповідно β -білка і білків γ -комплексу E.coli. Механізми реплікації ДНК про- і еукаріот істотно відрізняються в тому відношенні, що в другому випадку синтез лідуючого і відстаючого ланцюгів ДНК здійснюють різні ДНК-полімерази, тоді як у E.coli обидва ланцюги ДНК синтезуються диміром ДНК-полімерази III. Дозрівання фрагментів Оказаки у еукаріот вимагає вирізання РНК-приманок за допомогою 5'→3'-екзонуклеази (білкові чинники FEN1 або MF1) і РНКазі H1. ДНК-полімераза β заповнює проломи, рівні вирізаним праймерам, а ДНК-лігаза I сполучає фрагменти відстаючого ланцюга.

Термінація реплікації. Просування реплікативної вилки припиняється тільки при зіткненні з іншою вилкою, що рухається в протилежному напрямку, або після досягнення кінця хромосоми. Після збірки на молекулі ДНК хромосомних білків кожна пара хромосом в процесі мітозу впорядковано розділяється по дочірнім клітинам. Реплікація відбувається в S-фазу клітинного циклу. Відомо, що в регуляції клітинного циклу беруть участь білки цикліни (A, B, D, E). Вони активують цикліназалежні протеїнкінази, і ті можуть фосфорилювати специфічні білки (цикліни), що беруть участь в підготовці клітини до ділення. Так, циклін D регулює перехід клітини з G₁-фази в S-фазу; циклін A і E — активують синтез ДНК на початковій стадії S-фази; циклін B регулює перехід клітини з G₂-фази в M-фазу.

Реплікація теломерних ділянок еукаріотичних хромосом. На кінцях хромосом еукаріот знаходяться спеціалізовані послідовності ДНК, що повторюються - *теломерна ДНК*, а кінці хромосом, що її містять — *теломери*. У клітинах тварин кількість хромосом, а отже, і теломерних ділянок невелика — незначна частина від решти всіх послідовностей.

Використання як об'єкту дослідження теломерної ДНК війкової інфузорії *Tetrahymena thermophila*, в клітинах якої знаходяться десятки тисяч дрібних хромосом, а отже, і безліч теломер, показало, що теломери побудовані з коротких (6-8 нуклеотидних залишків) послідовностей - блоків, що багато разів повторюються. При цьому один ланцюг ДНК збагачений залишками гуанілової кислоти (G-багатий ланцюг, у тетрахімени — це блок TTGGGG), а комплементарний їй ланцюг збагачений залишками цитидилової кислоти (C-багатий ланцюг). Теломерна ДНК людини побудована з TTAGGG-блоків, тобто відрізняється від одноклітинних всього лише одним нуклеотидом в повторі. З TTAGGG-блоків побудовані теломери всіх ссавців, рептилій, амфібій, птахів і риб. Універсальний і теломерний повтор (TTTAGGG) у всіх рослин.

Характеристикою теломерів є їх довжина. У клітинах джгутикових розмір теломер складає ~50 н.п. У людини вона коливається від 2 до 20 тис. н.п., а у деяких видів мишей досягає сотні тис. н.п. Відмічена значна гетерогенність в різних клітинах і тканинах навіть одного організму: довжина ДНК в теломерах хромосом людини клітин зародкової лінії складає 10-15 тис. н.п., а в лейкоцитах периферичної крові 5 - 12 тис. н.п. Теломери відіграють важливу роль в створенні специфічної архітектури і внутрішній впорядкованості клітинного ядра. Вони запобігають деградації і злиттю хромосом, а також відповідають за їх прикріплення до спеціальної внутрішньоклітинної структури - скелету клітинного ядра.

Механізми реплікації теломерних ділянок еукаріотичних хромосом і центральних

ділянок ДНК принципово відрізняються. Всі відомі ДНК-полімерази є ферментами складного реплікативного комплексу еукаріот, але нездатні повністю подвоювати кінці лінійних молекул ДНК. Відомо, що ДНК-полімерази, синтезуючи дочірню нитку ДНК, прочитують материнську нитку в напрямку від її 3'-кінця до 5'-кінця. Відповідно дочірній ланцюг синтезується у напрямку 5'→3'. Крім того, ДНК-полімераза починає синтез тільки із спеціального РНК-праймера, комплементарного ДНК. Після закінчення синтезу ДНК РНК-праймери вирізаються, а пропуски в дочірньому ланцюжі ДНК заповнюються ДНК-полімеразою. Проте на 3'-кінцевих ділянках ДНК такий пропуск заповнений бути не може, і тому вони залишаються одноланцюговими, а їх 5'-кінцеві ділянки — недореплікованими (Рис. 3.22). Звідси ясно, що при кожному раунді реплікації хромосоми коротшатимуть на 10-20 нуклеотидів (у різних видів розмір РНК-приманки різний), і насамперед скорочують довжину теломерної ДНК. Виникає проблема «кінцевої недореплікації ДНК». У разі реплікації кільцевої бактеріальної ДНК цієї проблеми не існує.

Проблема недореплікації 3'-кінців лінійних молекул вирішується еукаріотичними клітинами за допомогою спеціального ферменту — *теломерази*. Цей фермент був виявлений вперше в 1985 р. у інфузорії *Tetrahymena thermophila*, а згодом — в дріжджах, рослинах і у тварин, зокрема в яєчниках людини і іморталізованих (безсмертних) лініях ракових клітин HeLa.

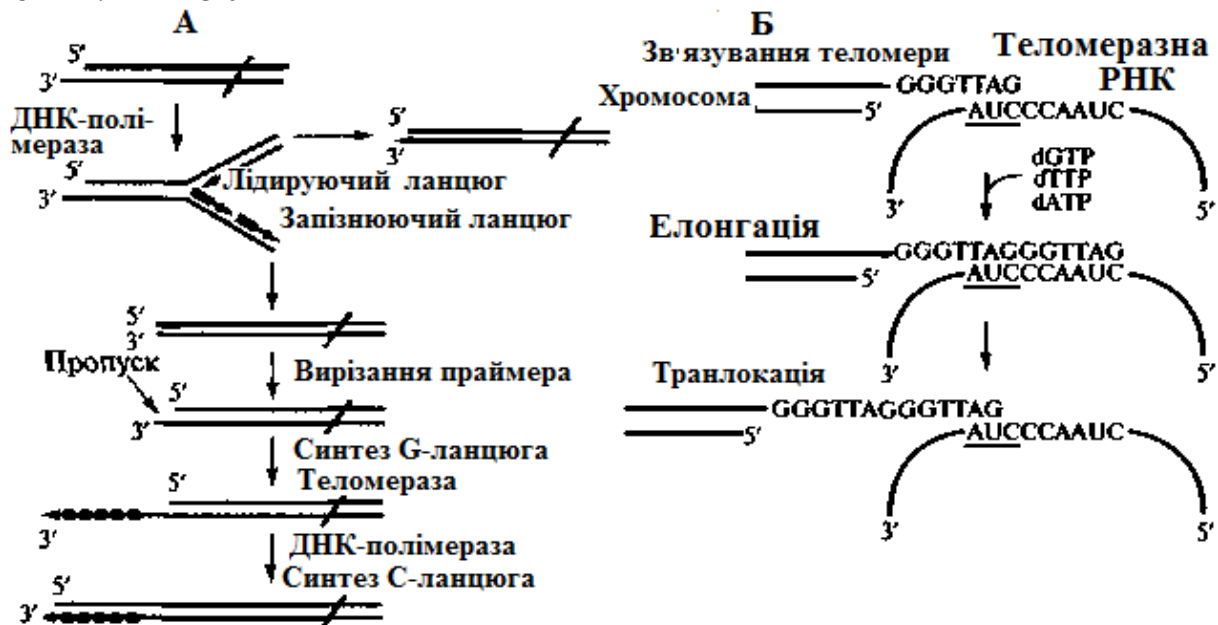


Рис. 3.22. Реплікація теломерних ділянок еукаріотичних хромосом: А - виникнення недореплікованого 5'-кінця лінійної хромосоми і синтез на ньому кінцевої ділянки теломерної ДНК за допомогою теломерази; Б — основні етапи синтезу теломерного повтору теломеразою.

Теломераза є ДНК-полімеразою, що добудовує 3'-кінці лінійних молекул ДНК хромосом короткими (6-8 н.) послідовностями, які повторюються (у хребетних TTAGGG). Згідно номенклатурі, цей фермент називають ДНК-нуклеотидилекзотрансферазою, або теломерною термінальною трансферазою (мол. маса 103-133 кДа). Окрім білкової частини теломераза містить РНК, що виконує роль матриці для нарощування ДНК повторами. Довжина теломерної РНК коливається від 150 нуклеотидів — у найпростіших до 1400 нуклеотидів — у дріжджів, у людини — 450 нуклеотидів. Наявність в молекулі теломерази РНК-послідовності, по якій йде матричний синтез фрагмента ДНК, дозволяє віднести теломеразу до своєрідної зворотної транскриптази, тобто ферменту, здатному вести синтез ДНК по матриці РНК. Основне призначення теломерази — синтезувати тандемні блоки ДНК, з якої складається G-ланцюги теломерної ДНК. Матрична ділянка представлена в теломеразній РНК тільки один раз. Його довжина не перевищує довжину двох повторів у теломерній ДНК. Схему механізму синтезу теломерних повторів, теломеразою, що каталізує, див. на Рис. 3.22.

На першій стадії (зв'язування теломери) відбувається комплементарна взаємодія частини матричної ділянки теломеразної РНК із 3'-кінцевим одноланцюговим сегментом ДНК хромосом. При цьому 3'-кінцевий фрагмент ДНК служить приманкою для подовження цієї ДНК на РНК-матриці. На стадії елонгації виступаючий ланцюг ДНК подовжується до кінця матриці. Ця реакція здійснюється РНК-залежною ДНК-полімеразною активністю теломераз.

Після подовження виступаючого ланцюга ДНК до кінця матриці відбувається транслокація, тобто переміщення матриці і білкових субодиниць ферменту на синтезований кінець теломеразної ДНК, і весь цикл повторюється знову. Після завершення подовження одноланцюгової 3'-кінцевої теломерної послідовності другий ланцюг ДНК (С-ланцюг) добудовується за допомогою звичайної ДНК-полімерази. Так відбувається кінцева реплікація ДНК у еукаріот.

Припускають, що у складі теломеразі окрім двох відмічених компонентів — зворотної транскриптази і теломеразної РНК — мають бути субодиниці, що відповідають за пошук і зв'язування 3'-кінця хромосоми, за транслокацію, за зв'язування продукту реакції (однотяжевої ДНК), а також субодиниця з нуклеазною активністю, яка відщеплює від 3'-кінця теломерної ДНК один за одним нуклеотиди до тих пір, поки на цьому кінці не опиниться послідовність, комплементарна потрібній ділянці матричного сегменту теломеразної РНК.

Недавні дослідження виявили різке підвищення активності теломераз, характерне для пухлинних клітин, що є чутливим маркером їх злякисного переродження. У зв'язку з цим сьогодні як один з підходів до терапії пухлин розглядають пригнічення активності теломераз, функціонування яких необхідне для іморталізації клітин і росту пухлин.

Існування теломер у еукаріот має глибокий сенс. Теломераза виявлена в ембріональних клітинах, які постійно і швидко діляться, і безперервне подовження хромосом необхідне для компенсації їх постійного вкорочення. У соматичних клітинах, які діляться не часто, теломераза не виявлена. Можна припустити, що соматичні клітини отримують свою «порцію» теломерної ДНК, необхідну на час життя клітини і її потомства. Теломери в більшості клітин коротшають з віком, і це може бути важливим чинником довголіття. Таким чином, вивчення механізму роботи теломеразі і регуляції її експресії в клітині допоможуть зрозуміти молекулярні основи процесу старіння і злякисної трансформації живих клітин.

Реплікативний комплекс білків — реплісома — вивчений досить добре у *E.coli*. Постійно накопичуються дані про компоненти реплісоми еукаріот, вони показують, що багато рис її організації і функціонування загальні у про- і еукаріот. Ініціація реплікації і переривистий синтез ДНК на відстаючому ланцюзі здійснюються по РНК-праймерному механізму і є універсальною властивістю реплікації ДНК у про- і еукаріот.

Основні компоненти системи реплікації у філогенезі функціонально консервативні, і будь-який білковий компонент системи прокариот має свій прототип в системі реплікації ДНК ссавців. Загальною межею є функціонування в реплікативній вилці ДНК-топоізомераз, хеліказ, білків, що зв'язують і стабілізують односпіральної ДНК, високополімерної ДНК-полімерази, праймази, 3'→5'-екзонуклеаз, лігази.

Дивовижним є те, що у білків різних організмів, що виконують однакові функції в реплікації, у більшості випадків відсутня гомологія їх амінокислотних послідовностей. Так, не виявлена схожість у білка SSB *E. coli* і білка RPA реплікативної системи людини. Те ж саме характерне і для Р-субодиниці ДНК-полімерази III *E.coli* (в-білок) і білка PCNA людини. Це вказує на можливість виконання одних і тих же функцій поліпептидними ланцюгами з різними амінокислотними послідовностями, а також на вірогідне конвергентне еволюційне походження таких білків і їх функцій з різних неспоріднених білків-попередників.

Реплікація ДНК у прокариот і еукаріот істотно відрізняється. Для вищих організмів характерні: складніша організація ініціації реплікації (множинність репліконів у еукаріот і однорепліконна організація у бактерій), чіткий часовий порядок включення репліконів,

тимчасова узгодженість подальших актів лігування ДНК по фланкуючим реплікони кінцям, складний зв'язок реплісом з матриксом ядра і, нарешті, своєрідний механізм реплікації теломерних ділянок еукаріотичних хромосом.

Саме реплікація ДНК забезпечує відтворення спадкової інформації при утворенні нових клітинних поколінь. Приблизно в той же час відбувається подвоєння кількості і хромосомних білків. Отже, реплікація ДНК — складова частина складніших процесів — реплікації хромосом та клітинного циклу.

Системи виправлення помилок реплікації. Коректорські властивості ДНК-полімераз. Механізми репарації пошкодженої ДНК. Поняття про захворювання репарації ДНК.

Передача спадкової інформації в неспотвореному вигляді - найважливіша умова виживання як окремого організму, так і виду в цілому. Більшість змін в структурі ДНК небажані: вони призводять до шкідливих мутацій або блокують реплікацію ДНК і викликають загибель клітин. ДНК постійно піддається хімічним змінам в результаті дії спонтанних і індукованих чинників середовища: УФ-випромінення, іонізуюча радіація, хімічні мутагени, температура та ін. До спонтанних ушкоджень відносяться: помилки реплікації (утворюються пари некомплементарних нуклеотидів - місметчі); апуринізація (відщеплення азотистих основ від сахаро-фосфатного остову - утворення AP-сайтів) і дезамінування (відщеплення аміногрупи від азотистої основи).

До індукованих ушкоджень відносять: димеризацію (зшивання сусідніх піримідинових основ з утворенням димера); розмикання пуринового кільця; одноланцюгові і дволанцюгові розриви в ДНК; зшивання між ланцюгами ДНК. В ході еволюції виробилася система, що дозволяє виправляти порушення в ДНК, викликані помилками реплікації або ушкоджувальними агентами зовнішнього середовища - система репарації ДНК. В результаті її активності на 1000 ушкоджень в ДНК тільки одна призводить до мутації. Порушення в системі репарації можуть призводити до передчасного старіння, розвитку онкологічних захворювань, хвороб аутоімунної системи і цілого ряду інших генетично обумовлених дефектів. Так, у людей, що страждають пігментною ксеродермою (спадкове захворювання, проявляється вогнищами раку шкіри), порушення системи репарації призводить до того, що вони не можуть перебувати на сонячному світлі через повну незахищеність від УФ-випромінення. Частота захворювання раком збільшується з віком, ймовірно, за рахунок накопичень ушкоджень в ДНК, пов'язаних з послабленням системи репарації.

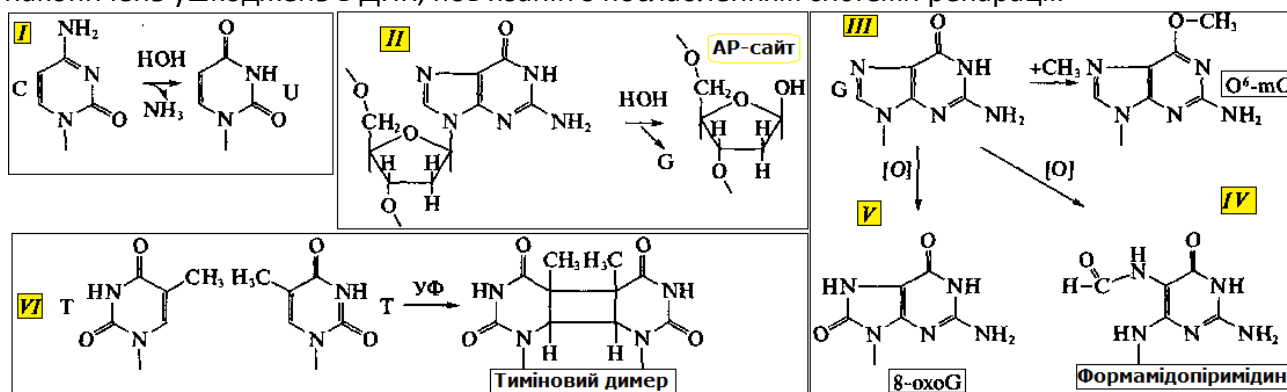


Рис. 3.23. Найбільші ушкодження, що часто виявляються в нуклеотидах ДНК: I - дезамінування; II - апуринізація; III - метилування; IV - розмикання кільця; V - окислення; VI - утворення тимінових димерів.

Встановлено, що в геномі зародкової лінії клітин ссавців і людини відбувається в середньому 6 нуклеотидних заміन в рік. Ймовірно, і в соматичних клітинах відбувається така ж кількість мутацій. Їх накопичення з віком підвищує вірогідність ракового переродження клітин. В цілому вважають, що 80-90% усіх ракових захворювань і деякі спадкові хвороби людини пов'язані з порушеннями роботи системи репарації. До них відносять

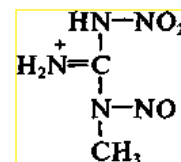
триходистрофію (нестача сірки в клітинах волосся, що веде до їх ламкості; аномалії шкіри і зубів; дефекти статевого розвитку), синдром Кокейна (карликовість, глухота, атрофія зору та ін.); анемія Фанконі (зменшення кількості усіх клітинних елементів крові, скелетні порушення, мікроцефалія, втрата слуху).

Відомі чотири основні типи ушкоджень в ДНК: ушкодження поодиноких нуклеотидів; ушкодження пари нуклеотидів; розрив ланцюгів ДНК; утворення поперечних зшивань між основами одного ланцюга або різних ланцюгів ДНК. Система репарації здатна виправляти усі пошкодження в ДНК, проте механізми репарації вивчені тільки відносно перших двох типів, в основі яких лежать зміни структури гетероциклічних азотистих основ. Усунення розривів в ланцюгах ДНК, ймовірно, досягається прямим лігуванням за участю ДНК-лігаз або в процесі рекомбінації молекул ДНК, а механізми усунення поперечних зшивань доки не вивчені.

Найбільш часті пошкодження нуклеотидів: окислення, дезамінування, алкілювання азотистих основ, утворення піримідинових димерів, вставка нуклеотидів або включення основ-аналогів (утворення не канонічних пар основ), гідроліз N-глікозидних зв'язків між основою і дезоксирибозою. Так, спонтанне (чи індуковане підвищення температури) дезамінування азотистих основ змінює структуру ДНК, перетворює цитозин на урацил - азотисту основу, не властиву ДНК, яка не розпізнається системою репарації (рис. 3.23).

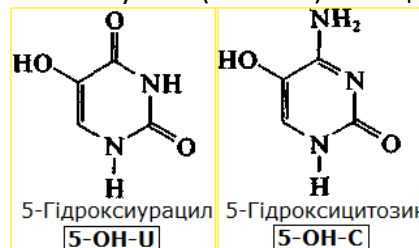
Апуринізація - гідролітичне відщеплення азотистих основ з ланцюга ДНК - призводить до утворення AP-сайтів (рис. 3.23, II), що пов'язано з термолабільністю N-глікозидного зв'язку пуринових нуклеотидів. Термін "AP-сайт" об'єднує усі випадки відщеплення основ з утворенням апуринових або апіримідинових сайтів. Щодня ДНК кожної клітини людини втрачає від 5 000 до 10000 пуринових основ, які мають бути відновлені.

Алкілювання ДНК відбувається за участю алкілюючих реагентів (мутагенів), більшість з яких є канцерогенами. Один з продуктів такої модифікації - o⁶-метилгуанін (рис. 3.23, III). До потужних алкілюючих (що метилують) агентів належать афлатоксин нижчих грибів роду *Aspergillus* (вважають арахіс), а також різноманітні нітросоаміни, наприклад, N - Метил - N -нітро- N - нітросогуанидин:



Нітросоаміни утворюються з вторинних амінів, азотистої кислоти і її солей (нітритів), які з'являються в організмі людини в процесі відновлення нітратів, що надходять з їжею. До найбільш потужних алкілюючих реагентів належать іприт і його похідні: $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \rightarrow$ іприт (β' - дихлордиетилсульфід). Похідні іприту здатні викликати численні поперечні зшивки в молекулі ДНК, що приводить до летального результату.

Окислення азотистих основ в ДНК викликається різними активними формами кисню (АФК). Окислювальні властивості мають супероксиданіон-радикал (O_2^*) і одноелектронний гідроксил ($^*\text{OH}$). Ці сполуки можуть викликати окислювальні ушкодження в ДНК: розмикання пуринового кільця з утворенням формамідопіримідинів (рис. 3.23, IV) або окислення пуринів (рис.3.23, V). У останньому випадку найчастіше утворюється 8-оксогуанін (8-охо-G) - похідне гуаніну, який є мутагеном і здатний утворювати водневі зв'язки з аденіном і виникненню мутацій (трансверсій) в процесі реплікації ДНК ($\text{G} \equiv \text{C}$ замінюється на $\text{A} = \text{T}$). Найбільш стабільними продуктами окислення цитозину є 5-гідроксицитозин (5-ОН-С) і 5-гідроксиурацил (5-ОН-У) :



Наявність таких основ в матричному ланцюзі ДНК призводить до утворення в процесі реплікації неканонічних пар основ: (5-ОН-С:А; 5-ОН- U: C), що веде до трансверсій $\text{C} \rightarrow \text{T}$ і $\text{C} \rightarrow \text{G}$.

Тимінові димери виникають в ДНК за рахунок утворення ковалентних зв'язків між сусідніми тимінами, розташованими в одному ланцюзі ДНК і це викликається УФ-

опроміненням (рис. 3.23, VI).

Системи репарації ДНК досить консервативні в еволюції від бактерій до людини і найбільш вивчені у *E.coli*. Відомі два типи репарації: пряма і ексцизійна (excision - вирізування). Пряма репарація - найбільш простий шлях усунення ушкоджень в ДНК, в якому зазвичай задіяні специфічні ферменти, здатні швидко (в одну стадію) усунути відповідне ушкодження, відновлюючи початкову структуру нуклеотидів. Так діє, наприклад, O^6 -метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза, яка знімає метильну групу з азотистої основи на один з власних залишків цистеїну (рис. 3.24, А). У *E.coli* в 1 хвилину може синтезуватися до 100 молекул цього білку. Аналогічний за функціями білок вищих еукаріот відіграє важливу роль в захисті від раку, що викликається алкілюючими чинниками. AP-сайти можуть репаруватися шляхом прямої вставки пуринів за участю ферментів, названих ДНК-інсертасами (insert - вставляти).

Тимінові димери "розшиваються" шляхом прямої репарації за участю фотоліаз, що здійснюють відповідне фотохімічне перетворення (рис.3.24,Б). ДНК-фотоліази є групою ферментів, що активуються світлом, з довжиною хвилі 300-600 нм (видима область), для цього в їх структурі є особливий світлочутливий центр. Вони широко поширені в природі і виявлені у бактерій, дріжджів, комах, рептилій, земноводних і людини. Ці ферменти потребують кофакторів (FADH, тетрагідрофолієва кислота та ін.), що беруть участь у фотохімічній активації ферменту. Фотоліаза *E.coli* - білок з молекулярною масою 35 кДа, міцно пов'язаний олігорибонуклеотидом довжиною 10-15 н., який необхідний для активації ферменту.

Ексцизійна репарація включає видалення пошкоджених азотистих основ з ДНК і наступне відновлення нормальної структури молекули. У ексцизійній репарації беруть участь декілька ферментів, а сам процес охоплює пошкоджені і сусідні нуклеотиди. Окрім цього, для ексцизійної репарації потрібний другий комплементарний ланцюг ДНК (рис. 3.25).

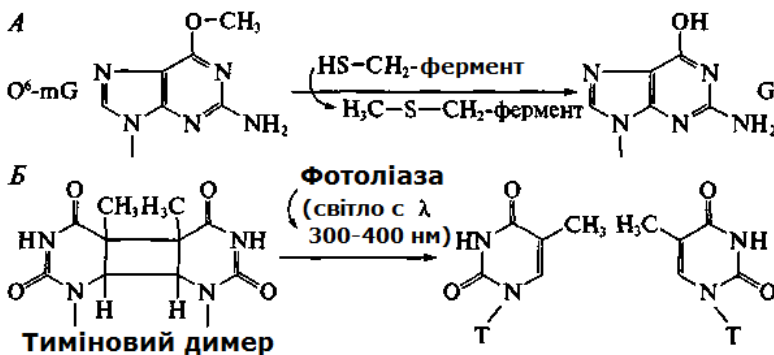


Рис. 3.24. Пряма репарація ДНК:
А - метильована основа (O^6 -mG) відновлюється ферментом метилтрансферазою, який переносить метильну групу на залишок цистеїну;
Б - фотоліаза приєднується до тимінового димера, і після опромінення видимим світлом (300-600 нм) димер розшивається з олігорибонуклеотидом (10-15 н.), який необхідний для активації ферменту.

Першим етапом ексцизійної репарації є вирізування аномальних азотистих основ. Його каталізують ДНК-N-глікозилази, які розщепляють глікозидний зв'язок між дезоксирибозою і азотистою основою. У людини ДНК-N-глікозилази мають високу субстратну специфічність: різні ферменти цього сімейства розпізнають і вирізають різні аномальні основи: 8-оксогуанін, урацил, метилпурини та ін. В результаті утворюється AP-сайт, який атакується ферментом AP-ендонуклеазою. Він розриває сахарофосфатний остов молекули ДНК в AP-сайті і створює умови для роботи наступного ферменту - екзонуклеази, яка послідовно відщеплює декілька нуклеотидів від пошкодженої ділянки ланцюга ДНК. У бактерій звільнене місце далі заповнюється нуклеотидами за участю ДНК-полімерази I, що орієнтується на комплементарний ланцюг ДНК. Оскільки ДНК-полімераза I здатна подовжувати 3'-кінець одного з ланцюгів в місці розриву дволанцюгової ДНК і видаляти нуклеотиди з 5'-кінця того ж розриву, тобто здійснювати нік-трансляцію, цей фермент грає ключову роль в репарації ДНК. Остаточне зшивання репарованих ділянок здійснює ДНК-лігаза.

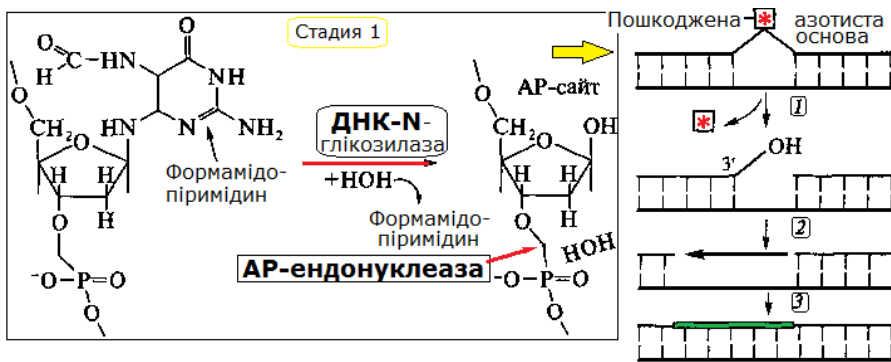
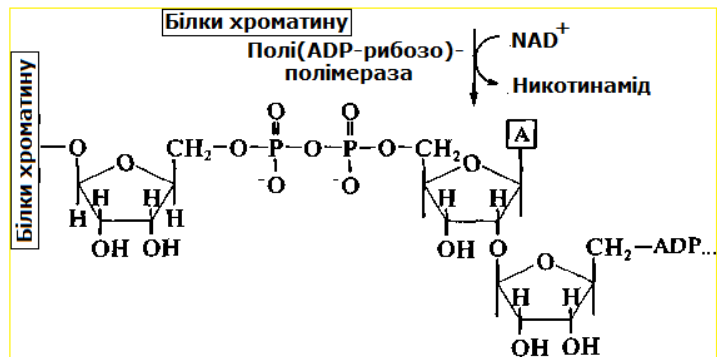


Рис. 3.25. Схема ексцизійної репарації:
 1 - ДНК-N-глікозилаза видаляє пошкоджену основу, АР-ендонуклеаза вносить розрив до ланцюга ДНК; 2 - екзонуклеаза видаляє ряд нуклеотидів; 3 - ДНК-полімераза заповнює звільнену ділянку комплементарними нуклеотидами, а ДНК-лігаза зшиває репарований ланцюг ДНК. Стадія 1 деталізована.

Ексцизійна репарація ДНК в клітинах ссавців супроводжується різким сплеском активності ще одного фермента - полі(ADP-рибозо)-полімерази. При цьому відбувається ADP-рибозилірування білків хроматину (гістонових і негістонових білків), що веде до послаблення їх зв'язку з ДНК і відкриває доступ ферментам репарації. Донором ADP-рибози в цих реакціях виступає NAD⁺, запаси якого сильно виснажуються при ексцизійній репарації ушкоджень, що викликаються рентгенівським опроміненням:



Негативно заряджені залишки ADP-рибози із складу NAD⁺ приєднуються через радикал глутамінової кислоти або фосфосерина до білка хроматину, що веде до нейтралізації позитивних зарядів цих білків і послаблення їх контакту з ДНК. ДНК-глікозилази, що беруть участь в усуненні окислювальних ушкоджень ДНК в клітинах прокариот і еукаріот,

дуже різноманітні і відрізняються субстратною специфічністю, просторовою структурою і способами взаємодії з ДНК. До найбільш вивчених ДНК-глікозилаз відносять: ендонуклеазу III (Endo III), формагідопіримідин-ДНК-глікозилазу (Fpg), Mut T і Mut Y кишкової палички.

Ендонуклеаза III E.coli "дізнається" і специфічно відщеплює з ДНК окислені піримідинові основи. Цей фермент є мономерним глобулярним білком, що складається з 211 амінокислотного залишку (мол. маса 23,4 кДа). Ген, кодуючий EndoIII, секвенований, встановлена його нуклеотидна послідовність. EndoIII є залізо-сірковим білком ((4Fe-4S)²⁺-білок], що має елемент надвторинної структури типу "грецький ключ" (спіраль - шпилька - спіраль), що служить для зв'язування з ДНК. Ферменти з аналогічною субстратною специфічністю і схожою амінокислотною послідовністю виділені з клітин бика і людини.

Формагідопіримідин-ДНК-глікозилаза E.coli "дізнається" і відщепляє з ДНК окислені гетероциклічні основи пуринового ряду. Mut T - невеликий білок (мол. маса 15 кДа), володіє нуклеозидтрифосфатазною активністю, який переважно гідролізує dGTP до dGMP і пірофосфата. Біологічна роль Mut T полягає в попередженні утворення під час реплікації неканонічних пар A:G і A :8-охо-G. Такі пари можуть з'являтися у тому випадку, коли окислена форма dGTP (8-охо-dGTP) стає субстратом ДНК-полімерази. Mut T гідролізує 8-охо-dGTP в 10 разів швидше, ніж dGTP. Це робить 8-охо-dGTP найбільш прийнятним субстратом Mut Y і пояснює його функціональну роль. Mut Y є специфічною аденін-ДНК-глікозилазою, що розщепляє N-глікозидний зв'язок між аденіном і дезоксирибозою аденозину, що утворює неканонічну пару з гуаніном. Функціональна роль цього ферменту полягає в попередженні мутації T : A → G : A шляхом відщеплення неушкодженого залишку аденіну з пари основ A :8-охо-G.

Останнім часом в ексцизійній репарації особливу увагу приділяють АТР-залежному механізму видалення ушкоджень з ДНК. Цей вид ексцизійної репарації дістав назву нуклеотидна ексцизійна репарація (nucleotide excision repair; NER). Вона включає видалення з ДНК олігонуклеотидних пошкоджених фрагментів і наступну реконструкцію ланцюга ДНК за участю комплексу ферментів (нуклеаз, ДНК-полімерази, ДНК-лігази та ін.). Видалення

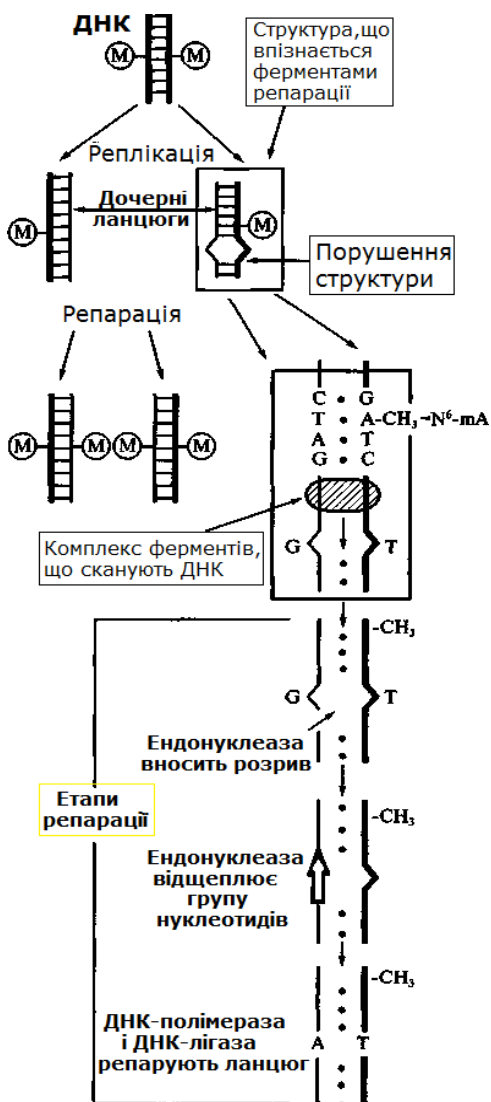


Рис. 3.26. Система репарації, пов'язана з метилуванням ДНК.

фрагмента ДНК відбувається по обидві сторони пошкодженого нуклеотиду. Довжина видалених олігонуклеотидних фрагментів відрізняється у прокариот і еукаріот. Так, у *E.coli*, *B.subtilus*, *Micrococcus luteus* вирізається фрагмент завдовжки 12-13 нуклеотидів, а у дріжджів, земноводних і людини - фрагмент з 24-32 нуклеотидів. Відщеплення фрагмента ДНК здійснюється ферментом ексинуклеазою (excinuclease). У *E.coli* цей фермент складається з 3 різних протомерів - *uvr A*, *uvr B* і *uvr C*, кожен з яких виконує певну функцію в ході ексцизійного відщеплення фрагмента ДНК. Назва цих білків дана по першим буквам слів "ultra violet repair". Протомер *uvr A* має АТРазну активність, зв'язується з ДНК у вигляді димера, здійснюючи первинне розпізнавання ушкодження і зв'язування *uvr B*. Протомер *uvr B* має латентну АТР-азну і латентну хеліказну активність, необхідну для зміни конформації і розплітання подвійної спіралі ДНК; а також ендонуклеазну активність - розщеплює міжнуклеотидний (фосфодиефірний) зв'язок з 3'-кінця фрагмента, що видаляється. Протомер *uvr C* діє як нуклеаза, що вносить розриви в репаруємий ланцюг ДНК з 5'-кінця фрагмента. Таким чином, протомери *uvr A*, *uvr B*, *uvr C* взаємодіють з ДНК в певній послідовності, здійснюючи АТР-залежну реакцію відщеплення олігонуклеотидного фрагмента з репаруємого ланцюга ДНК. Пролом, що утворився в молекулі ДНК реставрується за участю ДНК-полімерази і ДНК-лігази.

Ексцизійна репарація у людини також має АТР-залежний характер і включає три основні етапи: розпізнавання ушкодження, подвійне розрізання ланцюга ДНК, відновний синтез і лігування відновленого ланцюга. Проте в ексцизійній репарації ДНК людини беруть участь 25 різних поліпептидів, 16 з яких, що відщеплюють олігонуклеотидний фрагмент, є протомерами ексинуклеази, а інші здійснюють синтез у пошкодженій ділянці. В репараційній системі ДНК у людини дуже істотну роль виконують білки транскрипції - РНК-полімераза II і TF IIH - один з шести основних чинників транскрипції еукаріот. Слід зазначити, що ексцизійна репарація у прокариот і у еукаріот залежить від функціонального стану ДНК: ДНК, що транскрибується, репарується швидше, ніж та, що не транскрибується. Цей феномен пояснюється наступними чинниками: структурою хроматину, гомологією ланцюгів ділянок ДНК, що транскрибуються, ефектом ушкодження ланцюгів і його впливом на РНК-полімеразу. Відомо, що утворення тимінових димерів, блокують транскрипцію, якщо вона відбувається на матричному ланцюзі ДНК (ушкодження кодуючого ланцюга не впливають на комплекс транскрипції). РНК-полімераза зупиняється в місці ушкодження ДНК і блокує роботу

комплексу транскрипції. У *E.coli* посилення репарації при транскрипції опосередковується одним спеціальним білком – репараційно-транскрипційним чинником зчеплення (TRCF). Цей білок сприяє від'єднанню РНК-полімерази від ДНК і одночасно стимулює утворення комплексу білків, що здійснюють репарацію пошкодженої ділянки. Після закінчення репарації РНК-полімераза продовжує транскрипцію.

Репарація помилок реплікації ДНК. Помилки спаровування азотистих основ під час реплікації ДНК відбуваються досить часто (у бактерій один раз на 10000 н.), в результаті яких в дочірній ланцюг ДНК включається некомплементарні материнському ланцюгу нуклеотиди - місметчі (англ. mismatch). Незважаючи на те що ДНК-полімераза I прокаріот має здатність до самокорекції, її зусилля по усуненню помилок іноді виявляються недостатні, і тоді в ДНК залишаються деякі некомплементарні пари. В цьому випадку репарація відбувається з використанням системи, пов'язаної з метилуванням ДНК. Дія цієї системи репарації заснована на тому, що після реплікації через декілька хвилин ДНК піддається метилуванню. У *E.coli* метилується в основному аденін з утворенням N⁶-метил-аденіна (N⁶-mA). До цього знову синтезований ланцюг залишається неметильованим. Якщо в такому ланцюзі є неспарені нуклеотиди, то вона піддається репарації: метилування мітить ДНК і включає систему виправлення помилок реплікації. У цій системі репарації впізнаються особливі структури: послідовність G-N⁶-mA-T-C і деформація в подвійній спіралі в ділянці де відсутня комплементарність (рис. 3.26). В усуненні неспарених нуклеотидів в напівметильованій молекулі ДНК бере участь досить складний комплекс ферментів репарації, який сканує ДНК, вирізує ділянку дочірнього ланцюга, прилеглого до місметча, а потім створює умови для забудовування його комплементарними нуклеотидами. Різні компоненти цього комплексу володіють різними активностями (нуклеазною, хеліказною, АТРазною), необхідними для внесення розривів в ДНК і відщеплення нуклеотидів, розплітання подвійної спіралі ДНК і енергетичного забезпечення руху комплексу вздовж ділянки молекули, що репарується. Схожий по структурі і функціям комплекс ферментів репарації виявлений і у людини.

Рекомбінантна (постреплікативна) репарація. У тих випадках, коли системи репарації виявляються порушеними, в ланцюгах ДНК можуть утворюватися проломи (недорепаровані ділянки) іноді дуже істотних розмірів, що значно порушують системи реплікації і можуть привести до загибелі клітин. В цьому випадку клітина в змозі використовувати для репарації однієї молекули ДНК іншу молекулу ДНК, тобто використати механізм рекомбінації.

У бактерій в рекомбінативній репарації бере участь білок Rec A. Він зв'язується з одноланцюговою ділянкою ДНК і залучає її до рекомбінації з гомологічними ділянками неушкоджених ланцюгів іншої молекули ДНК. В результаті і розірваний, і непошкоджений ланцюги ДНК виявляються спареними з неушкодженими ділянками комплементарної ДНК, що відкриває можливість репарації різними системами. При цьому відбувається вирізання певного фрагмента і заповнення з його допомогою пролому в дефектному ланцюзі. Пропуски, що виникають при цьому, і розриви в ланцюгах ДНК заповнюються за участю ДНК-полімерази I і ДНК-лігази.

SOS-репарація. На існування цієї системи уперше вказував М.Радман (1974 р.). Він же дав назву цьому механізму, включивши в нього міжнародний сигнал лиха "SOS" (врятуйте наші душі). І дійсно, ця система включається тоді, коли ушкоджень в ДНК стає настільки багато, що це загрожує життю клітини. В цьому випадку відбувається активація групи генів, задіяних в різних клітинних процесах, зв'язаних з репарацією ДНК (табл.3.4).

Включення тих або інших генів, визначається кількістю пошкоджень в ДНК, це приводить до різних за значимістю клітинних відповідей: починаючи із стандартної репарації пошкоджених нуклеотидів і закінчуючи припиненням мітозу. Найбільш вивчена SOS-репарація у *E.coli*, головними є білки, що кодуються генами *rec A* і *lex A*. Перший з них є поліфункціональний білок Rec A, що бере участь в рекомбінації ДНК і також в регуляції

транскрипції генів фага X, вражаючого E. coli, а білок Lex A є репресором транскрипції великої групи генів, призначених для репарації ДНК бактерій. Зв'язування Rec A з Lex A призводить до розщеплення останнього і відповідно до активації генів репарації. У свою чергу, індукція SOS-системи бактерії служить для фага X сигналом небезпеки і призводить до того, що профаг з пасивного перетворюється на літичний шлях існування, викликаючи тим самим загибель клітини-хазяїна. SOS-система репарації виявлена у бактерій, у тварин, і людини.

Таблиця 3.4. Гени, задіяні в SOS-репарації ДНК

| Гени | Наслідки активації гена |
|----------------|---|
| uvr A, B, C, D | Репарація ушкоджень вторинної структури ДНК |
| гес A | Постреплікативна репарація, індукція SOS -системи |
| гес N, ruv | Репарація двониткових розривів |
| ssb | Забезпечення рекомбінаційної репарації |
| umu C, D | Мутагенез, викликаний змінами властивостей ДНК-полімерази |
| sul A | Пригнічення клітинного ділення |
| lex A | Виключення SOS -системи |

Виправлення ушкоджень в ДНК тісно пов'язане з іншими фундаментальними молекулярно-генетичними процесами: реплікацією, транскрипцією і рекомбінацією. Усі ці процеси виявляються переплетеними в загальну систему взаємодій, що обслуговується великим числом різноманітних білків, багато з них є поліфункціональними молекулами, задіяними в контролі реалізації генетичної інформації в клітинах про- і еукаріот. В той же час очевидно, що природа "не скупилася" на елементах контролю, створюючи складні системи корекції тих ушкоджень в ДНК, які несуть небезпеку для організму і для його потомства. З іншого боку, коли репараційних можливостей недостатньо для збереження спадкового матеріалу, настає необхідність в програмованій клітинній смерті – апоптозі.

Молекулярні механізми загальної генетичної рекомбінації.

Під *генетичною рекомбінацією* розуміють процеси, що приводять до перекомбінації нуклеотидних послідовностей в геномах. Ці процеси лежать в основі генетичної мінливості, яка забезпечує різноманітність та пристосування до умов середовища.

На можливість генетичної рекомбінації як обміну ділянками гомологічних хромосом уперше вказав в 1903 р. Т.Бовері. Докази обміну генами між хромосомами були уперше отримані Т.Х.Морганом в 1919 р. Генетичну рекомбінацію підрозділяють на два великі класи: *загальну* рекомбінацію і *сайт-специфічну* («незаконну») рекомбінацію.

Загальна рекомбінація. В ході загальної рекомбінації обмін генетичним матеріалом відбувається між гомологічними нуклеотидними послідовностями ДНК, частіше всього між двома копіями однієї і тієї ж хромосоми. Найвідоміший приклад такого роду рекомбінації — це обмін ділянками гомологічних хромосом в процесі *мейозу*. У профазі I мейозу відбувається кросинговер (перехрест) і обмін гомологічними ділянками між несестринськими хроматидами гомологічних хромосом. Кросинговер здатний таким чином «перетасувати» гени хромосом. У прокаріот також спостерігається загальна рекомбінація, пов'язана з діленням. В процесі рекомбінації у E.coli беруть участь декілька білків, що забезпечують пошук і рекомбінацію гомологічних послідовностей ДНК. Так, білок RecBCD приєднується до ДНК і рухається уздовж молекули, здійснюючи її розплітання в пошуку сайту рекомбінації (рис. 3.27). Цей білок діє як хеліказа, розплітаючи подвійну спіраль ДНК, і переміщується уздовж із швидкістю 300 нуклеотидів в секунду доки не виявить консенсусну восьминуклеотидну послідовність в сайті рекомбінації. Потім білок RecBCD, діючи як нуклеаза, здійснює розрив в одному з ланцюгів ДНК, внаслідок чого вивільнюється невелика одноланцюгова ділянка ДНК, яка може взаємодіяти з ділянкою комплементу іншої молекули ДНК. Для забезпечення комплементарної взаємодії вільна ділянка одного з ланцюгів ДНК,

що називається «вус», підтримується у лінійному стані за допомогою SSB - білка.

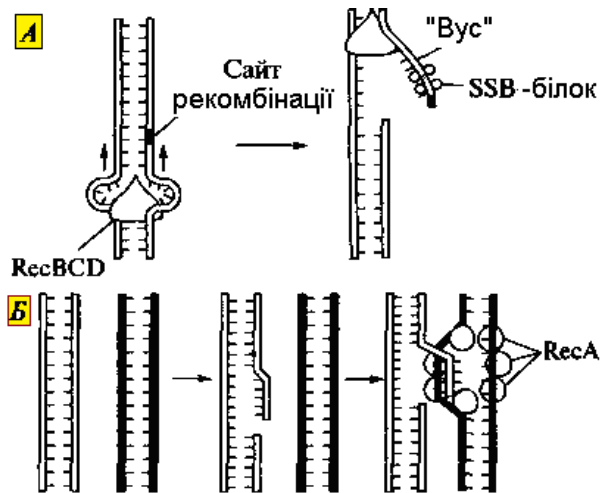


Рис.3.27. Початкові етапи загальної рекомбінації між двома гомологічними подвійними спіралями ДНК: А - білок RecBCD рухається уздовж молекули ДНК і розплітає її, а потім розриває один з ланцюгів ДНК; Б — після розриву одного з ланцюгів ДНК утворюється «вус», який утворює коротку спарену ділянку з другою спіраллю.

Цей білок бере участь в реплікації бактеріальної ДНК, а також в їх рекомбінації, взаємодіючи з сахарофосфатним остовом усіх одноланцюгових ділянок ДНК і створюючи умови для комплементарної взаємодії азотистих основ. В ході рекомбінації SSB-білок діє в комплексі з білком RecA, який утримує

разом поодинокий ланцюг і подвійну спіраль ДНК (див. Рис.3.27). Невеликий за розміром білок RecA (мол. маса 38 кДа) має дві різні ділянки для зв'язування ДНК, що взаємодіють в ході рекомбінації ланцюгів. Білки RecBCD і RecA також мають ДНК-залежну АТФазну активність, і в процесі приєднання цих білків до ДНК спостерігається інтенсивний гідроліз АТФ до АДФ. Так само як SSB- білок, білок RecA приєднується до взаємодіючих ланцюгів ДНК у вигляді груп молекул (кластерів), і спільна дія цих двох білків створює умову для ефективної рекомбінації. У точці рекомбінації виникає з'єднання гетеродуплекса молекул ДНК (Рис.3.27), яке може включати взаємодію декількох тисяч пар основ. Потім відбувається розрив в іншому ланцюзі ДНК, що створює передумови для рекомбінації з перехрещенням ланцюгів.

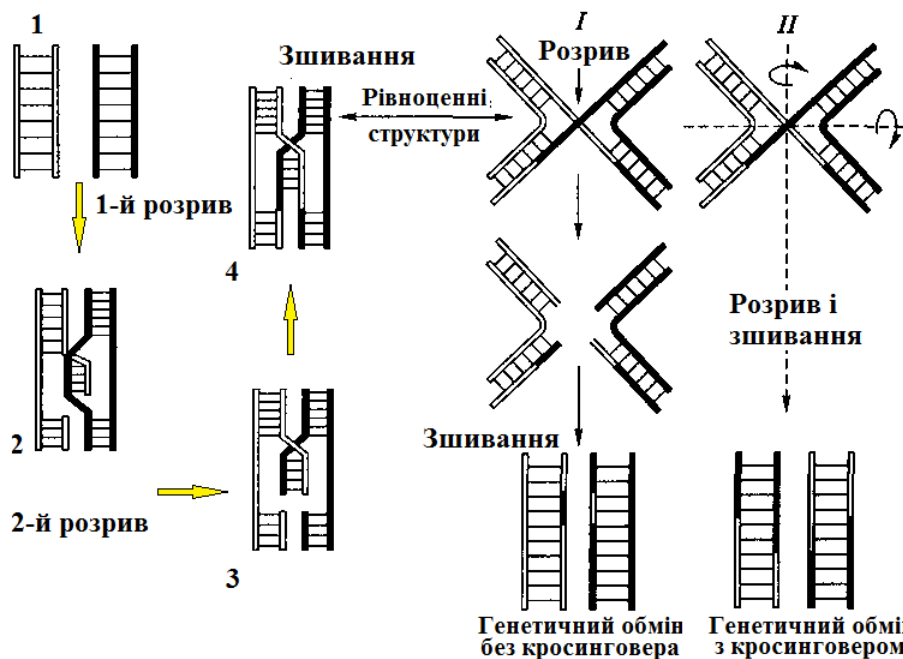


Рис.3.28. Загальна схема генетичної рекомбінації з перехрещенням ланцюгів: I — обмін без кросинговеру; II — обмін з кросинговером, при якому відбувається обертання елементів хрестоподібної структури відносно двох осей, що призводить до масштабніших перебудов між гомологічними молекулами ДНК.

При цьому виникає характерна хрестоподібна структура, запропонована Р.Холідеєм в 1964 р., розрив і зшивання якої завершує загальну рекомбінацію у відсутність кросинговеру.

Точність розриву і возз'єднання виявляються дуже високими, що жоден нуклеотид не втрачається і не додається, і в той же час молекули ДНК обмінюються значними за розмірами ділянками, а клітини, що утримують їх, оновлюють свій генетичний потенціал.

При кросинговері в хрестоподібній структурі можуть відбуватися обертання складових її елементів один відносно одного (рис. 3.28). Ці обертання, що супроводжуються ізомеризацією ланцюгів, створюють умови для більш великомасштабного обміну ділянками між молекулами ДНК. Таким чином, у еукаріот в результаті генетичної рекомбінації з кросинговером здійснюється переміщення з хромосоми в хромосому великих гомологічних

послідовностей, проте загальна послідовність розташування генів в хромосомі не порушується. Абсолютно інші наслідки може викликати сайт-специфічна рекомбінація.

Сайт-специфічна рекомбінація не вимагає гомології ДНК. В цьому випадку в обмін вступають короткі специфічні нуклеотидні послідовності ДНК і в результаті змінюється розподіл нуклеотидних послідовностей в геномі. Існує особливий фермент рекомбінації, який «визнає» специфічні послідовності в одній або двох рекомбінуючих молекулах ДНК, який порушує спаровування комплементарних ділянок.

Перша досліджена система такої рекомбінації — це включення бактеріофага λ в ДНК *E.coli*. Фермент лямбда-інтеграза зв'язує між собою ДНК бактеріофага і певну ділянку ДНК бактерії, розриває ланцюги обох молекул, а після зшиває фагову і бактеріальну ДНК (Рис.3.29). Таким чином ДНК фага виявляється інтегрованою в геном клітини-хазяїна.



Рис. 3.29. Сайт-специфічна рекомбінація – впровадження кільцевої молекули ДНК фага λ в хромосому бактерії (П-специфічні послідовності, які визначають місце прикріплення фагової ДНК).

Інтеграза кодується геномом бактеріофага і може здійснювати зворотний вихід його ДНК з ДНК бактерії. Лямбда-інтеграза є «зворотною нуклеазою»: здатна як нуклеаза розривати фосфодієфірні зв'язки в ДНК, а потім знову зшивати їх, як лігаза. Таким чином, лямбда-інтеграза діє аналогічно ДНК-топоізомеразі (гірази) бактерій.

Сайт-специфічна рекомбінація лежить в основі переміщення генів в межах однієї молекули ДНК і пояснює феномен «стрибаючих» генів (рухливих генетичних елементів). Рухливі елементи (IS- елементи і транспозони) прокариот і мобільні гени (ретротранспозони) еукаріот також є потужним елементом рекомбінації. Вони не лише створюють умови для збереження видів, але і є (принаймні, для еукаріот) потужними чинниками еволюції. Масові перебудови в геномі можуть, ймовірно, призводити до «еволюційних вибухів» — стрибкоподібного виникнення нових видів або загибелі раніше існуючих організмів.

У зв'язку з тим що рекомбінація може зачіпати як кодуючі, так і регуляторні послідовності геномів, вона може виступати як один із способів регуляції експресії генів. Такі перебудови спостерігаються, зокрема, в послідовностях, що повторюються в геномах багатьох організмів, які можуть знаходитися по відношенню один до одного в прямій, або в зворотній орієнтації, і мають назву *обернених повторів*. Такого роду сайт-специфічні інверсії ділянок хромосом спостерігаються у бактерій (*E.coli*, *Salmonella typhimurium* та ін.) і бактеріофагів (P1, P7). Вони є повторами певних сегментів хромосом, які утворилися внаслідок оберту на 180° за участю особливих ферментів — інвертаз, що змінюють орієнтацію генів відносно їх промоторів і тим самим альтернативно впливають на їх транскрипцію. Можливо, що такі перебудови, незважаючи на їх випадковий характер, мають пристосувальне значення для бактерій.

Перебудови в геномах можуть носити на певних стадіях диференціювання клітин запрограмований характер, наприклад, при диференціюванні гетероцист у ціанобактерій. В цьому випадку спостерігається видалення вставної ДНК, яка вбудована в кодуючі послідовності певних генів. Ці елементи ДНК мають на кінцях короткі прямі повтори, які віддаляються на певній стадії розвитку клітин специфічними ферментами — рекомбіназами, здатними далі об'єднувати розділені частини генів шляхом рекомбінації між їх повторами.

До запрограмованих перебудов відноситься і формування генів імуноглобулінів в

клітинах-попередниках В-лімфоцитів хребетних тварин. Складання цих генів здійснюється шляхом рекомбінації і поєднання роз'єднаних фрагментів, а після об'єднання із спеціальним промотором відбуваються транскрипція і біосинтез різноманітних молекул імуноглобулінів у В-лімфоцитах. Схожі процеси мають місце і при диференціюванні Т-лімфоцитів. В усіх інших соматичних клітинах тварин фрагменти генів імуноглобулінів залишаються роз'єднаними і біосинтез імуноглобулінів не відбувається.

Можлива генетична рекомбінація РНК-геномів вірусів. Механізми рекомбінації РНК ще не досить вивчені. У вірусів грипу, наприклад, рекомбінація здійснюється обміном цілими молекулами РНК, що забезпечує високу мінливість вірусів і відповідно ускладнює боротьбу з ними. РНК-вмісні бактеріофаги (фаг Q β і споріднені йому) також здатні до рекомбінації, що призводить до утворення нових РНК, причому в таку рекомбінацію можуть вступати як природні, так і штучні молекули РНК. Це використовується при синтезі *антисенсових РНК і рибозимів* з метою одержання специфічних препаратів для боротьби з вірусними інфекціями. Перспективні дослідження в області отримання рекомбінантних РНК для розробки систем позаклітинного синтезу білків.

Генна конверсія. Механізми генної конверсії. Генна конверсія — це процес нереципроного перенесення інформації з однієї хроматиди в іншу. Модельним об'єктом для вивчення генної конверсії служать деякі види нижчих грибів, наприклад, *Ascomycetes*, продукти мейозу яких залишаються в одній великій клітині-сумці, що називається аском. Гетерозиготні штами (Aa) дають розподіл аллелей в 8 спорах аска 4A:4a, рекомбінація може лише поміняти місцями спори з різними аллелями. У 1928 р. Г.Книп виявив у нейроспори відхилення від очікуваного розщеплювання. Гетерозиготи Aa іноді давали спори в співвідношенні 3A : 1a або 1A: 3a і рідше — тільки A або тільки a. Така ж рекомбінація була відмічена К.Ліндгреном (1949-1953 рр.) в дослідках на дріжджах. Г.Вінклер (1930), запропонував назвати цей феномен конверсією, вважав, що в основі його — наявність у гетерозигот мутацій спрямованого характеру, при яких перехід одного аллеля в іншій ініціюється гетерозиготним станом локуса. Пізніше було встановлено, що утворення аберантних асків не пов'язане з виникненням мутацій. А в 1955 р. М.Мітчел виявила зв'язок конверсії з кросинговером і показала, що внутрішньогенна рекомбінація може бути нереципрокнуою.

Виявлення аберантних асків із співвідношенням спор 3:5 або 2:6 вказує на те, що мейотичному діленню передувало виникнення ділянок гетеродуплексів кросинговера між гомологічними материнською і батьківською хромосомами. Як з'ясувалося при подальшому вивченні, протяжність цих ділянок може досягати 1 т.п.н. Коли з'єднані ділянки гомологічних хромосом дещо розрізняються, може відбутися порушення спаровування нуклеотидів, які не залишаються «непоміченими». Вони будуть виправлені системою репарації ДНК - зміна одного з фрагментів ДНК по матриці іншого. Під впливом такої корекції алель В «перетворюється» на алель в. Таким чином, зміна співвідношення кількості спор з різними алеллями в одному аску означає, що один з алелей перейшов в альтернативний стан.

Спочатку конверсія гена розглядалася тільки стосовно порушення класичного менделівського розщеплення у *Ascomycetes*, нині цей термін має набагато ширше значення: його поширили на усі процеси, що включають перетворення одного аллеля на інший шляхом корекції рекомбінаційного гетеродуплекса. Встановлено, що конверсія (нереципрочна гомологічна рекомбінація за рахунок корекції неспарених основ в гетеродуплексі) відбувається не лише у прокариот, але і в статевих і в соматичних клітинах еукаріот. У корекції рекомбінаційного гетеродуплекса у *E.coli* використовується механізм репарації за участю генів системи MutHSL U. Для частини бактеріальних білків цієї системи виявлені гомологи у еукаріот (MHSLH — MutHSL homologs, або PMS — post meiotic segregation). У еукаріот гомологи представлені цілими сімействами, але не усі вони зайняті в конверсії. Так з

шести гомологів MutS у дріжджів в конверсії беруть участь чотири: MSH1, MSH2, MSH3 і MSH6.

У людини виявлено 11 гомологів MutL, з них участь в конверсії встановлена для одного (PMS2). Показано, що конверсія у прокариот охоплює невеликі фрагменти ДНК (не більше трьох нуклеотидів). У разі постмейотичної сегрегації у еукаріот змінюється більша частина гену: від 8 до 12 нуклеотидів. Конверсія рідко відбувається при мітотичній рекомбінації.

До загальних закономірностей процесу конверсії слід віднести:

- 1) спільну конвертацію усіх гетерозиготних маркерів, що потрапили в гетеродуплекс;
- 2) випадковий вибір основи, що видаляється, з двох неспарених;
- 3) полярність - зниження частот конверсії різних алелів одного гена, починаючи з певної точки (частіше всього від одного кінця гена до іншого). Полярність вказує на наявність в хромосомах фіксованих точок початку рекомбінації.

Варіабельність імуноглобулінів. На основі даних про двоїстість у будові імуноглобулінів — наявності варіабельної і константної областей в структурі молекули — Дрейер і Беннет ще в 1965 р. висловили припущення про участь двох генів (V і C) в побудові одного важким або легким ланцюгом молекули. Для ссавців відомі три групи зчеплення імуноглобулінових генів, розташованих на різних хромосомах: групи зчеплення для D- і A-типів легких ланцюгів і група зчеплення для важких (IgH) ланцюгів.

У незрілих В-клітинах або в інших клітинах організму V-гени і C-гени віддалені в хромосомі один від одного на значну відстань до 1 млн. пар нуклеотидів. Подібна локалізація генів для імуноглобулінів визначається як зародкова лінія (від англ. — germline). Проте по мірі дозрівання В-клітин від некодированих попередників до зрілих форм відбувається реорганізація генома і просторово видалені генні сегменти опиняються у безпосередній близькості один від одного, утворюючи єдину інформаційну ділянку. Цей процес перебудови генетичного матеріалу отримав назву соматичної рекомбінації. Він пов'язаний тільки з соматичними клітинами (у випадку з імуноглобуліновими генами — тільки з В-клітинами), не успадковується і не відбувається в статевих клітинах.

Варіабельність імуноглобулінів (V-доменів важких (IgH) і легких (IgL) ланцюгів цих молекул) залежить від декількох внутрішньоклітинних процесів:

1) наявність в геномі безлічі V-генів як для IgH, так і для IgL, кожен з яких кодує самостійний і специфічний V- домен;

2) процесу соматичної рекомбінації: оскільки V— локус включає не лише власне V-гени, але і декілька додаткових генних сегментів — D і J, то утворення зрілого V-гена (VDJ для IgH або VJ для IgL) є результатом випадкового поєднання в процесі рекомбінації одного з V-генів з одним з D- або J-генних сегментів;

3) у деяких видів (птахів) спостерігається генна конверсія — включення до складу активного V-гена нуклеотидів із псевдогенів, що змінює специфічність основного гена;

4) помилок рекомбінації: в процесі рекомбінації одного з V-генів з одним з D- і J-генних сегментів, коли йде процес «вирізання» некодированої частини ДНК, розташованої між генними сегментами, можливе «захоплення» пограничних для V-, D-, J-генних сегментів нуклеотидів; помилки рекомбінації також роблять свій внесок в різноманітність зрілих V-генів;

5) взаємодії IgH з IgL при внутрішньоклітинному утворенні імуноглобуліну: оскільки сформована імуноглобулінова молекула складається з H- і L-поліпептидів, V- домени яких спільно утворюють ділянку, що розпізнає антиген, а в клонах В-клітин специфічність таких V-доменів випадкова, то випадковою буде і специфічність молекули імуноглобуліну;

6) соматичний мутагенез — точкові заміни в послідовності нуклеотидів V-генів при дозріванні В-клітин.

Рекомбінація генів, що кодують легкі і важкі ланцюги імуноглобулінів. Ділянка ДНК в некодірованій клітині, відповідальна за синтез легкого ланцюга к-типу, включає три групи генів: 1) 250 V_K-генів, кожен з яких кодує 94-95 амінокислотних залишків V_C-домена;

2) 5 J-міні-генів (англ. — joining), один з яких неактивний і називається псевдогеном; кожен з працюючих J-генів кодує послідовність з 12-14 амінокислотних залишків і забезпечує кількісну добудову V-гена, який буде синтезувати повноцінний V_K-домен;

3) C_K-ген кодує константний регіон легкого к-ланцюга.

Процес рекомбінації розпочинається з об'єднання одного з V_K-генів з одним з J-міні-генів. Об'єднання цих сегментів ДНК відбувається за рахунок делеції послідовності нуклеотидів, що входять в інтронну послідовність між V і J. Місце рекомбінації V - J не жорстко фіксоване. В процесі рекомбінації об'єднання може відбуватися як між основами V і J, так і між основами, що знаходяться поряд з цими сегментами. Подібні помилки вносять додаткову мінливість в 3-ю гіперваріабельну ділянку V- домена.

В процесі рекомбінації беруть участь ферменти. Найбільш вивчені з них є RAG-1 і RAG-2, контрольовані відповідними генами (recombination activating genes). За допомогою цих білків здійснюється делеція в некодуючих ділянках ДНК між V — J. Попередня первинна рекомбінація формує к-локус, який складається з трьох екзонів: L-сегменту, що кодує лідерний пептид (ділянка незрілого к-ланцюга, яка включає 20-25 амінокислотних залишків); рекомбінантного VJ-гена і C-гена константної області.

Подібна рекомбінантна ДНК в комітованих клітинах забезпечує утворення первинного транскрипту — про-мРНК. В результаті процесінгу некодовані ділянки між J і C, а також між L і V вирізаються — зріла мРНК має кодуючі послідовності. При цьому усі послідовності зливаються в єдину інформаційну ділянку. Зріла мРНК транлює поліпептид з додатковою лідерною ділянкою (ЛД). ЛД включає в основному гідрофобні амінокислоти, що сприяє проходженню к-ланцюга через мембрану ЕПС. Після проходження ЛД відщеплюється, і зрілий к-ланцюг набуває характерний для імуноглобуліну амінокислотний склад.

Інакше організовані гени легких ланцюгів А-типу (IgL). Власне V-гени на хромосомі утворюють локальне сімейство, а кожен J-сегмент об'єднаний в пару з відповідним C-геном (J1-C1, J2 - C2, J3 - C3 і так далі). На сьогодні відомо сім таких J-C- локусів. Процес рекомбінації не відрізняється від описаного для к-типу легких ланцюгів. На відміну від генетичного контролю V-доменів легких ланцюгів V-домени важких ланцюгів кодуються трьома генними сегментами: V, D і J. Крім того, на відміну від генів легких к-ланцюгів, що включають тільки один C-ген константної області, у людини таких генів десять, у мишей вісім. Вони відповідальні за кодування класів та підкласів імуноглобулінів.

При утворенні ділянки генома, що кодує V-домен важких ланцюгів, відбувається дві рекомбінаційні події. Перше — це об'єднання D- і J-сегментів (міні-генів) і друге — об'єднання DJ-ділянки з V-геном. На початковому етапі диференцювання В-клітин відбувається злиття VDJ-гена з геном, контролюючим константну область IgM(C_μ). По мірі функціонального дозрівання В-клітин спостерігається перемикання синтезу IgM на імуноглобуліни інших класів і підкласів при збереженні початкової специфічності V-домена, тобто відбувається рекомбінація того ж VDJ-гена з C_n-генами інших класів і підкласів. В цілому в процесі розвитку окремих В-клітинних клонів можливі дві форми реорганізації генома: різні VDJ-гени об'єднуються з C_n-геном, що забезпечує формування різних клонів (ранній етап розвитку В-клітин), і один і той же VDJ-ген утворює єдину інформаційну ділянку з різними C-генами (внутрішньоклітинне перемикання синтезу з одного класу на інший). Випадкова рекомбінація генних сегментів — основа варіабельності імуноглобулінів.

Вивчення хромосомної організації імуноглобулінових генів і етапів їх реорганізації в процесі розвитку В-клітин дозволило досить точно визначити першопричину варіабельності антитіл. Її основу складає випадкове об'єднання окремих генних сегментів в результаті

рекомбінації: V, D, J — для важких ланцюгів і V, J — для легких ланцюгів імуноглобулінів. Якщо число Ун-генів дорівнює 500 (можливо їх більше), D-сегментів — 15 і J-сегментів — 4, то число варіантів V-доменів становить — $500 \times 15 \times 4 = 30\,000$.

Розрахунок для κ-ланцюга включає 250 VK- генів і 4 J-сегменту. Таким чином, число варіантів Vκ-доменів буде рівне $250 \times 4 = 1000$. Оскільки молекули імуноглобулінів будуються при випадковому поєднанні важких і легких ланцюгів, загальне число варіантів антигензв'язуючих центрів і, отже, специфічних імуноглобулінів складатиме 3×10^6 . Отримана величина варіабельних імуноглобулінів виведена з урахуванням тільки трьох основних показників: набору нативних (зародкових) V-генів, випадкової рекомбінації генних сегментів (V-J, V-D-J), випадкової взаємодії Vn з VL при утворенні молекули імуноглобулінів. Різноманітність імуноглобулінів збільшується також за рахунок вставок випадкових нуклеотидів — їх некомплементарного синтезу в процесі реорганізації V - J, V - D - J, помилок при об'єднанні генних сегментів (включення в нуклеотидну послідовність при рекомбінації пограничних нуклеотидів, порушення рамки зчитування у D- сегментів, генної конверсії і соматичних мутацій). Генна конверсія при формуванні активних VL, Vn-генів спостерігається у птахів, кроликів, людини. Це пов'язано з існуванням в геномі псевдогенів, які не мають лідерної послідовності, промоторів і необхідних для V- D- J- рекомбінації послідовностей: гептамер-спейсер-наномер.

Враховуючи додаткові факти, слід думати, що діапазон варіабельності імуноглобулінів в 3×10^6 відноситься до зародкової лінії, до генома, що знаходиться в стані «спокою». Як тільки починається онтогенетичний шлях розвитку В-клітин, проявляються конвергенція генів, соматичний мутагенез, рекомбінація генів з помилками. Тому варіабельність імуноглобулінів з урахуванням відмічених чинників становить $10^{11}-10^{20}$ специфічних імуноглобулінів.

По відношенню до В-клітинної популяції ці цифри повинні були б говорити про кількість клонів В-клітин, здатних взаємодіяти з множиною антигенних епітопів. Проте в організмі, наприклад у людини, загальне число В-лімфоцитів складає не більше 10^{10} . Тому в реальних умовах життя тварин і людини або не всі V-гени здатні вступити в процес рекомбінації, або не в усіх випадках проявляють себе процеси, які є онтогенетичними джерелами різноманітності імуноглобулінів.

Відомо п'ять класів імуноглобулінів: IgM, IgG, IgA, IgE і IgD. Вони побудовані по загальному плану і включають два легких і два важких поліпептидних ланцюги. Кожен ланцюг складається з одного варіабельного і трьох або чотирьох (залежно від класу) константних доменів. Специфічність антитіл залежить від взаємодії варіабельних доменів легких і важких ланцюгів. Генетичний контроль структури імуноглобулінів здійснюється великим набором V-генів і незначною кількістю додаткових D- і J- міні-генів. Випадкова комбінація одного з V- генів з одним з J- і D- генних сегментів (міні-генів) лежить в основі варіабельності антитіл. Кількість V-генів, D- і J- міні-генів для важких і легких ланцюгів таке, що в умовах випадкової рекомбінації можливо утворення до 3×10^6 специфічних антитіл. Різноманітні механізми (рекомбінації, генна конверсія, соматичний мутагенез) забезпечують широку варіабельність імуноглобулінів, що є гарантією захисту від найнесподіванішого антигенного матеріалу.

РНК та її роль у збереженні та реалізації спадкової інформації.

Хімічний склад РНК. Атипові азотисті основи РНК. Макромолекулярна організація РНК. Види РНК та їх біологічні функції.

Хімічний склад РНК. Зміст РНК у будь-яких клітинах у 5-10 разів перевищує зміст ДНК. Основна роль РНК полягає в трансляції генетичної інформації з утворенням білків, а також в здійсненні деяких спеціалізованих ендонуклеазних функцій, що регулюють різні етапи

експресії генів. Геноми деяких вірусів представлені одно- і дволанцюговими молекулами РНК.

Визначимо деякі особливості будови РНК. Нуклеотиди РНК складаються з цукру – рибози, до якої в положенні 1'- приєднана одна з основ: аденін, гуанін, цитозин або урацил. Фосфатна група об'єднує рибози в ланцюжок, утворюючи зв'язки з 3'- атомом вуглецю однієї рибози і в 5'- положенні іншого. Фосфатні групи при фізіологічному рН негативно заряджені, тому РНК - можна назвати поліаніоном.

РНК транскрибується як полімер чотирьох основ (аденіну (A), гуаніну (G), урацилу (U) і цитозину (C)), але в "зрілих" РНК є багато модифікованих основ і цукрів. Всього в РНК налічується близько 100 різних видів модифікованих нуклеозидів, в яких: найбільш часто зустрічається модифікація цукру – 2'-О-метилрибоза; псевдоуридин - найчастіше модифікована основа. У псевдоуридину (Ψ) зв'язок між урацилом і рибозою не С-N, а С-С, цей нуклеотид зустрічається в різних положеннях в молекулах РНК. Зокрема, псевдоуридин важливий для функціонування тРНК. Ще однією модифікованою основою, про яку варто сказати є - гіпоксантин, дезамінований гуанін, нуклеозид який називають інозин. Інозин відіграє важливу роль в забезпеченні виродженості генетичного коду – він сприяє визначенню кодонів синонімів, які відрізняються основами в третьому положенні.

Роль багатьох інших модифікацій не до кінця вивчена, але в рибосомальній РНК багато посттранскрипційних модифікацій знаходяться у важливих для функціонування рибосоми ділянках. Н., на одному з рибонуклеотидів, що бере участь в утворенні пептидного зв'язку. Азотисті основи у складі РНК можуть утворювати водневі зв'язки між цитозином і гуаніном, аденіном і урацилом, а також між гуаніном і урацилом. Проте можливі і інші взаємодії, н., декілька аденінів можуть утворювати петлю, що складається з чотирьох нуклеотидів, в якій є пара основ аденін - гуанін.

Макромолекулярна організація РНК. Важлива структурна особливість РНК, що відрізняє її від ДНК – наявність гідроксильної групи в 2'-положенні рибози, яка дозволяє молекулі РНК існувати в А-конформації. У А-формі глибока і вузька велика борозна і неглибока і широка мала борозна. Другий наслідок наявності 2'-гідроксильної групи полягає в тому, що конформаційно пластичні, тобто, ті які не беруть участі в утворенні подвійної спіралі, ділянки молекули РНК можуть хімічно атакувати інші фосфатні зв'язки і їх розщеплювати. «Робоча» форма одноланцюгової молекули РНК, як і у білків, часто має третинну структуру. Третинна структура утворюється на основі елементів вторинної структури, за допомогою формування водневих зв'язків усередині однієї молекули. Розрізняють декілька типів елементів вторинної структури – стебло-петлі, петлі і псевдовузли. Через велику кількість можливих варіантів спаровування основ, визначення імовірної вторинної структури РНК - набагато складніше завдання, ніж структури білків, але нині є ефективні програми, н., mfold. Прикладом залежності функцій молекул РНК від їх вторинної структури є ділянки внутрішньої посадки рибосоми (IRES). IRES - структура на 5'-кінці інформаційної РНК, яка забезпечує приєднання рибосоми в обхід звичайного механізму ініціації синтезу білку, вимагає наявності особливої модифікованої основи (Keпа) на 5'-кінці і білкових чинників ініціації. Спочатку IRES були виявлені у вірусних РНК, але зараз накопичується все більше даних про те, що клітинні мРНК також використовують IRES-залежний механізм ініціації в умовах стресу. Багато типів РНК, н., рРНК і мРНК в клітині функціонують у вигляді комплексів з білками, які асоціюють з молекулами РНК після їх синтезу, або (у еукаріот) експорту з ядра в цитоплазму. Такі РНК-білкові комплекси називаються рибонуклеопротеїновими комплексами або рибонуклопротеїдами.

Види РНК. В усіх клітинах присутні наступні види РНК: рибосомна (рРНК), транспортна(тРНК) та інформаційна (іРНК) або матрична (мРНК). В клітинах багато малих

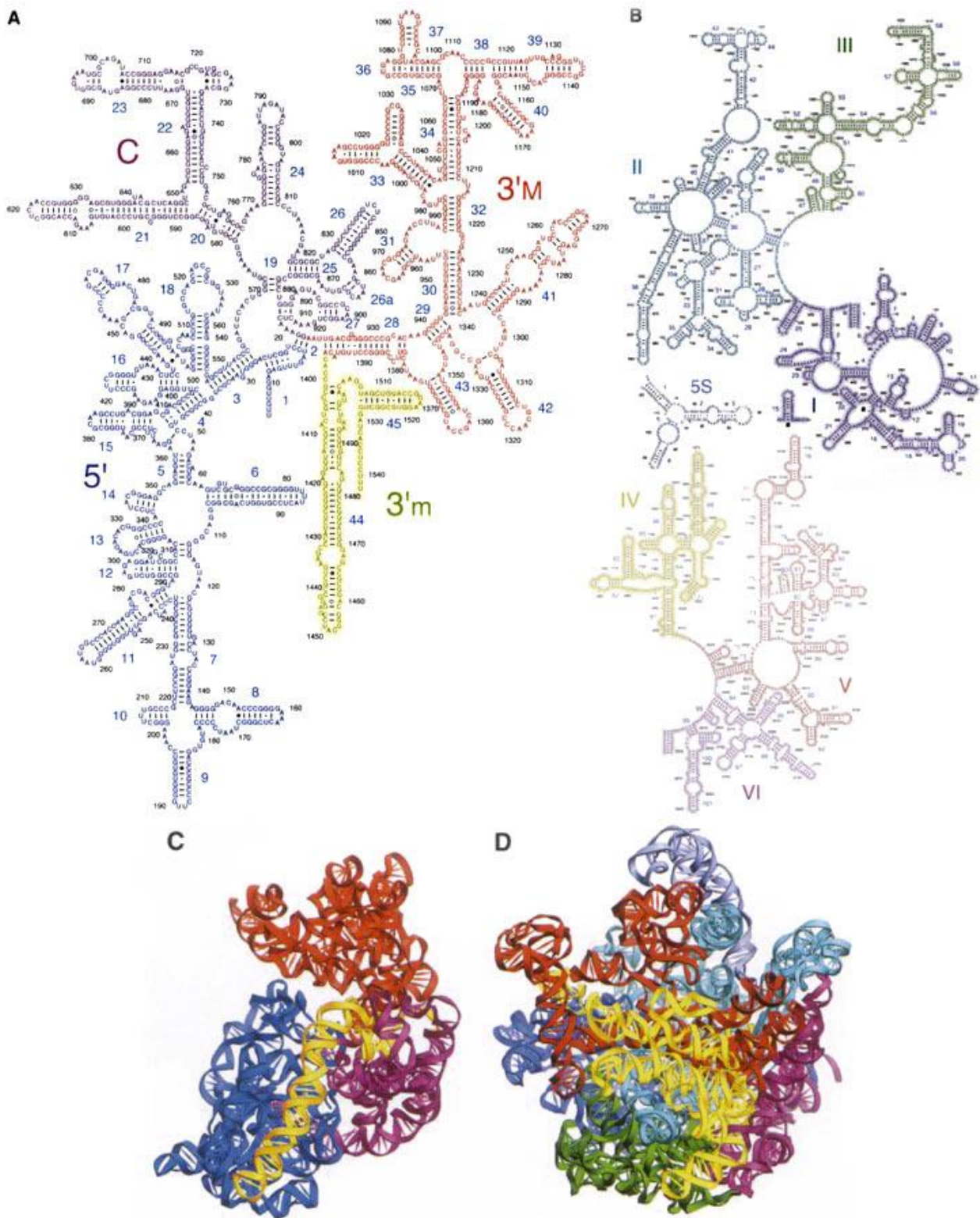


Рис.3.30.

А – Вторинна структура і доменна організація рибосомальної 16S РНК *T. thermophilus*. 5'-центральный домен, 3'-major – 3'M і 3'-minor – 3'm домени. Спіральні ділянки пронумеровані від 1 до 45.

В – Вторинна структура и доменна організація 16S и 5S РНК *T. Thermophilus*. I-VI – шість доменів 16S и 5S РНК. спіральні ділянки пронумеровані від 1 до 101.

С – Просторова структура рРНК малої субодиниці. Доменні утворюють окремі блоки, які складаються компактно.

Д – Просторова структура рРНК великої субодиниці. В процесі укладання (фолдингу) доменні щільно переплітаються один з іншим.

Yusupov et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. 2000. *Science* 292: 883-896.

цитоплазматичних РНК (мцРНК), а в клітинах еукаріот присутні малі ядерні РНК (мяРНК) (табл. 3.5).

Близько 80-85 % маси клітинних РНК складають три (у прокариот) або чотири (у еукаріот) види рРНК, близько 10 % — майже 100 видів тРНК. На долю декількох тисяч різних матричних РНК доводиться менш 5 % клітинної РНК, а на долю мяРНК і мцРНК — менше 2 % від загальної кількості РНК.

Таблиця 3.5. Основні види РНК.

| РНК (вид) | Різних видів в клітинах | Довжина (н.) | Поширеність |
|---------------------------------|-------------------------|--------------|-------------|
| Транспортна РНК (тРНК) | 80-100 | 75-90 | п, е |
| Рибосомна 5S РНК (рРНК) | 1-2 | 120 | п, е |
| Рибосомна 5.8S РНК (рРНК) | 1 | 158 | е |
| Рибосомна 16S РНК (рРНК) | 1 | 1600 | п |
| Рибосомна 23 S РНК (рРНК) | 1 | 3200 | п |
| Рибосомна 18S РНК (рРНК) | 1 | 1900 | е |
| Рибосомна 28S РНК (рРНК) | 1 | 5000 | е |
| Матрична РНК(мРНК) | Тисячі | Варіює | п, е |
| Гетерогенна ядерна РНК(гяРНК) | Тисячі | Варіює | е |
| Мала цитоплазматична РНК(мцРНК) | Десятки | 90-330 | п, е |
| Мала ядерна РНК(мяРНК) | Десятки | 58-220 | е |

* П — клітини прокариоти, Е — еукаріоти.

Дволанцюгові РНК виявляються тільки у складі деяких вірусів. Крім того, відомі РНК віроїдів, які мають дві нуклеотидні комплементарні послідовності у вигляді двоспіральних молекул. У подвійній спіралі РНК можлива тільки одна, СЗ'-ендоконформація залишку рибози. Двоспіральні РНК, а також комплементарні двотяжеві полірибонуклеотидні комплекси (типу полі(А) - полі(У)) існують тільки в правій А-формі, подібної до А-форми ДНК.

Загальні риси вторинної структури одноланцюгових РНК. Макромолекули більшості природних РНК побудовані з одного полірибонуклеотидного ланцюга. Основний елемент їх вторинної структури — порівняно короткі подвійні спіралі, що утворені ділянками комплементарних нуклеотидів одного і того ж ланцюга і чергуються з одноланцюговими сегментами. Полірибонуклеотидні ланцюги в таких двоспіральних структурах (спіралізує сама на себе) антипаралельні, а самі подвійні спіралі, що знаходяться в А-формі, не ідеальні: в них є дефекти у вигляді неспарених нуклеотидних залишків або ділянок, що не вписуються в подвійну спіраль одноланцюгових петель. Разом з класичними уотсон-кріківськими парами (AU і GC) в дволанцюгових ділянках РНК часто зустрічається пара GU. Таким чином, стабільність дволанцюгових фрагментів підтримується взаємодіями комплементарних і міжплощинних основ. В одноланцюгових ділянках спостерігаються сильні стекінг-взаємодії основ, внаслідок чого вони прагнуть прийняти конформацію одноланцюгової спіралі (Рис. 3.30.).

Третинна структура одноланцюгових РНК. При дослідженні макромолекулярної організації одноланцюгових РНК було встановлено, що у фізіологічних умовах вони характеризуються компактною і впорядкованою третинною структурою, яка виникає за рахунок взаємодії елементів їх вторинної структури.

Елементи вторинної структури РНК розташовуються один відносно одного так, щоб забезпечити максимальний стекінг основ в макромолекулі в цілому.

1. Контакти між окремими елементами вторинної структури здійснюються за рахунок декількох типів так званих «третинних» внутрішньомолекулярних взаємодій:

- за рахунок утворення у первинній і вторинній структурах не - уотсон-кріківських додаткових пар основ між нуклеотидними залишками віддалених один від одного

одноланцюгових ділянок і триплетів основ між нуклеотидними залишками одноланцюгових і дволанцюгових елементів.

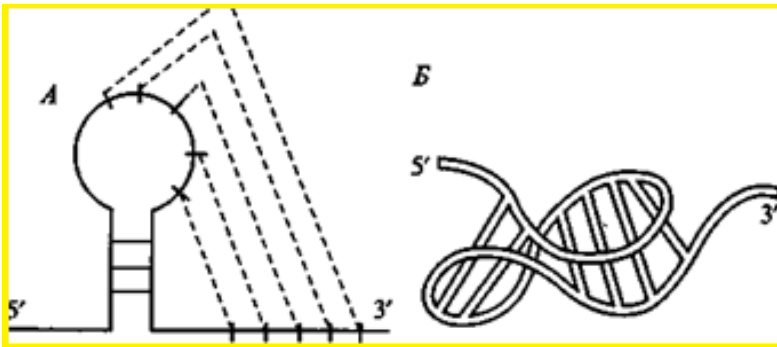


Рис. 3.31. Схема утворення «псевдовузла» (А) при спаровуванні ділянок комплементарних РНК у вершині шпильки і в іншій одноланцюговій ділянці; просторова модель «псевдовузла»(Б).

2. При аналізі вторинних структур вірусних і рибосомних РНК встановлено, що одноланцюгові ділянки на вершині петель в принципі можуть давати двоспіральні комплекси з міжпетельними одноланцюговими сегментами з утворенням «псевдовузлів» (рис.3.31, 3.32);

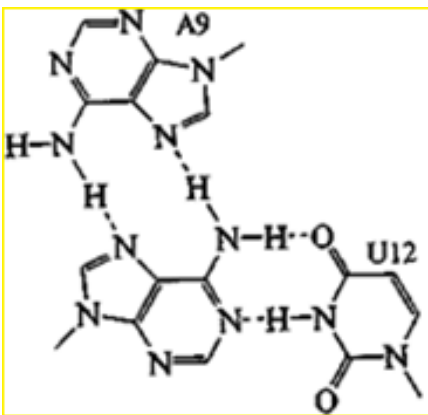


Рис.3. 32. Утворення А- U - А- триплету в тРНК.

- за рахунок додаткових («третинних») стекинг-взаємодій після інтеркаляції (впровадження) основ однієї ділянки між двома сусідніми основами іншої одноланцюгової ділянки (рис. 3.33);
- за рахунок утворення додаткових водневих зв'язків між 2'-ОН-групами залишків рибози і основами, а також іншими групами пентозофосфатного остову.

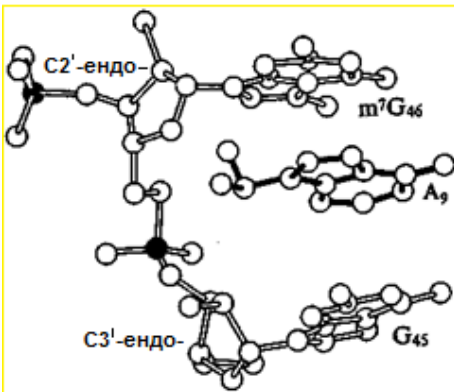


Рис. 3.33. Інтеркаляція А⁹ між залишками m⁷G₄₆ і G₄₅ в тРНК. Цей особливий вид стекинг-взаємодії зв'язаний з розходженням залишків гуаніна, при цьому конформація рибози змінюється від С3'-ендо- до С2'-ендоконформації.

3. Третинна структура РНК стабілізована іонами двовалентних металів, які зв'язуються не лише з фосфатними групами, але й з основами. Аналогічні принципи лежать в основі організації структури усіх одноланцюгових РНК. Будувати конкретні просторові структури одноланцюгових РНК вкрай важко через безліч

можливих варіантів укладання в них елементів вторинної структури.

Транспортні РНК. Головною функцією транспортних РНК (тРНК) є акцептування амінокислот і перенесення їх до рибосом клітини. Вони також виступають в ролі праймера в процесі зворотної транскрипції. Послідовність тРНК включає 70-90 нуклеотидів і близько 10% мінорних компонентів. Вона утворює вторинну структуру, відому під назвою «конюшиного листка». Ця структура складається з 4 або 5 дволанцюгових спіральних стебел і трьох петель. Кожне стебло містить 4-7 уотсон-кріківських пар, що утворюють подвійні спіралі. Розрізняють акцепторні, антикодонові, дигідроуридилові (D), псевдоуридилові (ТуС) і додаткові стебла.

Акцепторне стебло містить 3'- і 5'-кінці полінуклеотидного ланцюга, причому до кінцевої 3'-гідроксильної групи (ССА3'ОН) приєднується специфічна амінокислота, що відповідає послідовності антикодонового триплету в антикодонній петлі. Число нуклеотидів в стеблах і петлях майже постійне у різних тРНК за винятком варіабельних петель (від 4 до 21 нуклеотидів). Транспортні РНК — єдині представники природних полірибонуклеотидів, які

вдалося закристалізувати і вивчити методом рентгеноструктурного аналізу. Найдетальніше вивчена третинна структура дріжджової тРНК^{Phe} (А.Рич).

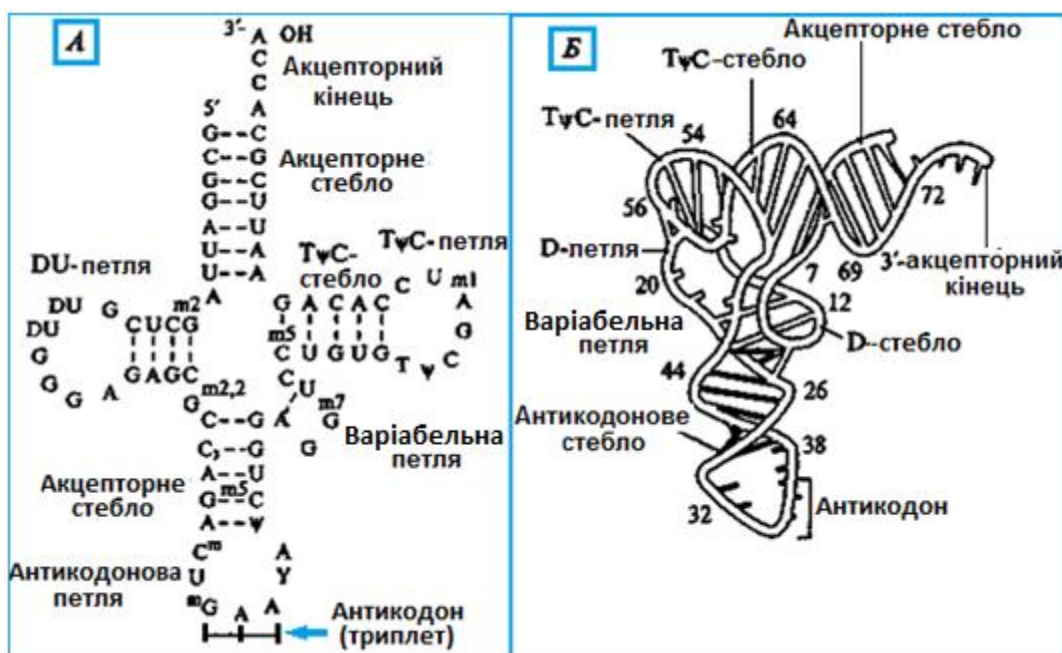


Рис. 3.34. Структура дріжджової тРНК^{Phe}:

А — первинна і вторинна структури; Б — третинна структура (схематичне зображення). Пентозофосфатний остов зображений у вигляді безперервної стрічки; пари основ — у вигляді довгих смужок; неспарені основи — у вигляді коротких смужок. Молекула має Г-подібну форму. Арабськими цифрами вказані номери нуклеотидних залишків.

У послідовності тРНК є інваріантні основи, які присутні в усіх тРНК. Вони беруть участь в «третинних» взаємодіях, які виникають тоді, коли молекула тРНК згортається в нативну Г-подібну структуру (рис. 3.34). Г-форма складається з двох майже перпендикулярних один одному спіралей А-РНК, довжина яких складає близько 7 нм, товщина — 2 нм. Одну спіраль утворюють укладені один за одним антикодонове і дигідроуридилове стебла, іншу — акцепторний і псевдоуридиловий.

Третинні взаємодії включають стекінг (у тРНК^{Phe} з 76 основ в стекінг-взаємодіях бере участь 71 основа); інтеркаляцію і незвичайне спаровування основ, при якому утворюються не лише пари, але і триплети (рис.3.34). Велика частина водневих зв'язків, що стабілізують третинну структуру утворюється між інваріантними і напівваріантними основами.

Особливим видом стекінга є інтеркаляція (у окремих місцях основа з одного ланцюга вбудовується між двома основами іншого ланцюга) (рис.3.33). Така взаємодія здійснюється там, де зустрічаються відразу три ланцюги. Пентозофосфатний остов в місці вставки основи перебудовується шляхом зміни конформації цукру С3'-ендо→С2'-ендо-, внаслідок чого збільшується відстань між фосфатами (від 0,59 нм до 0,70 нм), і це сприяє інтеркаляції. Антикодон має жорстку структуру, яка дозволяє йому швидко прочитувати кодон матричної РНК.

Рибосомні РНК. Високомолекулярні рибосомні РНК (рРНК) є структурною основою для формування рибонуклеопротейінового тяжа, який, складаючись в просторі, дає 30-40S, - і 50-60S-субчасток рибосоми; рРНК взаємодіють з мРНК і аміноацил-тРНК в процесі трансляції. Низькомолекулярна 5SpРНК в комплексі з рибосомними білками формує комплекс, який називають третьою субчастиною рибосоми, де 5SpРНК виступає в ролі посередника між пептидилтрансферазним центром і EF – G-зв'язуючими доменами.

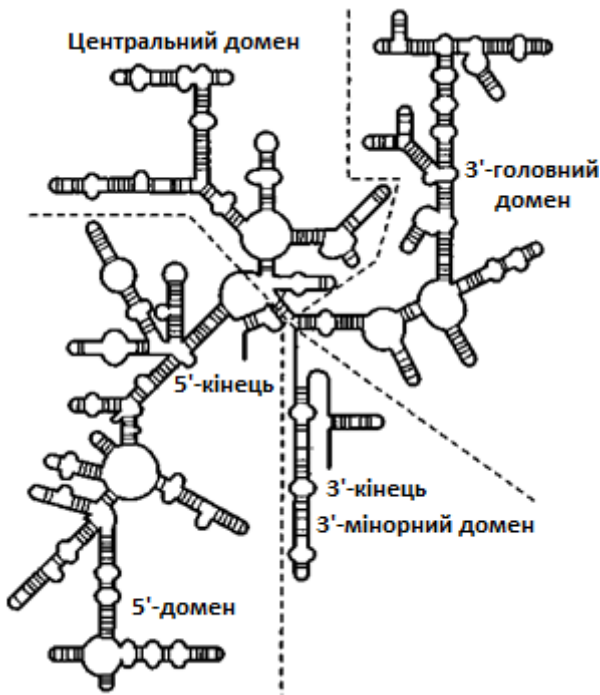


Рис. 3.35. Структура 16S рРНК *E. coli*. Вторинна структура, що містить 4 основні домени: центральний, 3'-головний, 5'- і 3'-мінорні домени (їх межі вказані пунктирними лініями).

Детально вивчені первинна, вторинна і третинна структури 5SpРНК. З'ясовані первинні структури 16-18SpРНК і 23-25SpРНК ряду організмів. Вторинна структура рРНК характеризується самоспіралізацією полірибонуклеотидного ланцюга (рис. 3.35). Біспіральні і лінійні ділянки цих молекул формують постійні і варіабельні домени, які потім укладаються в компактніші структури вищого порядку.

Матричні РНК. Матричними (мРНК) вважають РНК, які послідовністю нуклеотидних залишків визначають синтез специфічних білків безпосередньо на них самих, а також інформацію про час, кількість, місце і умови синтезу цих

білків. Будова мРНК еукаріот специфічна: в їх складі є інформативні (матриці в процесі трансляції) зони і неінформативні ділянки. Відмічена своєрідність в будові мРНК і розташування функціональних ділянок в її молекулі представлені у вигляді узагальненої структури (рис. 3.36). Неінформативні ділянки містять кеп, 5'-нетрансльовану область (5'-НТО), 3'-нетрансльовану область (3'-НТО), поліадениловий фрагмент (Полі-А).

Кеп (англ. cap – кепка, шапка) – нуклеотидна послідовність, що містить 7-метилгуанозин, який приєднаний через трифосфатну групу до первинного транскрипту. Кеп часто включає 2'-О-метильні групи, які пов'язані з першим або з двома першими залишками рибози наступних нуклеотидів (рис. 3.36). Кеп потрібний для захисту мРНК від екзонуклеаз, грає сигнальну роль в приєднанні мРНК до рибосоми і бере участь в трансляції.

Довжина полі(А)-фрагментів у різних мРНК коливається від 50 до 400 н.п. Ці фрагменти відсутні в молекулах гістонових мРНК. Вважають, що поліаденилова частина молекули мРНК бере участь в процесі дозрівання мРНК, зумовлює час життя мРНК, сприяє перенесенню мРНК з ядра в цитоплазму і бере участь в трансляції.

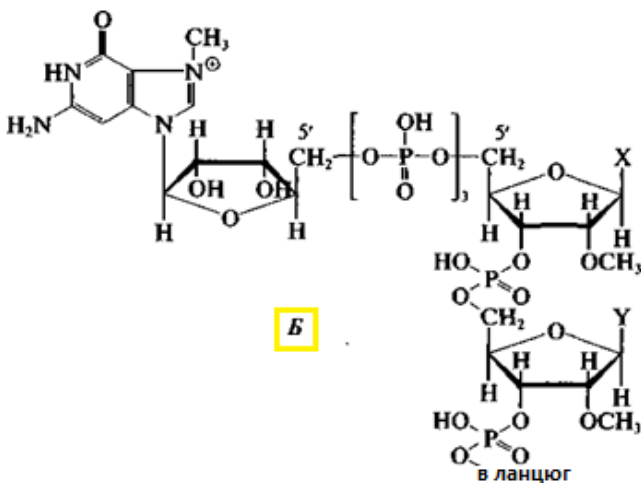
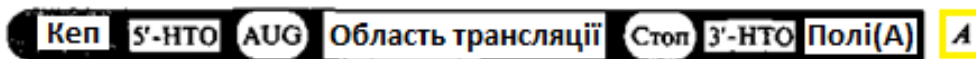


Рис. 3.36. Узагальнена структура мРНК еукаріот (А) і кеп-структура на 5'-кінці мРНК еукаріот (Б)

Час життя мРНК в клітині, як і момент їх деградації, запрограмовані специфічними послідовностями часто в їх 3'-НТО. Їх називають елементами нестабільності мРНК. Певні білки клітини дізнаються ці послідовності, зв'язуються з ними і стабілізують мРНК. Окрім цього 3'-НТО містять сигнали цитоплазматичного і ядерного поліаденилювання і сигнали

внутрішньоклітинної локалізації для цих мРНК.

Цікаво відмітити, що інформація про одну і ту ж властивість мРНК може міститися в різних частинах молекули мРНК, іноді віддалених один від одного упродовж

полінуклеотидного ланцюга на значній відстані. Ймовірно, ці ділянки молекули мРНК зближуються при формуванні її просторової структури. Припускають, що вторинна і третинна структури мРНК менш компактні, чим для тРНК і рРНК.

Гетерогенна ядерна РНК. Гетерогенна ядерна РНК (гяРНК) - суміш транскриптів багатьох ядерних генів; які локалізовані в ядрі. Деякі з них являються первинними транскриптами і мають таку ж довжину, як і гени, з яких вони скопійовані, інші – частково піддалися процесінгу і втратили ряд інтронів.

Малі ядерні РНК. Усі еукаріотичні клітини містять безліч малих ядерних РНК (мяРНК) - коротких стабільних молекул РНК, більшість яких у складі нуклеопротейдних часток присутні в ядрі. Вони виявлені у складі сплайсингосом ссавців. Ці РНК називають U - РНК із-за надзвичайно великого змісту урацила і його модифікованих форм (таблиця 3.6). Нуклеотидні послідовності усіх U - РНК хребетних співпадають на 95 %.

Таблиця 3.6. U-РНК ссавців

| U-РНК | Довжина РНК (число нуклеотидів) | Функція |
|-------|------------------------------------|-------------------------------------|
| U1 | 164 | Сплайсинг про-мРНК |
| U2 | 187 | Сплайсинг про-мРНК |
| U3 | 217 | Процесинг про-рРНК в ядерці |
| U4 | 145 | Сплайсинг про-мРНК |
| U5 | 116 | Сплайсинг про-мРНК |
| U6 | 106 | Сплайсинг про-мРНК |
| U7 | 65 | Утворення 3'-кінців гістонових мРНК |
| U11 | 131 | Поліаденілування про-мРНК |

Малі цитоплазматичні РНК

Функції малих цитоплазматичних РНК (мцРНК), за винятком 7SL – РНК сигнал-впізнаючих часток, не встановлені. Відомо, що більшість цих РНК асоційовані з великими сімействами послідовностей, що містять як гени, так і псевдогени.

У перенесенні новосинтезованих

поліпептидів, що секретуються і пов'язані з мембранами, через ліпідний шар ендоплазматичного ретикулума беруть участь частки, які впізнають сигнал та основним компонентом яких є 7SL - РНК. Нуклеотидні послідовності 7SL - РНК у гризунів і приматів практично однакові, а у дрозофіли ця РНК на 64 % гомологічна відповідній РНК людини.

Розглянуті вище особливості структури і функцій ДНК і РНК спонукають до зіставлення їх ролі в живій природі. При цьому виникає виразне враження про значно більш різноманітні функціональні можливості рибонуклеїнових кислот в порівнянні з ДНК, існування якої пов'язане виключно з необхідністю збереження і передачі з покоління в покоління спадкових ознак. Сучасні знання про структурну і функціональну різноманітність РНК вже не укладаються в ті канонічні уявлення про їх роль в реалізації генетичної інформації, які виникли на самому початку розвитку молекулярної біології. Уявлення про те, що РНК служить тільки інструментом трансформації генотипу, закладеного в структурі ДНК, в конкретний фенотип (ДНК → РНК → білок), було переглянуто після відкриття зворотної транскрипції. Це відкриття поставило РНК в центр основного постулату молекулярної генетики, оскільки показало, що потік генетичної інформації поширюється від РНК не в одному, а в двох напрямках: не лише до білку, але і до ДНК. Більш глибоке пізнання механізмів основних молекулярно-генетичних процесів (реплікацію, транскрипцію і трансляцію), сприяло виникненню поняття про неканонічні функції РНК, усвідомленню поліфункціональності рибонуклеїнових кислот.

Для того, щоб оцінити значення РНК в природі в цілому, слід відповісти на питання: які функції виконують РНК?

РНК здатні виконувати роль месенджера при передачі спадкової інформації про

структуру білка від ДНК до білоксинтезуючого апарату клітин (мРНК), бере участь у формуванні структури рибосом (рРНК), забезпечує специфічну акцептацію і перенесення амінокислот до рибосом (тРНК). В той же час РНК властиві особливі неканонічні функції, які залучені в реалізацію більшості фундаментальних процесів в клітині (рис.3.37).



Рис. 3.37. Роль різних типів РНК в молекулярно-генетичних процесах.

- РНК беруть участь в реплікації ДНК, виступаючи в ролі приманок (праймерів), необхідних для ініціації синтезу ланцюгів комплементу ДНК. Особлива "антисмислова" РНК (РНК I) виконує роль регульовальника ініціації реплікації ДНК в точках початку реплікації, маючи можливість зв'язувати праймери і тим самим зупиняти біосинтез ДНК.

- РНК виконує роль матричної молекули в процесах зворотної транскрипції (біосинтезі ДНК на матриці РНК) і своєї власної реплікації у РНК-вмісних вірусів і фагів. В процесі зворотної транскрипції роль приманки, необхідної для синтезу ланцюга комплементарної ДНК, виконує тРНК. Матричні властивості РНК реалізуються в процесі нарощування теломерних повторів в молекулах ДНК: РНК-матриця є найважливішим компонентом теломераз - ферментів, що здійснюють синтез теломерних ділянок ДНК в хромосомах.

- В процесі транскрипції (біосинтезі РНК на матриці ДНК) велике значення має здатність РНК утворювати різноманітні елементи вторинної структури (шпильки), які впливають як на ініціацію, так і на термінацію синтезу РНК. РНК активно бере участь в процесі свого власного дозрівання - процесингу первинних транскриптів (про-РНК). У примітивних одноклітинних організмів виявлена здатність РНК до аутосплайсингу - вирізанню некодуючих ділянок (інтронів) і зшиванню кодуючих фрагментів (екзонів) без участі білків-ферментів. У організмів, що втратили здатність до аутосплайсингу, в сплайсингу РНК беруть участь особливі молекули - малі ядерні РНК (мяРНК), необхідні для безпомилкового вичленування інтронів з молекул РНК-попередників.

- У біосинтезі білку (трансляції) РНК безумовно відіграє визначальну роль. Різні по структурі рРНК формують основу субчастинок рибосоми і визначають взаємодію субчастинок при зборці повної рибосоми. Приєднання мРНК до рибосоми детермінується взаємодією комплементарних ділянок мРНК і рРНК. Активація амінокислот, їх специфічна акцептація і доставка до рибосом здійснюється тРНК. Кодон-антикодонова взаємодія між мРНК і тРНК забезпечує переведення нуклеотидної послідовності інформаційних макромолекул в амінокислотну послідовність білків. Сама реакція утворення пептидного зв'язку і просування рибосоми по мРНК (транслокація) також пов'язані з функціонуванням рРНК. Просторова структура мРНК безпосередньо впливає на швидкість трансляції, а її здатність взаємодіяти з різноманітними регуляторними білками, особливо характерна для вищих еукаріот, є основою для тонкої регуляції біосинтезу білку. Особлива тмРНК, яка поєднує в собі властивості тРНК і мРНК одночасно, здатна забезпечувати транс-трансляцію – біосинтез поліпептидного ланцюга білку з використанням різних матричних послідовностей.

- Посттрансляційні модифікації синтезованих в ході трансляції поліпептидів, в

результаті яких утворюються функціонально активні молекули, також нерідко зв'язані з приєднанням до них значних за розмірами молекул РНК. Таким шляхом виникають РНК-вмісні ферменти - рибонуклеопротейни (РНКаза Р, теломерази та ін.).

- Багато каталізаторів білкової природи (ферменти), що каталізують різні біохімічні перетворення в клітині, функціонують завдяки вмісту в них коферментів рибонуклеотидної природи (NAD, FAD, АТФ та ін.).

Після відкриття Т. Чеком із співавторами аутосплайсинга РНК у тетрахимени стало зрозумілим, що самі молекули РНК можуть мати каталітичні властивості, цілком порівнянні з властивостями ферментів-протейнів. Саме відкриття рибозимів (РНК-ферментів) привело до створення концепції «світу РНК» – світу, який, ймовірно, виник і існував задовго до оформлення нині існуючого «світу ДНК-білкового». Після відкриття рибозимів Ф. Крик писав: «Ці експерименти (по каталітичній РНК) підтримують гіпотезу, що біохімія РНК передувала традиційній біохімії, заснованій на нуклеїнових кислотах і білках».

Існує декілька аргументів на користь того, що РНК є первинними молекулами - носіями життя. РНК здатна кодувати генетичну інформацію, це повною мірою властиво РНК-вмісним вірусам. Доведено також, що вірусні РНК здатні до рекомбінації, в яку можуть залучатися як вірусні, так і клітинні РНК.

Класичні досліді Г.Урея і С.Міллера по відтворенню первинного (абіотичного) середовища Землі довели, що в результаті використання енергії, яка виділялася при нагріванні сухих органічних залишків або під дією каталітичної активності неорганічних поліфосфатів, нуклеотиди могли взаємодіяти один з одним з утворенням полімерних молекул. Випадкове об'єднання нуклеотидів в полімерні ланцюги мало вирішальне значення, бо привело до виникнення матричних молекул, придатних для комплементарного копіювання. Подальша еволюція цих молекул могла привести до відбору каталітично активних РНК. Таким чином міг виникнути «світ РНК», де РНК виступала як самодостатня молекула, що поєднувала в собі генотип і фенотип одночасно і була здатною до еволюційного розвитку завдяки рекомбінації і каталітичним здібностям. Ключовим ферментом цього світу мав бути фермент РНК-репліказа, який здатний здійснювати аутокаталітичну реплікацію РНК. Пошуки такого ферменту в наш час ведуться серед інтронів групи I - ділянок молекул певних видів РНК, які є джерелом виникнення рибозимів.

У ході подальшої біологічної еволюції і особливо у зв'язку з виникненням клітинних форм життя частина функцій РНК, імовірно, перейшла до ДНК, а інша частина – до білку. Існуючі РНК мають високу різноманітність форм, перевершуючи в цьому відношенні ДНК.

Молекулярна організація генів

Сучасне визначення гена. Структура гена пр- і еукаріотів. Класифікація генів згідно їх функцій. Структурні гени. Поняття про гени «домашнього господарства» і гени термінального диференціювання. Типи регуляторних генів про- і еукаріотів.

У 1865 р. Г.Мендель відкрив закони спадковості та для пояснення закономірностей успадкування ввів поняття про спадкові фактори (гени). У 1909 р. В.Іогансен ввів в науку термін «ген». У 1911 р. Т.Морган із співробітниками розробили «хромосомну теорію», де вони зауважили, що ген – це ділянка хромосоми, відповідальна за прояв певної ознаки. У 1926 р. Т.Морган написав книгу «Теорія гена», де він також відзначав, що ген – одиниця мутації, рекомбінації і функції. У 1934 р. в Нобелівській лекції Т.Морган сказав: «Серед генетиків немає згоди в поглядах на природу генів. Якщо ген матеріальна одиниця, то він є шматочком хромосоми».

У 1940 р. Джордж Бідл і Едвард Татум (США) вивчали генетичний контроль метаболічних реакцій у хлібної цвілі *Neurospora crassa* і висунули гіпотезу « один ген – один фермент». Проте ген все ще залишався абстрактною одиницею.

Тільки коли вчені (Евері, 1944; Ледерберг, 1951; Херши, 1952) довели, що генетична інформація закодована в ДНК, з'явилось визначення: ген – це лінійна ділянка ДНК, що кодує один білок. Пізніше з'ясувалося, що не всі гени кодують білки.

У 1961 р. французькі генетики Ф.Жакоб і Ж.Моно відкрили механізм регуляції роботи генів у прокариот і встановили, що в ДНК є ділянки, що не кодують білки. Ці ділянки ДНК назвали функціональною зоною, а ділянки, що кодують білки, – структурною зоною. Ще більше поняття гена ускладнилося після відкриття в 1977 р. переривчастої будови генів еукаріот. Виявилось, що вони мають кодуючі ділянки - екзони і некодуючі - інтрони. Інтронів може бути від 1 до 50 на один ген. Інтрони займають в ДНК більшу частину ніж екзони.

У 1952 р. Барбара Мак-Клінток виявила фенотиповий прояв транспозонів – стрибаючих генів. До 1980 р. існування транспозонів було доведено багатьма вченими. Вони властиві всім видам. Їх сотні і тисячі в еукаріотичній клітині. Вони знаходяться під генетичним контролем і «стрибають» в інше місце хромосоми за командою. Завдяки транспозонам бактерії втрачають чутливість до антибіотиків і, гинучи від одного, не реагують на дію іншого. Одноклітинний ендопаразит трипаносома теж має транспозони, які забезпечують стійкість до ферментів «господаря». Транспозони також запускають процеси старіння. У 1976 р. у деяких фагів були виявлені гени, які перекриваються, тобто на 1 ділянці ДНК може бути розташовано 2 гени.

Таким чином, структура гена виявилася дуже складною, поняття про нього розширилися, і дослідження продовжуються. Під терміном «ген» розуміють структурно-функціональну та інформаційну одиницю спадкової інформації, яка є ділянкою ДНК (або РНК) з певною організацією та забезпечує формування ознаки на молекулярному рівні (РНК або поліпептид). Функціональна одиниця гена – кодон (триплет з нуклеотидів). Структурна одиниця гена – нуклеотиди (у еукаріот пара нуклеотидів).

В результаті складних еволюційних перетворень у кожного виду організмів сформувалася складна взаємодіюча система генів - генотип, яка представлена різними за функціями генами.

Ген – ділянка ДНК, що включає функціональні ділянки (промотор, термінатор та ін.) та структурну (кодуючу) послідовність. Промотор – невелика ділянка гена, до якого приєднується фермент транскрипції – РНК-полімераза. Кодуюча частина містить інформацію про послідовність нуклеотидів в РНК. Термінатор – сигнальна ділянка про завершення транскрипції. Кожен з елементів гена має складну будову.

Кожна з 23 пар інтерфазних (G1) хромосом людини містить одну молекулу ДНК. Розмір ДНК в найбільшій першій хромосомі (хромосоми нумерують за розміром) - 250 мільйонів пар нуклеотидів, а в найменшій - 47 мільйонів.

Гени розташовані в лінійному порядку. У прокариот лінійні розміри гена узгоджуються з розмірами структурного білка, а у еукаріот розміри ДНК набагато перевершують сумарні розміри значущих генів. Кожен ген має своє місце розташування (локус). Сукупність всіх генів називається геномом. Геном людини містить $3,5 \times 10^9$ нуклеотидних пар, що достатньо для 1,5 млн. генів. Проте дослідження показують, що організм людини має приблизно 35000 - 40000 генів. Це означає, що в статевозрілому організмі використовується тільки $\approx 2 - 3\%$ генетичної інформації. Значна частина генома використовується на процеси ембріонального розвитку, диференціювання, росту та розвитку і надалі не експресується. Інша значна частина надмірної ДНК входить до складу інтронів. І ще більша частина ДНК представлена численними родинками повторюваних послідовностей, які не мають сенсу. Послідовності, які повторюються, зустрічаються з частотою від 2 до 1000000 на одну клітку. Наприклад, ген, кодуючий рРНК, повторюється близько 2 тисяч разів. Вочевидь, такі гени, можуть кодувати групи білків або мати поки що невідомі функції.

Властивості генів:

- специфічність; цілісність і дискретність; стабільність і лабільність;
- плейотропність; експресивність і пенетрантність.

Класифікація генів:

Регуляторні:

1. Активатори (підсилювачі);
2. Репресори (пригнечувачі);
3. Промотори;
4. Термінатори;
5. Оператори;

Структурні:

1. Унікальні;
2. Повторювальні;
3. Транспозони;
4. Мовчазні (мутантні без експресії).

Функції генів. Зібрані відомості про гени людини дозволяють виділити наступні групи по функціях первинного продукту: ферменти; модулятори функції білків; рецептори; чинники транскрипцій; внутріклітинний матрикс; позаклітинний матрикс; трансмембранні переносники; канали; клітинні сигнали; гормони; екстраклітинні переносники; імуноглобуліни і ін. Безумовно, є ще і гени з поки невідомою дією.

Структура прокаріотичних генів.

Ген — структурно-функціональна одиниця спадкової інформації, займає певне положення в хромосомі і геномі та контролює утворення РНК або поліпептиду. Ген прокаріот складається з двох основних частин: регуляторної та кодуєної частин. Регуляторна частина гена забезпечує перші етапи реалізації генетичної інформації. Структурна частина гена містить інформацію про структуру кодованого цим геном поліпептиду. Кількість некодуєчих послідовностей в структурній частині гена у прокаріот мінімальна. 5'-кінець прокаріотичного гена має характерну організацію регуляторних елементів - промотор (знаходиться на відстані 50-70 н.п. від точки ініціації транскрипції). Він важливий для транскрипції гена, але не транскрибується. Протилежний 3'-кінець — термінаторна область, необхідна для завершення транскрипції. У РНК вона також не транскрибується. Транскрипція розпочинається із стартової точки +1 (рис. 4.1).

Промотор має дві консервативні послідовності: одна складається з 6-7 н.п. і розташована на відстані — 10 пар основ від стартової точки; її позначають як -10-послідовність (бокс Прібнова). Друга послідовність довжиною 9 нуклеотидів розміщена на відстані — 35 основ від сайту ініціації. Ця 35-послідовність бере участь у зв'язуванні РНК-полімерази; у боксі Прібнова РНК-полімераза починає локальне розкручування спіралі і

створює умови для ініціації синтезу РНК (рис. 4.1).

Послідовності ДНК, що є сигналами зупинки транскрипції, знаходиться на 3'-кінці гена і називається транскрипційними термінаторами. Вони містять послідовності, які формують шпильки в ланцюгу РНК, що транскрибується.

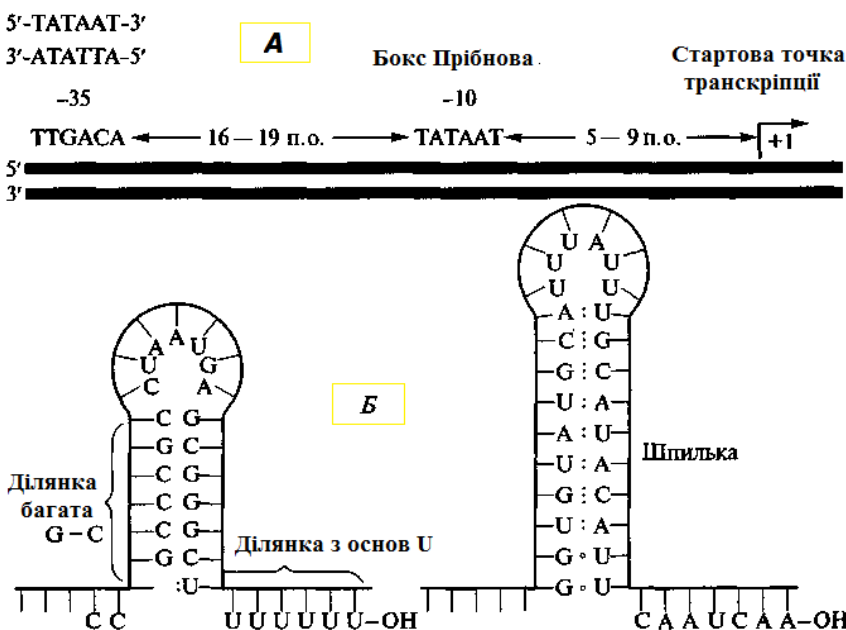


Рис. 4.1. Структура промотора і термінатора прокаріотичних генів: А - послідовності елементів промотора E. coli; Б — структури термінаторних шпильок в РНК прокаріот.

Послідовність основ в цьому місці сприяє утворенню стабільних пар ГЕС за рахунок водневих зв'язків. За шпильковою структурою в транскрипті РНК знаходиться декілька залишків U (відповідно в гені послідовність A₅₋₆), які дають слабке зв'язування РНК з ДНК. Це і полегшує термінацію транскрипції.

Ділянка ДНК між промотором і термінатором називається одиницею транскрипції. Послідовності, що кодують білки, бувають не трансльованими сегментами (їх позначають 5'-НТП і 3'-НТП). Гени РНК перемежуються спейсерними (англ. *spacer* — роздільник) послідовностями, які вирізаються в ході процесінгу рРНК і тРНК (рис. 4.2).

Оперонна організація генів прокариот. У *E.coli* гени, які кодують білки одного і того ж метаболічного шляху або мають близькоспоріднені функції, часто бувають зчепленими.

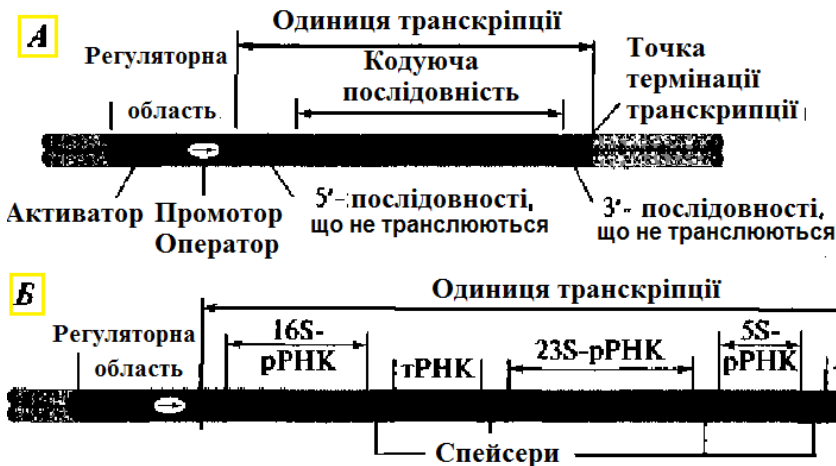


Рис. 4.2. Будова прокариотичних генів: А — ген, який кодує один білок; Б — гени, які кодують рРНК і тРНК

Вони транскрибуються з промотора, який знаходиться на 5'-кінці такої групи генів (кластер) у вигляді єдиної поліцистронної молекули РНК. Група

координованих загальною експресією генів називається опероном. Три гени, які кодують ферменти, відповідальні за метаболізм галактози у *E.coli*, організовані в оперон з промотором і регуляторним сегментом-оператором (рис. 4.3).

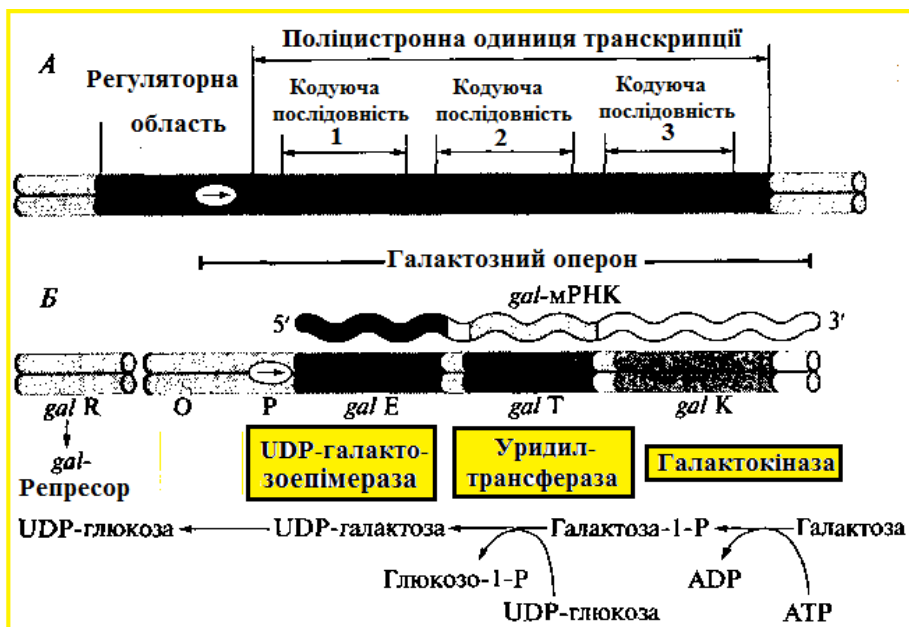


Рис. 4.3. Оперонна організація генів прокариот: А — загальна схема оперону; Б — галактозний оперон *E. coli*. О — оператор, Р — промотор, три гени оперону — *gal E*, *gal T*, *gal K*. Знизу показані реакції, що каталізуються трьома генними продуктами — галактозокіназою, уридил-трансферазою і UDP-галактозоєпімеразою. Усі три ферменти трансльовуються єдиною поліцистронною *gal* мРНК; ген *gal R* — репресор галактозного оперону, який не зчеплений з опероном.

При порівнянні геномів *E.coli* і *B.subtilis*, які мають близько 1000 загальних генів, відмічено, що більшість з них знаходяться у складі однакових оперонів, але в деяких випадках порядок генів в оперонах змінений (Н., в арабінозном опероні *ara ABD* у *B.subtilis* і *ara BAD* у *E.coli*).

Гени, які кодують декілька споріднених функцій, не завжди утворюють єдиний оперон. Так, гени, які кодують рибосомні білки, організовані в множинні оперони. До їх

складу іноді входять гени, які кодують білки, що беруть участь в транскрипції і трансляції. Як правило, оперони, мають однакові або схожі регуляторні послідовності і тому реагують на певний регуляторний сигнал схожим чином. Збереження генів у складі одного оперону дає певні переваги: по-перше, забезпечує координовану експресію генів; по-друге, таке розміщення генів важливо для їх поширення шляхом горизонтального перенесення. Горизонтальне перенесення генів (ГПГ) має свій внесок в еволюцію прокариотичних геномів. Показано, що ГПГ відбувається як між спорідненими, так і між неспорідненими бактеріями. Гени, що з'явилися в цьому геномі в результаті горизонтального перенесення, називають ксенологами. Відмічено горизонтальне перенесення генів між еукаріотами і прокариотами: найбільше число генів еукаріотичного типу (≈ 30) виявлене в геномі хламідії.

Структура еукаріотичних генів.

Організація генів у еукаріот значно складніша, ніж у прокариот. Еукаріотичний ген можна розглядати як сукупність ділянок ДНК, які разом складають одиницю експресії, відповідальну за утворення специфічного функціонального продукту - молекули РНК або поліпептиду (рис. 4.4.)

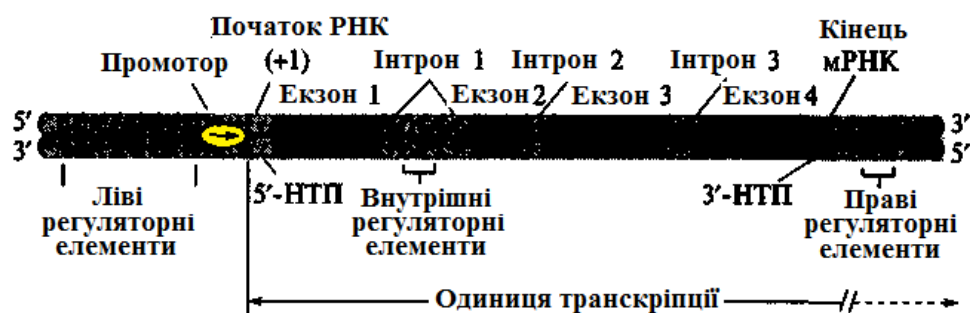


Рис. 4.4. Структура еукаріотичного гена, що кодує білок: +1 — точка ініціації транскрипції; 5'-НТП і 3'-НТП: 5'- і 3'-послідовності, які не транскрибуються.

До сегментів ДНК, які утворюють ген, відносяться наступні елементи:

1. Одиниця транскрипції — це ділянка ДНК, яка кодує первинний транскрипт. Вона включає: а) послідовність, яка знаходиться в зрілих функціональних молекулах РНК; б) інтрони (для мРНК); в) проміжні послідовності - спейсери (для рРНК). Інтрони і спейсери виділяються в ході процесінгу первинних транскриптів; г) 5'— і 3'— нетрансльовані послідовності (5'-НТП і 3'-НТП).

2. Мінімальні послідовності, необхідні для початку транскрипції (промотор) і кінця транскрипції (термінатор).

3. Послідовності, які регулюють частоту ініціації транскрипції; відповідальні за індукцибельність і репресію транскрипції, а також клітинну, тканинну і тимчасову специфічність транскрипції. Вони різноманітні за будовою, положенням і функціями. До них відносяться енхансери (англ. *enhance* - підсилювачі) і сайленсори (англ. *silence* — мовчазні) — це послідовності ДНК, розташовані в тисячах н.п. від промотора еукаріотичного гена, але дистанційно впливають на його транскрипцію. У це поняття гена не включені послідовності ДНК, які впливають на просторову конфігурацію гена в хроматині, ні послідовності, які регулюють його топологію.

Гени, які кодують білки.

На відміну від прокариотичних генів, вони майже завжди колінеарні своїм РНК, багато генів еукаріот мають *мозаїчну будову*. Мозаїчність — це чергування в межах одиниці транскрипції кодуючих (екзони) і некодуючих (інтрони) послідовностей ДНК.

Інтрони найчастіше зустрічаються в генах, які кодують білки. За винятком генів п'яти гістонів, α - і β -інтерферонів, усі гени, що кодують білки хребетних, містять інтрони. У більшій частині генів *Drosophila* інтрони відсутні. Проте деякі кластери генів, що регулюють розвиток органів тіла комахи, містять безліч інтронів. Інтрони присутні і у багатьох генах рослин.

Розміри, число і місце розташування інтронів у різних генів відрізняються. Проте схожі

гени у різних організмів часто мають однакове число інтронів в одних і тих же позиціях, хоча довжина і нуклеотидна послідовність інтронів можуть помітно розрізнятися. Звичайне число інтронів на ген зростає пропорційно довжині послідовності, яка кодує білок, а розміри екзонів, у середньому, складають близько 300 н.п. В цілому загальна довжина інтронів перевищує сумарну довжину екзонів в 2 - 10 разів, а іноді ще більше (табл. 4.1).

Інтрони розташовуються в одиницях транскрипції не випадково. У білок-кодуєчих генах вони часто знаходяться між сегментами, які кодують окремі структурні або функціональні домени білку. Еволюційне виникнення інтрон-екзонної структури генів еукаріот, так само як і консервативний характер спадковості, розміри і взаємне розташування інтронів в генах не знаходять повного пояснення через уявну відсутність чинника тиску природного добору на послідовності нуклеотидів без чітких біологічних функцій.

Таблиця 4.1. Переривчасті гени еукаріот, що кодують білки.

| Ген | Організм | Екзони | Інтрони | |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------|----------|
| | | Сумарна довжина (н. п.) | Число | Організм |
| α-Глобін | Миша | 463 | 2 | 256 |
| α-Глобін | Людина | 596 | 2 | 265 |
| Інсулін | Людина | 417 | 2 | 964 |
| Інсулін | Курка | 540 | 2 | 3 619 |
| Альбумін | Щур | 2 000 | 13 | 12 500 |
| а-Амілаза | Щур | 1600 | 7 | 7 400 |
| Дигидрофолатредуктаза | Миша | 1600 | 26 | 40 400 |
| Овальбумін | Курка | 1872 | 7 | 5 758 |
| Фіброїн | Шовковичний шовкопряд | 18 000 | 1 | 970 |
| Фазеолін | Квасоля | 1263 | 5 | 515 |

Найбільше поширення отримала концепція В. Гілберта (1977), згідно якої поява інтронів, мабуть, співпала за часом з еволюційним виникненням багатоклітинних організмів, що забезпечило можливість обміну екзонами між неспорідненими генами. Такий обмін повинен супроводжуватися утворенням нових білків мозаїчної будови, складених з готових поліпептидних функціонально значимих модулів (доменів), які раніше належали іншим білкам (гіпотеза про перекомбінування екзонів в процесі еволюції). Наслідком цього, на думку прибічників цієї концепції, було різке прискорене утворення білків і ферментів з новими функціями, а також глибокі еволюційні перетворення самих організмів, які реалізують такі молекулярні механізми. Ця точка зору дістала ще назву «Гіпотези пізнього виникнення інтронів». Відповідно до іншої гіпотези (Дж. Дарнелл і В. Дулітл, 1978) сучасні інтрони являють собою «еволюційні релікти». Колись інтрони були частиною велетенських генів. Передбачається, що мозаїчна структура генів визначає еволюційні можливості генома.

Визначення нуклеотидних послідовностей у складі гомологічних генів (наприклад, генів глобінів) показало, що найбільшим змінам в еволюції піддавалися інтрони, а не екзони. У інтронах виявлені вставки, делеції і інші перебудови, тоді як послідовності екзонів виявляються значно більш консервативними: в них є лише окремі нуклеотидні заміни. Ці спостереження можна представити на користь уявлень про те, що перекомбінація екзонів здійснювалася у ділянках інтронів, що і супроводжувалося зміною їх структури.

Для еукаріот характерні моноцистронні одиниці транскрипції на відміну від прокаріот, у яких зазвичай гени організовані в оперони, а їх експресія опосередковується поліцистронними мРНК. У еукаріотичних клітинах утворюються мРНК, які кодують тільки один білок. Навіть якщо ген кодує не один вид мРНК, як при альтернативному сплайсінгу, кожна зріла мРНК має тільки одну трансльовану кодуєчу послідовність.

Регуляторні елементи генів, які кодують білки.

У вищих еукаріот в межах 100 — 200 н. п. перед стартом транскрипції виявлена складна мозаїка промоторних елементів, представлених короткими нуклеотидними послідовностями («мотивами»). На відстані 27 — 30 н.п. від сайту ініціації транскрипції розташований TATA-мотив, який визначає сайт ініціації транскрипції - 5'-кінець транскрипту.

На відстані 80-50 н.п. є послідовність CCAAT, що зазвичай зустрічається в промоторній зоні різних тканинспецифічних генів (глобінів, тиреоглобуліну, актїна та ін.), і послідовність GGGCGGG, усереднений варіант «GC-мотив». Останній може зустрічатися кілька разів за довжиною промоторних ділянок конститутивних генів, що забезпечують загально-клітинні функції; перед генами глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і фосфогліцераткінази вставлені відповідно дев'ять і два такі мотиви.

Ефективність промотора визначається як ефективністю окремого елементу («мотиву») у складі промотора, числом його елементів, так і найближчим нуклеотидним оточенням навколо нього (рис. 4.5).

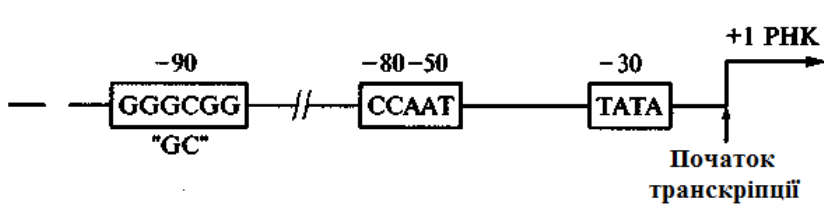
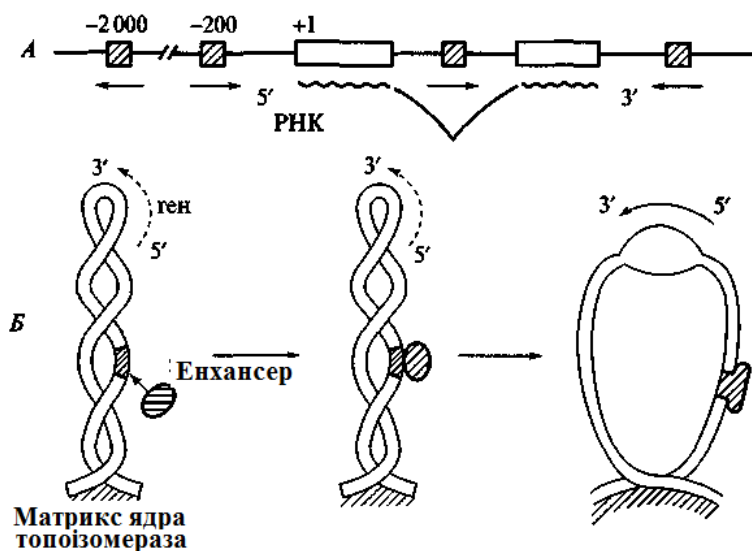


Рис. 4.5. Загальна схема будови промоторів генів, які кодують білки, у еукаріот.

Гени, які кодують адаптивні білки, утворення яких різко посилюється під впливом

різних чинників середовища (підвищення температури, отруєння металами), містять у складі промоторів додаткові характерні короткі нуклеотидні послідовності. Так, в гені білку теплового шоку дрозофіли в промоторному районі є мотиви STCG і GTTC, які повторюються; у генах білку металотионеїна виявлені дев'ятинуклеотидні «мотиви», які повторюються: TGCGCTCGG. Якщо такі мотиви вставити в промотори інших генів, то їх експресія почне залежити від присутності металів. Виявлені ділянки, відповідальні за гормонозалежну регуляцію. Таким чином, ділянка промотора еукаріотичного гена розглядається як специфічний ДНК-остов, на якому збираються білки транскрипції, впізнають свої сайти і взаємодіють як один з одним, так і з РНК-полімеразою.

У складі еукаріотичного гена є особливі цис-діючі елементи регуляції, що дістали назву підсилювача (енхансера), або активатора, транскрипції. Виявилось, що енхансери можуть розташовуватися як на 5'-, так і на 3'-кінці фрагмента ДНК, а також у складі інтронів. Вони здатні діяти і на великих відстанях (більше 1000 н.п.), і незалежно від орієнтації по відношенню до напрямку транскрипції гена.



Енхансери складаються з «нуклеотидних мотивів». Короткі нуклеотидні блоки можуть бути центрами зв'язування специфічних ядерних білків.

Рис. 4.6. Енхансери еукаріотичних генів: А — можливі ділянки локалізації енхансера (■) з різною орієнтацією (→) відносно напрямку транскрипції; Б — взаємодія білку з енхансером (стрілка — транскрипція гена).

Сила енхансера, ймовірно, може залежати від числа таких блоків. Обговорюються два основні механізми дії енхансерів.

Вважається, що функціональні ділянки генома, які містять один або декілька генів, утворюють довгі петлі, які включають десятки тисяч нуклеотидних пар ДНК. Петлі закріплені в матриці клітинного ядра і надспіралізовані. До складу матриксу входить топоізомераза II, яка визначає топологію петлі ДНК. Взаємодія енхансера з білками змінює конформацію усієї петлі, включаючи і віддалену від нього ділянку ДНК, внаслідок чого у складі петлі змінюється локальна структура хроматину і полегшується транскрипція гена.

Ймовірніше, що вплив енхансера, пов'язаного з білком, визначається його безпосередньою взаємодією з РНК-полімеразою. Енхансер, залежно від білкового чинника, може поводитися і як негативодіючий сайленсер експресії гена. Дія сайленсерів і енхансерів не залежить від положення і орієнтації відносно сайту ініціації транскрипції. Таким чином, регуляторні елементи генів мають ряд загальних функціональних характеристик. На фізичній карті регуляторної області гена вони можуть розташовуватися в одній ділянці, створюючи складну мозаїку регуляторних сигналів. Відсутність вимог до строгої локалізації і орієнтації регуляторних послідовностей відносно генів розширює можливості створення в процесі еволюції нових регуляторних зв'язків шляхом перетасовування регуляторних елементів. У такому разі еволюція регуляторних елементів еукаріот може бути заснована на мінливості мозаїчно-обмеженої кількості регуляторних нуклеотидних мотивів.

Рибосомні гени (р-гени).

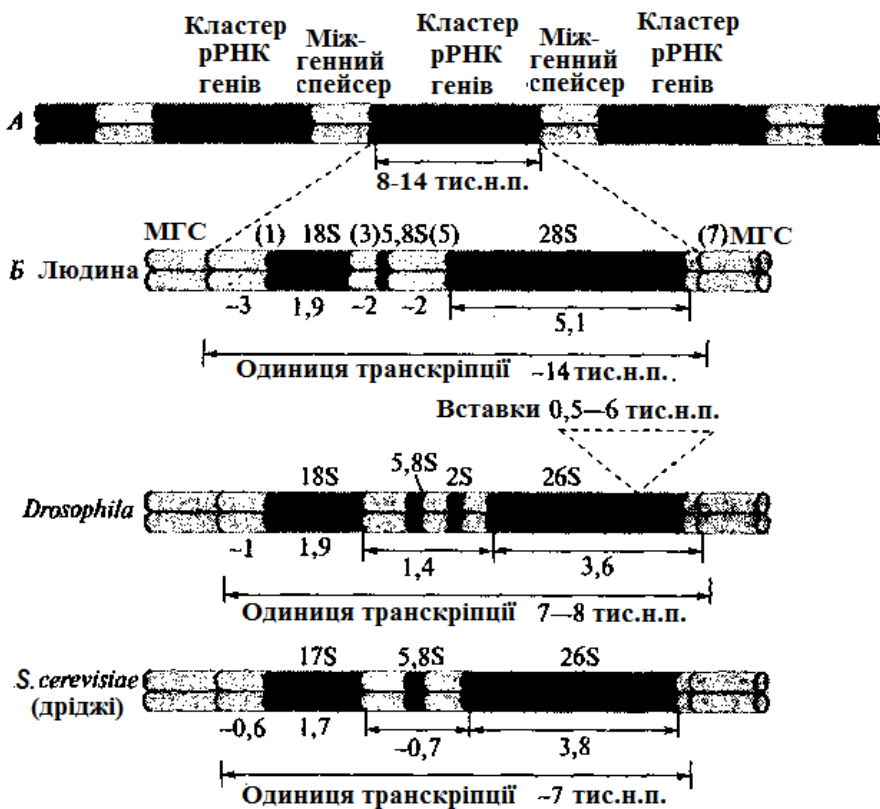


Рис. 4.7. Організація кластерів р-генів еукаріот:

А — кожен кластер р-генів завдовжки від 8 до 14 тис. н.п., відокремлений від інших кластерів міжгенними спейсерами (МГС);

Б — кластер р-генів (одиниця транскрипції) людини, дрозофіли, дріжджів, які складається з послідовностей, що кодують 18S, 5,8S і 28S рРНК, а також спейсерів, які транскрибуються: 5' зовнішнього (1); 5' внутрішнього (3); 3' внутрішнього (5); 3' зовнішнього (7); ген 26S рРНК дрозофіли містить вставку завдовжки 0,5 — 6 тис. н.п.

Число генів, кодуючих рРНК (р-гени, рДНК), коливається від сотень до декількох тисяч залежно від виду еукаріот. Оскільки транскрипт р-гена

дає тільки одну копію кінцевого продукту (5,8S, 18S і 28S рРНК), попит на рРНК часто задовольняється за рахунок величезної кількості генів. Гени знаходяться в одній або в декількох хромосомах (у людини близько 200 р-генів, розташованих в 13, 14, 15, 21 і 22-й хромосомах) у ділянках з характерною морфологією – ядерцевих організаторах. Гени рРНК практично усіх еукаріот побудовані у вигляді довгих повторів типу «голова до хвоста». На електронних мікрофотографіях фрагмента ДНК ядерець у момент транскрипції видно декілька кластерів генів рРНК. Як правило, кодуючі області генів 18S, 5,8S і 28S рРНК згруповані у вказаному порядку в одну одиницю транскрипції (кластер). Кожен кластер р-генів завдовжки від 7 до 14 тис. н.п. (залежно від виду) відокремлений від інших кластерів міжгенним спейсером, довжина якого у різних видів сильно розрізняється, але в межах

одного виду відносно постійна.

Одиниця транскрипції починається від місця з'єднання міжгенного спейсера і 5'-ЗТС (зовнішній сегмент, який транскрибується). Вона прямує у бік гена 18S рРНК і закінчується в різних сайтах міжгенного спейсера за послідовністю, яка кодує 28S рРНК.

Кодуючі області р-генів у різних видів є консервативними. У різних видів довжина і нуклеотидні послідовності міжгенних спейсерів дуже сильно розрізняються. Загальною особливістю останніх є те, що вони зазвичай містять прямі тандемні повтори, схожі з тими, які оточують сайти початку транскрипції, тобто сигнальні послідовності для РНК-полімерази I. Різне число актів кросинговеру, які відбуваються між повторювальними тандемними одиницями в міжгенному спейсері, призводить до відмінностей в числі самих цих одиниць, а також в числі повнорозмірних р-генів. Таким чином, міжгенні спейсери еволюціонують разом з р-геном, в який вони входять, так і незалежно від нього. В результаті кросинговеру загальна довжина одиниць повторювальних р-генів, варіює від одного спорідненого виду до іншого і навіть в межах одного виду (рис. 4.7).

Одиниця транскрипції р-генів в ДНК людини має розмір близько 14 тис.н.п., наближаючись до найдовших з відомих. Приблизно половина ділянок р-генів *Drosophila*, що кодують 26S рРНК, мають вставки різних розмірів; вони не є інтронами, і кластери з такими вставками не транскрибуються. Після завершення транскрипції про-рРНК розщеплюється під дією ендонулеази на три зрілі молекули рРНК : 5,8S, 18S і 28S.

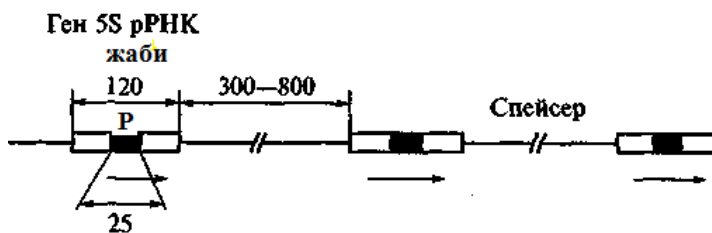


Рис. 4.8. Гени 5S рРНК. Промотор P розташовується усередині гена (25 н.п.)

Гени 5S рРНК представлені сотнями і навіть тисячами повторювальних тандемних копій, розділених спейсерами, які не транскрибуються (рис. 4.8). Вони зібрані в одному або декількох місцях генома і, як правило, зчеплені з генами 18S, 5,8S і 28S рРНК. Ген 5S рРНК, довжина якого складає 120 нуклеотидів, не переривається ніякими інтронами. У гаплоїдному геномі дрозофіли 160 копій генів 5S рРНК, у людини — 2000 (локалізація в 1-ій хромосомі). Промотор розташовується усередині кодуючої послідовності (з 55 по 80 н.п.). Сигналом термінації транскрипції буде послідовність з декількох наступних один за одним тимідилових нуклеотидів. Новоутворена 5S рРНК не піддається модифікації і процесінгу.

Гени тРНК. Гени різних тРНК (у еукаріотичних клітинах налічується 40-60 (100) основних типів тРНК), часто згруповані в кластери, розташовані в різних хромосомах. У людини на гаплоїдний геном приходить 1300 генів тРНК (по 10 — 20 копій для кожної тРНК). Характер організації генів тРНК у складі блоків сильно варіює у різних організмів. Розташування генів тРНК в кластерах не так системно, як у разі рибосомних генів: напрям транскрипції довколишніх генів буває протилежним, а гени можуть бути розділені проміжками, які включають 100-150, або декілька тисяч нуклеотидних пар. Природа і функції ділянок ДНК, які розділяють гени тРНК, не з'ясовані.

Промотор гена тРНК розташовується усередині кодуючої послідовності і має дві області (А- і В-бокси), необхідні для правильної і ефективної транскрипції. А-бoks локалізований в області від +10 до +20 н.п., а В-бoks — між парами основ +50 і +65. Канонічні послідовності А— і В-боксів мають вигляд: 5'— TGGC^NNAGTGG — 3' і 5'— GGTCGANNC — 3'(N — будь-який нуклеотид). Бокси А і В такого «розщепленого промотора» співпадають з ділянками гена, які відповідають найбільш консервативним ділянкам молекули тРНК в дигідроуридилової і псевдоуридилової петлях. Вони містять найбільшу кількість інваріантних нуклеотидів. Для активної транскрипції потрібно збереження відстані між А— і В-боксами, яке складає близько 50 н.п. (рис. 4.9).

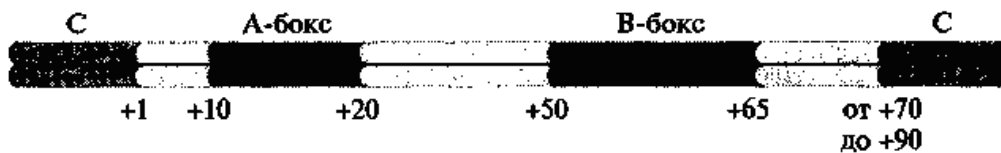


Рис.4.9. Структура гена тРНК. Промотор розташовується усередині гена (А- і В-бокси). (+1) — сайт ініціації транскрипції; С-спейсери, які не транскрибуються.

У генах тРНК багатьох організмів є один інтрон розміром від 14 до 60 н.п.(залежно від виду тРНК). Він завжди локалізується в одному і тому ж місці у різних тРНК: через один нуклеотид від 3'-кінця антикодону. Інтрон розщеплюється в результаті процесінгу.

Гістонові гени. Первинна структура гістонів у різних еукаріот консервативна, оскільки гістони відіграють ключову роль в підтримці структури хроматину. Частота повторення гістонових генів в геномі різних організмів змінювалася в ході еволюції без помітного зв'язку з ускладненням організмів (таблиця. 4.2).

Таблиця 4.2. Частоти повторення гістонових генів у еукаріот.

| Організм | Число генів у гаплоїдному геномі |
|---------------|----------------------------------|
| Дріжджі | 2 |
| Дрозофіла | 110 |
| Морський їжак | 470 |
| Тритон | 700 |
| Курка | 10 |
| Миша | 10-20 |
| Людина | 40 |

Гени різних гістонів зчеплені. Усі вони транскрибуються окремо, часто з протилежних ланцюгів ДНК. У геномі гістонові гени розподілені неоднаково. У одних видів вони утворюють тандемні повтори, у птахів і ссавців розсіяні по усьому геному. Більшість гістонових генів позбавлена інтронів, а у мРНК відсутні 3' - полі(А)-кінці.

Таким чином, гени у еукаріот представлені або безліччю схожих копій, або обмеженим набором дуплікованих і дивергуючих у різної ступені послідовностей. Ті та інші носять назву «Мультигенні родини». Повторюваність генів в мультигенних родинях необхідна або для посилення дози генів, або для забезпечення синтезу різних варіантів споріднених поліпептидів. Дозова повторюваність характерна для генів, що кодують РНК рибосом, тРНК, а також гістонових генів. Саме множинність генів, обслуговуючих апарат трансляції, забезпечує фізіологічну реактивність клітини, оскільки темп білкового синтезу часто лімітується кількістю рибосом і тРНК.

Варіантна повторюваність властива таким генам, як глобінові, актинові, імуноглобулінові, хоріоновим і та іншим. Число генів в цих мультигенних родинях, як правило, невелике, а міра гомології окремих його членів варіює в широких межах. Члени мультигенних родин походять, мабуть, від однієї загальної предкової послідовності шляхом дуплікації і подальшій дивергенції.

Мультигенні родини відрізняються одна від іншої мірою складності організації. Найбільш прості мультигенні сімейства утворюють гени, які кодують рРНК. Складніше влаштовані гени для гістонів і тРНК, і найбільш складна будова характерна для регуляторних мультигенних родин, контролюючих ключові стадії розвитку організмів.

Сучасний стан теорії гена. В результаті досліджень елементарних одиниць спадковості склалася система уявлень, які сформуvalи загальну теорію гена. Основні положення:

1. Ген – структурно-функціональна та інформаційна ділянка молекули ДНК з певною організацією та послідовністю нуклеотидів, яка визначає ознаку на молекулярному рівні (РНК або поліпептид).
2. Гени мають різний нуклеотидний склад та кількість нуклеотидів, кожен ген має функціональні та структурні ділянки.

3. Гени, локалізовані в хромосомі, займають в ній певне місце (локус). Ген може існувати в різних варіантах – алельні гени, які визначають альтернативні ознаки.
4. Гени змінюються внаслідок рекомбінацій та мутацій, які забезпечують мінливість.
5. Гени знаходяться під контролем систем репарації ДНК, яка зменшує частоту мутацій.
6. У хромосомах є гени мРНК (кодуєть білки), гени рРНК та гени тРНК та інші, які мають свої особливості організації.
7. В хромосомах є регуляторні гени, які утворюють фактори регуляції (РНК або білки) інших структурних генів.
8. Ген є «матрицею» для синтезу посередників – різних молекул РНК, які безпосередньо беруть участь в синтезі білків або мають інші властивості.
9. Передача генів та хромосом наступним клітинним поколінням відбувається за рахунок процесу реплікації та мітозу і мейозу.
10. Структурний ген, як правило, кодує синтез одної РНК і поліпептиду, але можливий альтернативний процесінг та сплайсінг, що збільшує кількість варіантів РНК (поліпептидів).
11. В живих біосистемах (клітини, тканини, організм) працює система взаємодіючих генів локалізованих в хромосомах – генотип, який визначає розвиток і формування фенотипу. Більшість ознак і властивостей визначаються полігенно.
12. При експресії генів в ознаку можливий плейотропний прояв гену – вплив на розвиток декількох ознак (н., при серпоподібноклітинній анемії, синдромах Марфана, Хартнупа).
13. Кількість копій та активність генів визначає інтенсивність прояву ознаки (неповне домінування, експресивність). Багато ознак в гетерозиготному стані проявляються слабше, ніж в гомозиготному.
14. Активність генів знаходиться під контролем різноманітних факторів, що забезпечує адаптацію.
15. Конституційні гени – це активні гени, які постійно синтезують РНК або поліпептиди, оскільки їх продукти необхідні для функціонування клітини («гени домашнього господарства»). Це гени рибосом, цитохромів, ферментів гліколізу, переносників іонів, рРНК, тРНК і інших, без яких клітина не зможе існувати. Неконституційні гени – неактивні, але активуються при необхідності, що регулюється клітиною або організмом. Їхні продукти (РНК або білки) забезпечують диференціювання, специфічність структури і функції кожної клітини. Генотип, будучи дискретним (складається з окремих генів) функціонує як єдине ціле.

Експресія генів

Механізми генної експресії. Поняття про експресію генів. Сучасний стан центральної догми молекулярної генетики. Властивості генетичного коду. Етапи біосинтезу білка. Ферментативні механізми і етапи транскрипції. Процесинг первинних транскриптів. Альтернативний процесінг, РНК-редакціювання. Активація амінокислот. Молекулярна організація рибосом. Ініціація, елонгація і термінація синтезу поліпептидного ланцюга. Посттрансляційна модифікація білків.

Генна експресія - це складний молекулярний механізм реалізації спадкової інформації в конкретну фенотипову ознаку.

Процес експресії гена включає такі етапи:

1. Транскрипція – складний біологічний процес реакцій матричного синтезу, який забезпечує передачу інформації з послідовності нуклеотидів ДНК на послідовність нуклеотидів РНК.
2. Процесинг – процес дозрівання зрілої іРНК (або тРНК). Про-іРНК зазнає модифікації та сплайсінгу, що забезпечує стабільність іРНК та здатність до поєднання з рибосомами.

3. Трансляція - складний біологічний процес реакцій матричного синтезу, який забезпечує передачу інформації з послідовності нуклеотидів РНК на послідовність амінокислот в поліпептидах.

4. Фолдінг та модифікація поліпептидів в клітині (в цитоплазмі та вакуолярній системі), які приводять до структурної організації білків та набуттю ними функціональної активності.

5. Експресія в ознаку. Утворений білок виконує свою функцію, яка на морфологічному рівні визначає конкретну ознаку (ген) або фенотип (при взаємодії з іншими генами).

Всі етапи експресії генів відбуваються з використанням енергії під впливом десятків ферментів. Основою експресії генів є молекулярні процеси транскрипції, процесінгу, трансляції і модифікації.

Генетичний код. Ще на початку 50-х років ХХ ст. Г.Гамов запропонував, що генетичний код є триплетним: три сусідніх нуклеотида в полінуклеотидному ланцюзі програмує включення однієї амінокислоти в поліпептидний ланцюг білку. В середині 60-х років ХХ ст. в серії оригінальних експериментів (Ф.Крік, С.Бренер, Г.Вітман і інші дослідники) було встановлено, що код є *триплетним* і *безперервним*. Повна розшифровка генетичного коду, проведена М.Ніренбергом, С.Очоа і Н.Г.Корана з використанням безклітинних систем, була завершена в 1966 р.

Відповідно до коду при використанні кополімера полі(UC)_n в якості матриці в цих системах утворювався поліпептид, побудований із залишків серину і лейцину, а полі(UG)_n служив матрицею для синтезу кополімера із залишками Val і Cys, які чергуються. Ця робота показала, що 61 з 64 можливих комбінацій трьох нуклеотидів чотирьох типів (4x4x4) кодують одну з двадцяти протеїногенних амінокислот. Інші три кодони — UAA, UGA і UAG — не кодують жодну з канонічних амінокислот. Ці кодони є сигналами зупинки (термінації) трансляції і тому називаються *стоп-кодонами*, або *кодонами-термінаторами*. Термінальні кодони не завжди однозначно розпізнаються системою трансляції і тому у складі мРНК вони нерідко дублюються. Першим (основним) стоп-кодоном зазвичай є кодон UAA, а на невеликій відстані слідом за ним розташовується один з інших термінуючих триплетів (UGA або UAG). Слід також враховувати, що при синтезі ряду білків кодон UGA використовується для включення у білок амінокислотного залишку селеноцистеїна. При синтезі білку триплети нуклеотидів мРНК (кодони) трансклюються у відповідні ним амінокислоти. Наприклад, кодони AUG і GUG детермінують включення у білок метіоніну і валіну відповідно.

Оскільки число кодуючих триплетів (61) в три рази більше числа протеїногенних амінокислот, генетичний код *вироджений*, тому багато амінокислот кодуються двома і більше кодонами. Тільки дві амінокислоти (Met і Trp) кодуються одним кодоном (AUG і UGG відповідно) і тому зустрічаються у білках рідше за інші.

Виродженість генетичного коду полягає в тому, що для кожної амінокислоти існує більше однієї тРНК, і одна тРНК може взаємодіяти більш ніж з одним кодоном мРНК. У трьохлітерному генетичному коді найбільш важливі перші дві, тоді як третя літера часто буває різною. Так, наприклад, гліцин кодується чотирма *синонімічними кодонами*: GGA, GGC, GGG і GGU, У зв'язку з переважаючою роллю перших двох букв кодонів (вважаючи з 5'-кінця триплета мРНК) генетичний код іноді називають *квазидуплетним*. Ця особливість коду дозволяє використати меншу кількість тРНК: для взаємодії з 61 кодоном досить 31 тРНК в цитоплазмі і всього 22 тРНК у білоксинтезуючій системі мітохондрій тварин.

Генетичний код майже завжди *універсальний*, тобто єдиний для всіх організмів, які живуть на Землі, - від бактерій до людини. Невеликі відмінності є, проте, в генетичному коді мітохондрій і хлоропластів. Немає ніяких даних про те, що коли-небудь існували організми з іншим кодом або іншими амінокислотами. Генетичний код ретельно зберігається в еволюції і зміни в коді, а також в рибосомальному апараті клітин слід визнати сильно загальмованими.

Генетичний код - система розташування нуклеотидів в ДНК (або РНК), яка визначає послідовність нуклеотидів РНК і амінокислот у поліпептидах.

| Перша основа | Друга основа | | | | Третя основа |
|--------------|--------------|-------|-------|-------|--------------|
| | У (А)* | Ц (Г) | А (Т) | Г (Ц) | |
| У (А)* | Фен | Сер | Тир | Цис | У (А)* |
| | Фен | Сер | Тир | Цис | Ц (Г) |
| | Лей | Сер | — | — | А (Т) |
| | Лей | Сер | — | Три | Г (Ц) |
| Ц (Г) | Лей | Про | Гіс | Арг | У (А) |
| | Лей | Про | Гіс | Арг | Ц (Г) |
| | Лей | Про | Глн | Арг | А (Т) |
| | Лей | Про | Глн | Арг | Г (Ц) |
| А (Т) | Іле | Тре | Асн | Сер | У (А) |
| | Іле | Тре | Асн | Сер | Ц (Г) |
| | Іле | Тре | Ліз | Арг | А (Т) |
| | Мет | Тре | Ліз | Арг | Г (Ц) |
| Г (Ц) | Вал | Ала | Асп | Глі | У (А) |
| | Вал | Ала | Асп | Глі | Ц (Г) |
| | Вал | Ала | Глу | Глі | А (Т) |
| | Вал | Ала | Глу | Глі | Г (Ц) |

*В дужках - кодони ДНК, перші нуклеотиди – кодони іРНК.

Транскрипція.

Транскрипція - перша стадія реалізації генетичної інформації, процес «переписування» послідовності ДНК в односторонню молекулу комплементарної РНК. В результаті транскрипції утворюються мРНК, які кодують амінокислотні послідовності білків, а також тРНК, рРНК і інші види РНК, що виконують структурні, регуляторні і каталітичні функції. У основі транскрипції лежить *принцип комплементарності* азотистих основ полінуклеотидних ланцюгів ДНК і РНК, а сам процес здійснюється за участю ферментів — РНК-полімераз, і великої групи білків — регуляторів транскрипції.

Досконало вивчені етапи і механізми регуляції транскрипції прокаріотичних геномів, проте деталі транскрипції у еукаріот відомі не повністю. В той же час в загальній системі контролю реалізації генетичної інформації контроль на рівні транскрипції є найбільш важливим етапом, відповідальним за диференціальну активність генів в онтогенезі будь-якого організму, і складність організації цього контролю, зрештою раз підтверджує фундаментальне значення транскрипції в реалізації програми життя.

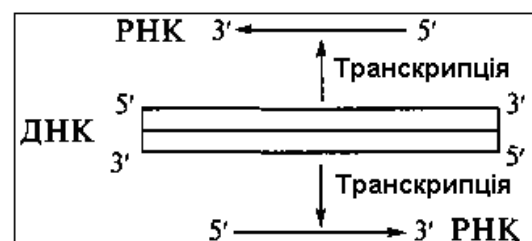
Оскільки ДНК у переважній більшості організмів являють собою дволанцюгові молекули, складені з комплементарних і антипаралельних не ідентичних ланцюгів, транскрипції піддається зазвичай один з них, який називають *матричним* (матрицею):

ДНК 5' - ATGATTGGGGCTCTA - 3' змістовний ланцюг
 3' - TACTAACCCCGAGAT - 5' матричний ланцюг

↓ *Транскрипція*

РНК AUGAUUGGGGCUCUA

Різні РНК зазвичай транскрибуються на одному з ланцюгів дуплексного генома, проте у деяких геномів (як у бактеріофага Т4) матрицею можуть служити різні ланцюги ДНК. У разі перекривних генів матрицями для молекул РНК, які транскрибуються в протилежних напрямках, служать обидва ланцюги ДНК в одній і тій же ділянці молекули, як це має місце у бактеріофага χ .



Синтез РНК на матриці ДНК ведуть ДНК-залежні-РНК-полімерази, які відносяться до групи нуклеотидилтрансфераз і які використовують нуклеозид-5'-трифосфати. РНК-полімерази активні тільки у присутності іонів Mg^{2+} , для зв'язування яких в молекулі існує консенсусна амінокислотна послідовність з 10 амінокислотних залишків. РНК-полімерази на відміну від ДНК-полімераз не потребують праймера і використовують рибонуклеозид-5'-трифосфати (АТР, ГТР, СТР, УТР). Зростання ланцюга РНК відбувається шляхом послідовного приєднання рибонуклеозид-5'-монофосфатів до 3'-гідроксильної групи рибози попереднього нуклеотиду (тобто у напрямі 5'→3'). Послідовність нуклеотидів в синтезованому РНК-транскрипті визначається комплементарними азотистими основами матричного ланцюга ДНК (рис. 4.9). Різні види РНК у еукаріот синтезуються різними РНК-полімеразами, тоді як у бактерій усі види РНК синтезує один фермент.

У всіх без виключення організмів процес транскрипції відбувається тільки на певних ділянках — *транскриптонах*. Вони обмежені двома послідовностями - *промотором* (зона початку транскрипції) і *термінатором* (зона зупинки транскрипції). Транскриптони бактерій називають *оперонами*. Оперони включають нуклеотидні послідовності - цистрони, або *структурні гени*, які кодують структуру декількох білків. мРНК синтезована на оперонах *поліцистронна* і синтезує декілька білків, на відміну від *моноцистронних* мРНК вищих організмів, які служать матрицями для синтезу одного білка.

Послідовність нуклеотидів в синтезованій молекулі РНК визначається нуклеотидною послідовністю матричного ланцюга ДНК. Транскрипція відбувається за принципом компліментарності. Субстратами для синтезу служать рибонуклеозидтрифосфати. До 3'-кінця зростаючого ланцюга РНК приєднується нуклеозидмонофосфат, а звільнений пірофосфат гідролізується на дві молекули неорганічного фосфату, що робить реакцію енергетично вигідною і безповоротною. Самі білки-регулятори транскрипції набувають або втрачають функціональну активність в результаті модифікацій каталітично активними білками-ферментами, або речовинами небілкової природи, які модулюють їх регуляторні властивості. У примітивних формах життя в регуляції транскрипції безпосередньо беруть участь різні клітинні метаболіти (вуглеводи, амінокислоти, нуклеотиди та ін.). У еукаріот транскрипція безпосередньо пов'язана зі змінами структури хроматину. Перехід хроматину в активну форму (здатну до транскрипції) є додатковим елементом регуляції транскрипції у вищих організмів.

Транскрипція у прокаріот.

Бактеріальні РНК-полімерази — складні білки, що мають декілька субодиниць. Найбільш вивчений з них фермент *E.coli* містить п'ять постійно присутніх протомерів: дві субодиниці α і по одній β , β' (конститутивні субодиниці, що становлять основу ферменту — кор). Після приєднання до кору ще однієї субодиниці — σ -фактора, утворюється холофермент РНК-полімераза, здатний впізнавати промоторну ділянку в оперонах бактерій та ініціювати процес транскрипції. Молекулярні маси α -, β -, β' - і ω -субодиниці складають відповідно 36,5; 150; 155 і 70-80 кДа, а холофермента — 487 кДа (рис. 4.10.).

По нуклеотидній послідовності генів реконструйована повна амінокислотна послідовність кожної субодиниці РНК-полімерази *E.coli*. Методом футпринтинга встановлено, що при взаємодії з ДНК фермент «закриває» 60 пар нуклеотидів. β -субодиниця бере участь у зв'язуванні рибонуклеозидтрифосфатів і побудові полінуклеотидного ланцюга РНК, β' -субодиниця здійснює зв'язування ДНК, а комплекс α - і β' -субодиниць ($\alpha_2\beta'$) служить для специфічної взаємодії з промоторами. Функції ω -субодиниці не встановлені. Впізнавання промоторів відбувається тільки після приєднання до кор-ферменту δ -фактора. Після ініціації

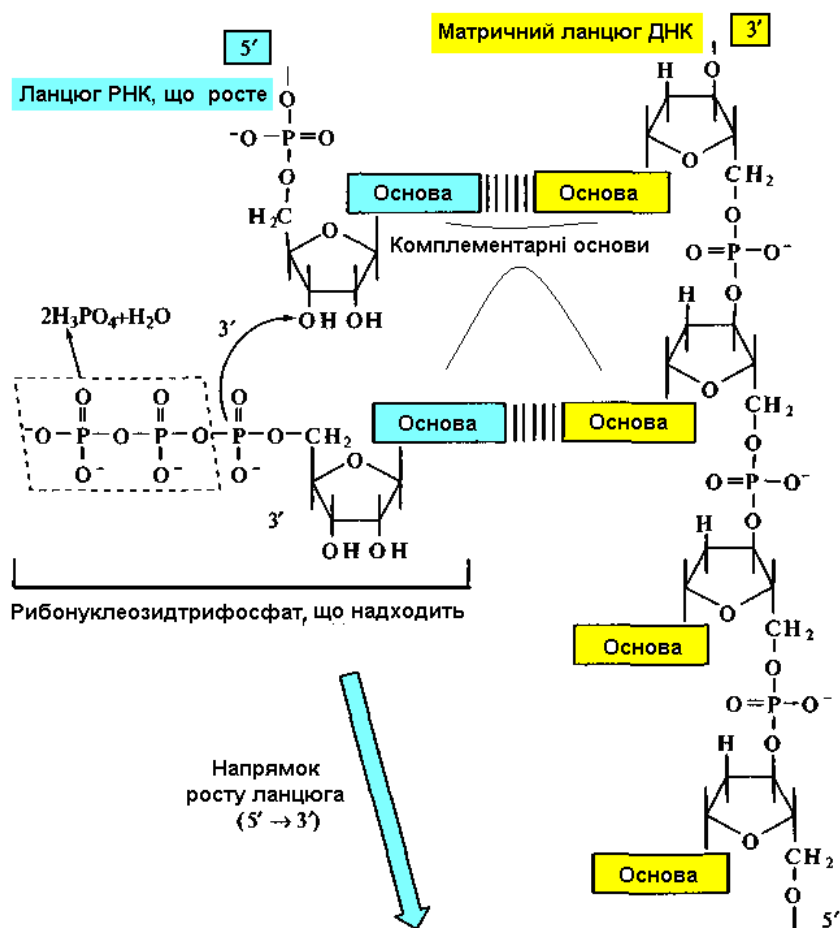


Рис. 4.10. Синтез РНК на матричному ланцюзі ДНК.

Синтез РНК вимагає локального розплітання дволанцюгової молекули ДНК з тим, щоб РНК-полімераза отримала доступ до азотистих основ матриці. Наявні дані говорять про те, що РНК-полімераза розкручує дволанцюгову молекулу ДНК за допомогою особливого ДНК-розкручуючого сайту, вступаючи у взаємодію з матрицею завдяки наявності в її структурі «цинкових пальців» (рис. 4.12). Рухаючись уздовж подвійної спіралі ДНК, РНК-полімераза безперервно розкручує спіраль попереду тієї ділянки, де відбувається синтез РНК і де на короткий час утворюється так званий відкритий комплекс, усередині якого виникає РНК-ДНК-спіраль завдовжки близько 20 нуклеотидів. Потім фермент (за допомогою спеціального сайту) знову закручує ДНК позаду ділянки полімеризації РНК, і готова частина РНК-транскрипту виводиться з комплексу через особливий канал РНК-полімерази (рис. 4.11).

Швидкість синтезу РНК у бактерій складає - 30 нуклеотидів в 1 с, проте вона не постійна і може знижуватися. Такі періоди носять назву пауз транскрипції. Для ефективного продовження транскрипції необхідне від'єднання від РНК-полімерази δ -фактора, який заміщується чинником елонгації (одним з цих чинників є білок NusA E.coli).

Ініціація транскрипції відбувається в зоні промотора — особливої нуклеотидної послідовності ДНК, яка містить сигнал початку транскрипції (старт-сигнал). У області старт-сигналу розташовуються дві консенсусні послідовності, виявлені у багатьох промоторів E.coli: послідовність 5'-TATATT-3' (на відстані 10 нуклеотидів від точки початку транскрипції), послідовність 5'-TTGACA-3' (віддалена від точки початку транскрипції на 35 нуклеотидів).

Для транскрипції важлива орієнтація промотора: саме вона визначає той ланцюг ДНК, який буде матрицею для синтезу РНК. На консенсусні послідовності (бокси), можливо, і орієнтується холофермент РНК-полімераза, здійснюючи пошук точки початку транскрипції.

Послідовність 5'-TATATT-3' називається також ТАТА— боксом, або Прібнов-боксом —

синтезу РНК δ -субодиниця відділяється від холоферменту і подальша транскрипція (елонгація ланцюга РНК) здійснюється кор-ферментом. Тут слід зауважити, що таке складне структурно-функціональне облаштування РНК-полімераз бактерій (і ще складніша організація РНК-полімераз еукаріот, у складі яких міститься від 12 до 18 різних субодиниць) доки не має виразного пояснення, оскільки відомо, що РНК-полімерази деяких бактеріофагів цілком компетентні в синтезі РНК, незважаючи на те що складаються всього лише з одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою не більше 100 кДа.

на честь її відкривача. У ділянці ТАТА-боксу відбувається відкриття промотора (локальне плавлення відносно неміцно пов'язаних між собою двома водневими зв'язками комплементарних пар А=Т в дуплексі ДНК, що і призводить до утворення відкритого комплексу (рис. 4.11) і ініціації транскрипції).

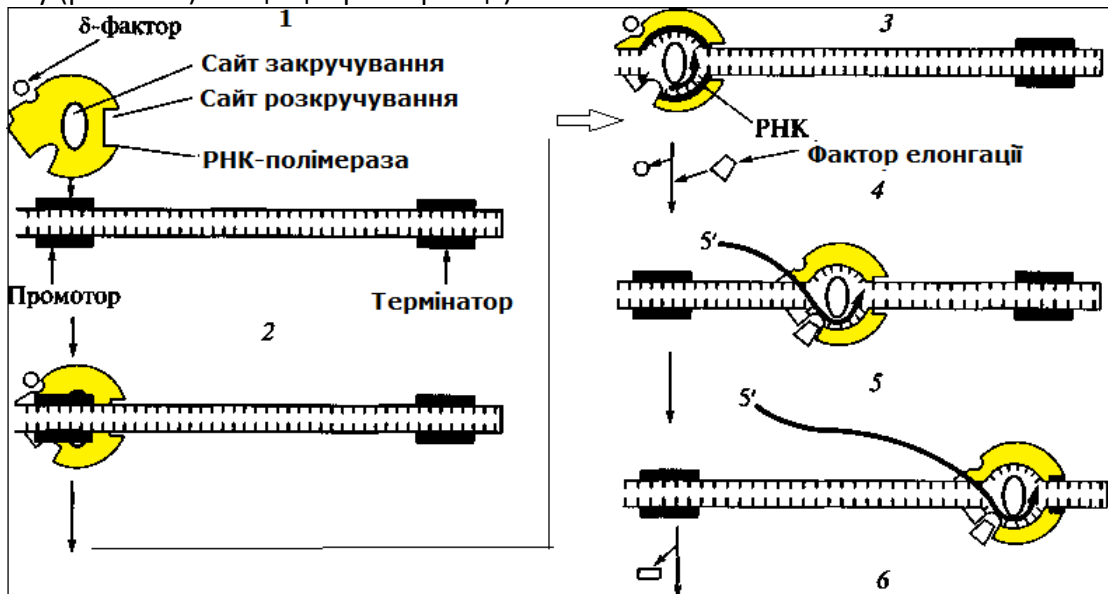


Рис. 4.11. Схема транскрипції, що каталізується РНК-полімеразою *E.coli*: 1 - здійснення пошуку промотора РНК-полімеразою після приєднання δ -фактора (чинник ініціації); 2 - утворення закритого паромоторного комплексу: РНК-полімераза зв'язується з промотором ДНК; 3 — утворення відкритого комплексу: РНК-полімераза розкручує подвійну спіраль ДНК, дістає доступ до азотистих основ матричного ланцюга і починає синтез РНК (стадія ініціації); 4— від'єднання δ -чинника і приєднання чинника елонгації створюють умови для елонгації транскрипції: РНК-полімераза просувається по ДНК, розкручуючи її подвійну спіраль, синтезує РНК і знову закручує спіраль ДНК позаду місця синтезу РНК; 5 — термінація синтезу РНК: РНК-полімераза досягає зони термінатора, де синтез РНК припиняється; 6 — вивільнення РНК-транскрипту (копії ланцюга ДНК).

Термінація транскрипції також визначається особливою нуклеотидної послідовністю в ДНК, яка розташована в зоні термінатора бактерійних оперонів і називається стоп-сигналом. У стоп-сигналі є GC-ділянка, що має центральну симетрію і самокомплементарну нуклеотидну послідовність. За цією ділянкою на матричному ланцюзі розташована оліго(А)-послідовність (4-8 аденілових нуклеотидів). Транскрипція в області GC-багатого сайту призводить до того, що в РНК-транскрипті швидко утворюється стійкий елемент вторинної структури — шпилька (спіралізована ділянка, що містить комплементарні GC-пари), яка порушує міцність гібридизації ДНК : РНК у відкритому комплексі і витісняє РНК-полімеразу з комплексу. Окрім цього транскрипція оліго(А)-послідовності в матричному ланцюзі веде до утворення ділянки РНК : ДНК дуплекса, складеного з неміцних (легкоплавких) А : U-пар, що також сприяє руйнуванню контакту між ланцюгом ДНК, який зчитується, і молекулою РНК. Таким чином, відразу після утворення шпильки відбувається звільнення синтезованою РНК, від'єднання РНК-полімерази і відновлення дволанцюгової структури ДНК, причому вирішальним моментом в цьому процесі є утворення термінальної шпильки у складі РНК.

Частина термінаторів пізнається РНК-полімеразою тільки за допомогою білкового чинника термінації — ро-чинника. Цей білок з молекулярною масою 46 кДа утворює гексамер (6-46 кДа), здатний зв'язуватися з ділянкою термінатора. Встановлено, що він приєднується до РНК-продукту безпосередньо перед термінатором. Ро-чинник має НТРазну активність, і каталізована ним реакція гідролізу нуклеозидтрифосфатів (НТР) веде до вивільнення енергії, яка впливає на його конформацію. Зміна конформації ро-чинника, ймовірно, сприяє витісненню РНК або РНК-полімерази з комплексу транскрипції.

Транскрипція у еукаріот.

РНК-полімерази еукаріот вивчені значно менше, ніж відповідні ферменти бактерій. Синтез РНК у еукаріот здійснюють три різні ферменти: РНК-полімерази I, II і III, структура яких вивчена далеко не повністю. Спочатку еукаріотичні РНК-полімерази були ідентифіковані на основі їх чутливості до аманітину — високотоксичному антибіотику, що міститься у блідій поганці. Пізніше було встановлено, що РНК-полімераза I (не чутлива до аманітину) синтезує великі (28S і 18S) рибосомальні РНК, РНК-полімераза II (найбільш чутлива до аманітину) транскрибує гени, що кодують білки, а також гени малих ядерних РНК, а РНК-полімераза III відповідає за синтез 5S рРНК і тРНК.

РНК-полімерази I, II і III дріжджів мають три ідентичні по молекулярній масі субодиниці (27, 23 і 14,5 кДа). Дріжджові РНК-полімерази I і II містять також дві інші однакові по масі субодиниці (14 і 40 кДа). Інші відомі субодиниці у усіх трьох РНК-полімераз дріжджів помітно розрізняються за молекулярною масою: 135 і 190 кДа — у РНК-полімерази I; 146, 150, 220 і 445 кДа — у РНК-полімерази II; 82, 128 і 160 кДа — у РНК-полімерази III.

Жодна з РНК-полімераз еукаріот не здатна самостійно зв'язуватися з промоторами генів, які транскрибує. Для приєднання до транскриптора еукаріот служать специфічні для кожної РНК-полімерази білкові чинники транскрипції (TF-чинники): РНК-полімерази I, II і III вимагають участі факторів транскрипції - TFI, TFII і TFIII відповідно. Велика латинська буква, яка зазвичай йде за римською цифрою, означає, яким за рахунком був виявлений цей чинник, наприклад, першим був виділений чинник транскрипції гена 5S рРНК, який транскрибується РНК-полімеразою III — TFIIIA.

Різні чинники транскрипції приєднуються до ДНК в різних місцях відносно точки початку транскрипції. Так, чинники TFIID і TFIIID зв'язуються з ДНК і утворюють комплекси з РНК-полімеразою перед сайтом початку транскрипції, а чинник TFIIC — відразу після відповідного сайту. Чинник TFIIID, необхідний для багатьох промоторів РНК-полімерази II, називають ще ТАТА-чинником, оскільки він зв'язується з ТАТА-боксом, розташованим за 25 н.п. до сайту початку транскрипції.

Незважаючи на те, що вивчення білкових чинників транскрипції еукаріот ще далеко не закінчене, виявлені деякі особливості структури цих білків, здатних забезпечувати специфічні взаємодії їх амінокислотних послідовностей з азотистими основами ДНК. У цих білках зазвичай є два домени, один з яких відповідає за зв'язування ДНК, а другий — за регуляцію транскрипції. Наприклад, у білку GAL 4, що регулює транскрипцію в дріжджових клітинах,

функцію зв'язування ДНК і активацію транскрипції виконують різні домени. Цей білок-активатор включає транскрипцію будь-яких генів, які беруть участь в метаболізмі галактози. Білок GAL 4 сполучається з певною послідовністю в ДНК завдовжки в 17 н.п. одним доменом своєї молекули, в якому 73 амінокислотних залишків, тоді як інша частина молекули (довжиною 900 амінокислотних залишків) не приєднується до ДНК. У доменах зв'язування ДНК знайдені характерні структурні елементи: спіраль-петля-спіраль, уперше детально охарактеризовані у Cro-білку і χ -репресору бактеріофага χ .

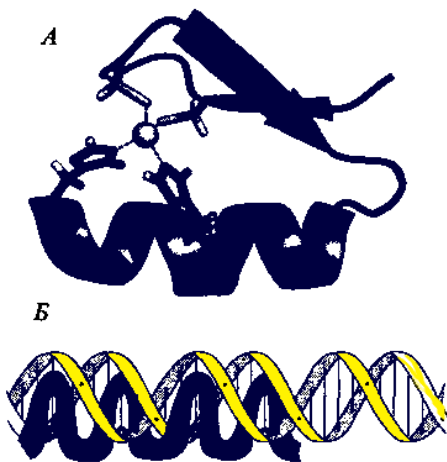


Рис. 4.12. «Цинкові пальці» — елементи надвторинної структури в ДНК-зв'язуючих білках, які беруть участь в регуляції транскрипції: А — цинковий палець типу Cys2His2 включає α -спіраль і антипаралельну β -структуру. Іон цинку пов'язаний координаційними зв'язками з двома залишками гістидину і двома залишками цистеїну; Б — схема взаємодії чотирьох «цинкових пальців» з великим жолобом молекули ДНК. Кожен «палець» впізнає певну послідовність з п'яти нуклеотидних пар.

Для зв'язування з ДНК білкові чинники транскрипції нерідко використовують «цинкові пальці» (рис. 4.12). Ці елементи структури виявлені у чинника TFIIIA, у білка GAL 4 дріжджів, чиннику SP1 ссавців і в рецепторах стероїдних гормонів.

Відомі декілька типів цинкових пальців, які відрізняються числом і локалізацією залишків цистеїну і гістидину, пов'язаних з атомом цинку, а цей елемент є відмінною ознакою білків, здатних зв'язуватися з ДНК.

Багато чинників транскрипції містять особливий структурний елемент — «лейцинову блискавку», що складається з двох частин. Цей елемент включає протяжні α -спіралі, збагачені залишками лейцину, розташованими по одну сторону спіралі, а також домен, який містить багато позитивно заряджених амінокислотних залишків. Білкові чинники транскрипції, які містять «лейцинові блискавки», взаємодіють з ДНК у вигляді димерів (рис. 4.13). Безпосередній контакт з ДНК в цих димерах здійснюють домени, в яких багато позитивно заряджених амінокислотних залишків, а ділянки з великим вмістом лейцину служать для стабілізації структури димера за рахунок взаємодії з гідрофобними залишками відповідних α -спіралей. Різноманітність білкових чинників транскрипції у еукаріот пов'язана з різноманітністю регуляторних послідовностей, властивим генам вищих організмів. До їх числа окрім ТАТА-боксів відносяться *енхансери*, *сайленсори* і адапторні елементи.

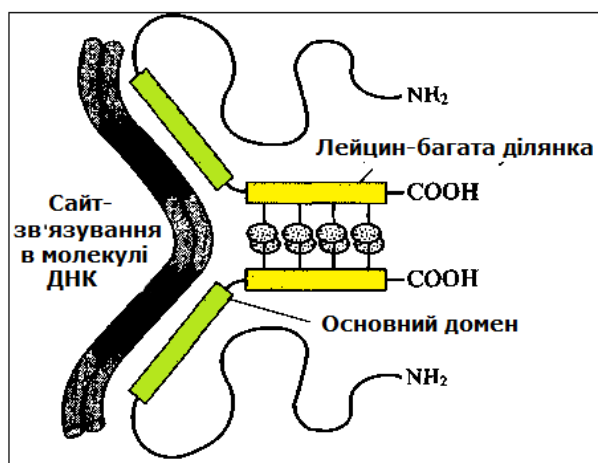
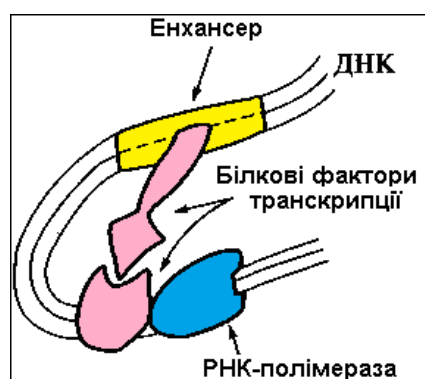


Рис. 4.13. Схема взаємодії димерної молекули чинника транскрипції, який містить «лейцинові блискавки», з молекулою ДНК (М. Сингер, П. Берг, 1998). Димерна структура чинника транскрипції стабілізується за рахунок гідрофобних взаємодій, які мають великий вміст лейцину, ділянок двох поліпептидних ланцюгів. Основні домени білкового димера чинника транскрипції зв'язуються з відповідним негативно зарядженим сайтом в молекулі ДНК.

Ці елементи можуть бути віддалені на значні відстані від точки початку транскрипції, і їх дія на транскрипцію здійснюється через відповідні регуляторні білки. Ймовірно, вплив цих елементів на транскрипцію пов'язаний зі

зміню топології ланцюгів ДНК, зокрема з утворенням петель, що наближає регуляторні послідовності до промоторів, з якими вони взаємодіють за допомогою білкових чинників (рис. 4.14).



Дія енхансерів має неспецифічний характер, оскільки вони здатні посилювати транскрипцію з будь-яких доступних промоторів. Можливо, що енхансери тканинноспецифічні.

Рис. 4.14. Зміна топології ланцюгів ДНК, під дією енхансера на РНК-полімеразу через білкові чинники транскрипції.

Так, енхансери панкреатичних ферментів в генно-інженерних конструкціях посилюють транскрипцію сторонніх генів у клітинах підшлункової залози у трансгенних тварин. Сайленсори виявлені у дріжджів *S. cerevisiae*. Вони якимсь чином блокують транскрипцію генів, які мають усі необхідні для транскрипції регуляторні елементи. Дія сайленсорів опосередковується білками груп SIR (silent information regulator), які здатні окуповувати великі ділянки ДНК і тим самим закривати доступ білкам, здатним ініціювати транскрипцію. При цьому репресуються усі гени, розташовані на відстані декількох тисяч нуклеотидних пар від сайленсора.

Процесинг РНК.

Первинні РНК-транскрипти, які утворюються в результаті транскрипції, не завжди є функціонально активними молекулами РНК. Перш ніж стати активними вони повинні зазнати ряд модифікацій і перетворитися на зрілі РНК. Цей процес посттранскрипційної модифікації первинних транскриптів (РНК-попередників) називається процесингом і відбувається досить специфічно у різних видів РНК про- і еукаріот.

У зв'язку з відмінностями реалізації генетичної інформації у прокаріот і еукаріот, процесинг у прокаріот обмежений, тоді як у еукаріот він є складно організованим процесом, який безпосередньо впливає на регуляцію експресії генетичного матеріалу в диференційованих клітинах вищих організмів. Найдетальніше вивчений процесинг мРНК еукаріот, який включає три головні моменти: сплайсинг, кепірування 5'-кінця і поліаденілування 3'-кінця первинних транскриптів. Сплайсинг (від англ. splice - сполучати кінці) полягає у вирізанні з про-мРНК некодуючих ділянок - інтронів і зшивання кодуєчих ділянок - екзонів. Розрізняють декілька різних механізмів сплайсингу.

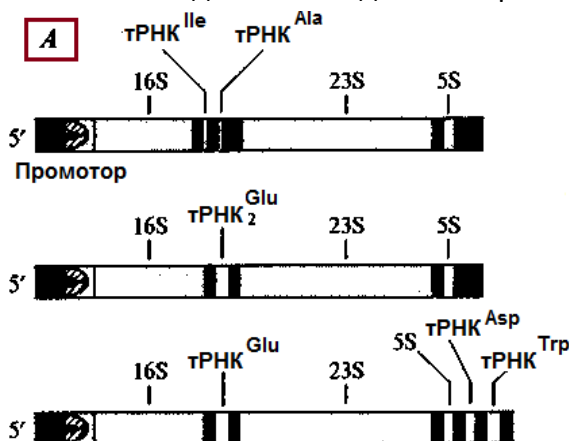
Кепірування - це утворенням на 5'-кінці мРНК особливої структури - кепа (шапочки). Кепірування відбувається незабаром після початку синтезу мРНК і здійснюється за участю GTP, із складу якого GMP переноситься на 5'-дифосфат першого нуклеотиду мРНК.

Поліаденілування здійснюється ферментом полі (А)-полімеразою і призводить до утворення на 3'-кінці оліго(А)-фрагменту, який містить 100-200 залишків аденілової кислоти - "полі(А)- хвіст". Полі(А) - хвіст визначає стабільність мРНК і час її життя в клітині. Крім того, у еукаріот полі(А)- хвіст можливо сприяє виходу мРНК з ядра в цитоплазму, а також є важливим для регуляції трансляції мРНК.

Процесинг у прокаріот.

Процесинг у прокаріот в основному зачіпає попередників рРНК і тРНК, тоді як поліцистронні мРНК використовуються для трансляції відразу після їх синтезу на відповідних оперонах бактерій і навіть ще до закінчення транскрипції, так що біосинтез білку безпосередньо зв'язаний з транскрипцією. Раніше вважали, що поліаденілування властиве тільки мРНК еукаріот. Встановлено, що полі(А)-хвости є і у мРНК прокаріот, але вони коротші, ніж у мРНК еукаріот (14-60 залишків аденілової кислоти) і є не у всіх молекул мРНК. На відміну від еукаріот поліаденілування дестабілізує структуру деяких мРНК бактерій.

Процесинг у бактерій потрібний для утворення зрілих рРНК і тРНК. Первинний транскрипт цих РНК, утворюється на оперонах, що включають гени 16S рРНК, 23S рРНК, 5S рРНК і тРНК (рис.4.15). Первинні транскрипти таких оперонів мають довжину ~5000 нуклеотидів і містять вставні послідовності (спенсери), необхідні для процесингу. Утворення рРНК відбувається за участю ендонуклеаз, що розрізають первинні транскрипти в спейсерах. Так, РНКаза III впізнає і розщепляє дволанцюгові ділянки (дуплекси), утворені спейсерами і стебла петель (шпильок), що утворюються в структурі РНК-попередників. У петлях цих шпильок знаходяться послідовності зрілих молекул 16S рРНК (~1600 н.) і 23S рРНК (~2 900 н.).



Інший фермент - РНКаза М5, ідентифікований у *Bacillus subtilis*, відщепляє від первинного транскрипту 5S рРНК. Про-тРНК після первинного ендонуклеотичного розщеплення піддаються подальшому процесингу за участю двох ферментів: ендонуклеази Р і екзонуклеази D (Рис. 4.16).

Рис. 4.15. Процесинг рРНК у прокаріот (М. Сингер, П. Берг, 1998): А - схема типових одиниць транскрипції рРНК *E.coli*. Між кодуєчими ділянками для 16S, 23S і 5S рРНК і тРНК розташовані спейсерні послідовності.

При цьому про-тРНК, що містить більше 100 нуклеотидних залишків, стає коротшою з обох кінців до стандартного розміру (70-90 нуклеотидів). З 5'-кінця на про-тРНК діє ендонуклеаза Р, а із 3'-кінця - екзонуклеаза D. Цікаво, що молекула ендонуклеази Р (РНКази Р) сама містить у своєму складі РНК завдовжки до 400 нуклеотидів, яка має основну каталітичну активність, а білкова частина цієї нуклеази (маса 17 000) тільки посилює РНКазну активність. Ферменти цього типу виявлені як у бактерій, так і у еукаріот. У *E. coli* довжина РНК у складі РНКази Р досягає 377 нуклеотидів, у дріжджів - 250 нуклеотидів, а у людини - 100 нуклеотидів.

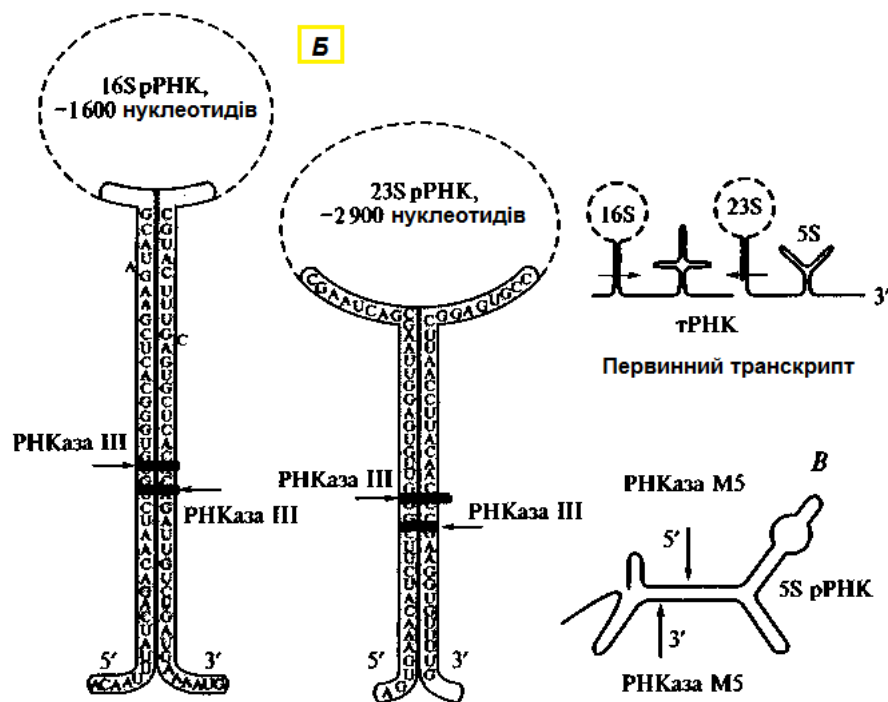


Рис. 4.16. Б - спейсерні послідовності, які розташовані в про-рРНК, утворюють черешки (стебла), які розщеплюються РНКазою III; В - РНКаза М5 відщеплює від первинного транскрипту 5S РНК.

Методами генетичної інженерії отриманий цілком активний в процесингу тРНК гібридний фермент, що містить РНК-компонент РНКази Р, виділену з *E. coli*, і білкову частину - з відповідного ферменту людини. Ендонуклеазна дія РНКази Р полягає у відщепленні 41 нуклеотиду від 5'-кінцевої (лідерної) послідовності

попередника і відразу призводить до формування 5'-кінця тРНК, представленого фосфорильованим гуанозином (5'-pG).

Екзонуклеаза D відщепляє послідовно декілька нуклеотидів з 3'-кінця молекули-попередника і зупиняється на аденозині, який знаходиться поряд з двома цитидиловими нуклеотидами, і таким чином формується 3'-кінець (акцепторне стебло) тРНК, що містить стандартну послідовність ССА-ОН. Одночасно з процесингом рРНК і тРНК здійснюється модифікування ряду азотистих основ, що приводить до утворення характерних для тРНК дигідроурацила (UH2), псевдоуридина ('F) і тиміна (T). Ферменти, які здійснюють ці модифікації, не охарактеризовані. Такі модифікації називають редагуванням РНК.

Процесинг тРНК і рРНК у еукаріот.

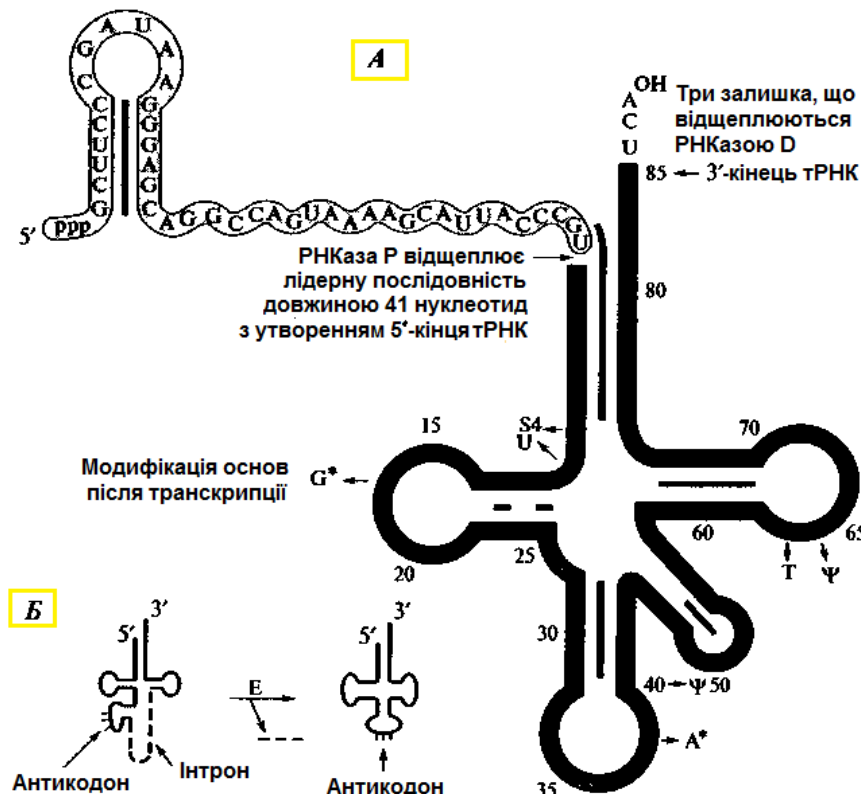
Процесинг у еукаріот зачіпає усі види первинних транскриптів еукаріотних генів. Продукти транскрипції (про-тРНК), містять інтрон поблизу антикодону. Вирізування цього інтрону і лігування (зшивання) іншої частини молекули-попередника призводить до утворення зрілої тРНК (рис. 4.17).

Необхідні для цього процесу нуклеаза, лігаза і кіназа реакції здійснюються одним поліфункціональним ферментом. Процесинг рРНК вищих організмів здійснюється в ядрах клітин на базі молекул-попередників, що транскрибуються з повторювальних генів, які містяться в ДНК у вигляді тандемних копій (кластерів).

У ссавців в одному первинному транскрипті з коефіцієнтом седиментації 45S (-13000 н.), знаходяться нуклеотидні послідовності 18S (-2000 н.), 28S (-5000 н.) і 5,8S (- 160 н.) рРНК, які розділяються спейсерними послідовностями. Ендонуклеазне розщеплення цього попередника веде до утворення зрілих рРНК (рис. 4.18) і відбувається за участю малих

ядерних РНК (мя РНК).

5S рРНК людини (довжина 120 н.п.) кодується і транскрибується окремо від інших РНК



з великої кількості генів (≈ 2000). Синтез усіх рРНК (окрім 5S рРНК) відбувається в ядерцях з дуже високою швидкістю. Тандемні гени рРНК транскрибуються синхронно і їх транскрипти під електронним мікроскопом мають вигляд структур типу "ялиночок" (рис. 4.19). Одночасна транскрипція генів рРНК і процесинг загального транскрипту призводять до синхронного утворення пропорційних кількостей усіх рРНК, необхідних для зборки рибосом.

Рис. 4.17. Процесинг тРНК:

А - процесинг тРНК з молекули-про-тРНК^{Ty2} *E. coli* (М. Сингер, П. Берг, 1998); Б - видалення інтрону з попередника тРНК у еукаріот;

Е - поліфункціональний фермент, що має кіназу, лігазу і фосфодіестеразу активність. Зірочками позначені модифіковані основи, U⁵⁴ - тиоурацил.

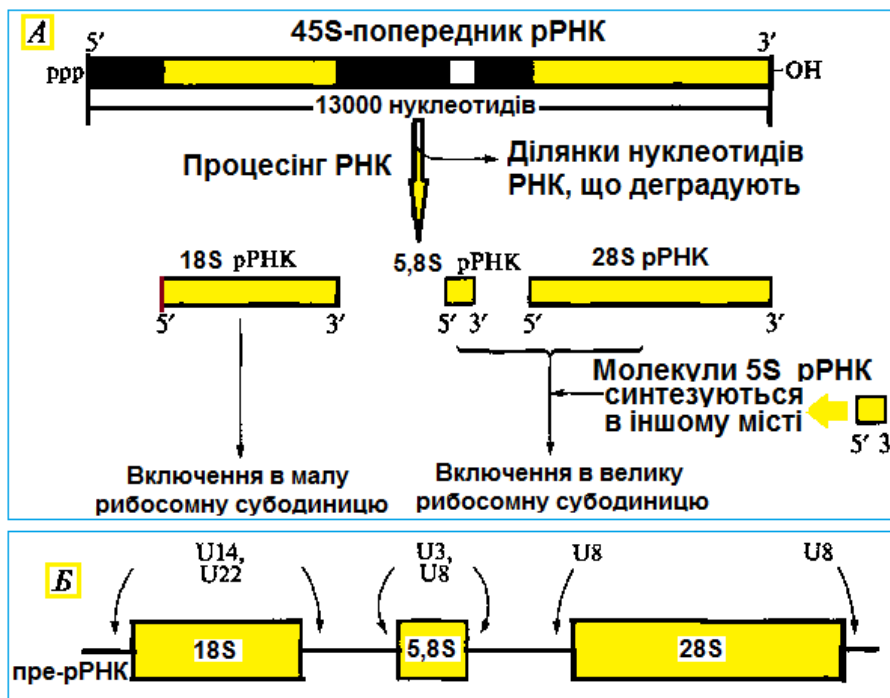


Рис. 4.18. Процесинг рРНК у еукаріот:

А - процесинг 45S-попередника рРНК (спейсерні послідовності темні); Б - взаємодія різних U-РНК з ділянками спейсерних послідовностей в молекулі-про-рРНК.

У ряду видів примітивних еукаріот (*Tetrahymena thermophila*, *Physarum polycephalum* та ін.) гени рРНК містять особливі інтрони (інтрони групи 1), для яких характерний унікальний механізм сплайсингу. Такі інтрони

зустрічаються також в генах рРНК мітохондрій, хлоропластів, дріжджів і грибів, проте не виявлені в генах хребтних тварин. Т.Чеком і співробітники вивчали процесинг 26S рРНК тетрагімени (аналог 28S рРНК вищих еукаріот) і відкрили особливий вид сплайсингу - аутосплайсингу (сплайсинг типу I), який відбувається без участі білків.

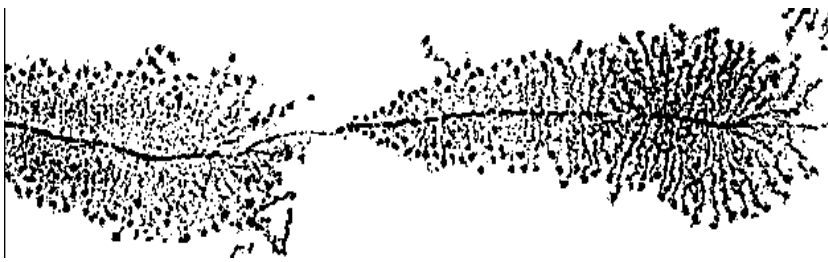


Рис. 4.19. Електронна мікрофотографія РНК-транскриптів, синтезованих на тандемних розташованих в ДНК генах рРНК (Б. Алберте та ін., 1994). На 5'-кінцях молекул РНК, що подовжуються видно частки - субодиниці рибосом.

Виявилось, що усередині 26S рРНК тетрахімени міститься інтрон (≈ 400 н.) здатний самовирізатися і зшивати екзони у присутності Mg^{2+} і вільного гуанозина (або його фосфорильованих похідних). Таким чином була відкрита аутокаталітична функція РНК і покладений початок вивченню РНК-ферментів - рибозимів. Схема аутосплайсинга рРНК представлена на рис. 4.20. Інтрон 26S рРНК тетрахімени-IVS, складається з 413 нуклеотидів. Аутосплайсинг індукується гуанозином, гідроксильна група якого атакує фосфатну групу на 5'-кінці інтрону, внаслідок чого розривається фосфодієфірний зв'язок і вивільняється 3'-кінець екзона 1. Потім гідроксильна група на 3'-кінці екзона 1, атакує фосфатну групу на 3'-кінці інтрону, це веде до вирізання інтрону і утворенню фосфо-дієфірного зв'язку між ОН-групою 3'-кінця екзона 1 і 5'-фосфатною групою екзона 2.

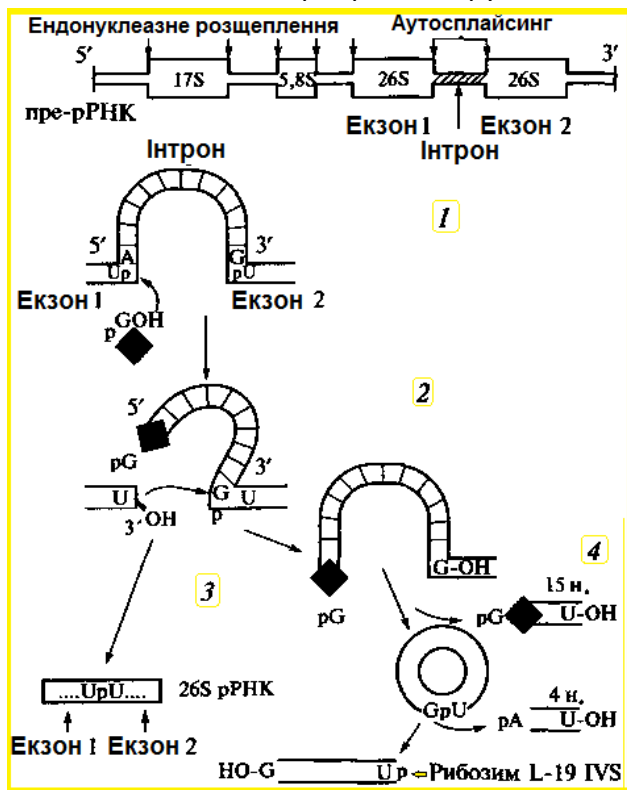


Рис. 4.20. Схема аутосплайсинга 26S рРНК у тетрахімени і процес утворення рибозиму. У верхній частині - структура попередника рРНК. У послідовності 26S рРНК є інтрон: 1 - гуанозин атакує 5'-кінець інтрону, внаслідок чого відбувається розрив міжнуклеотидного зв'язку і вивільнення 5'-кінця інтрону; 2 - гідроксильна група 3'-кінця екзона 1 атакує фосфодієфірний зв'язок на 3'-кінці, що веде до вирізання інтрону; 3 - замикання фосфодієфірного зв'язку між ОН-групою 3'-кінця екзона 1 і 5'-фосфатною групою екзона 2 призводить до зшивання екзонів і утворенню зрілої 26S рРНК; 4 - двоетапне аутокаталітичне вирізання 19 нуклеотидів інтрону утворює рибозим (L - 19IVS).

Таким чином, в результаті реакції без додаткових витрат енергії здійснюється лігування двох екзонів з утворенням зрілої 26S рРНК. Вирізаний інтрон потім циклізується. З його складу шляхом двоетапного ауторозщеплення звільняється фрагмент з 19 нуклеотидів, внаслідок чого утворюється РНК з 376 нуклеотидів (L - 19IVS), яка є РНК-ферментом (рибозимом). Цей рибозим має стійку структуру, ендонуклеазну активність (розщепляє довгі одноланцюгові РНК) і специфічність (розпізнає і атакує тетрануклеотиди CUCU). Рибозим L-19IVS також має *in vitro* полімеразну активність і здатний каталізувати синтез олігонуклеотидів (оліго-С). Це вказує на можливість аутокаталітичної реплікації РНК і є важливих доказом існування «світу РНК».

У структурі інтронів типу I виявлені характерні внутрішні олігопуринові послідовності (GGAGGG) - адапторні послідовності, які беруть участь в утворенні активного центру РНК-ферментів і виконують найважливішу роль в каталітичному розщепленні РНК.

Детальні дослідження природних РНК-ферментів стимулювали моделювання і синтез рибозимів заданої будови. Ці роботи дозволили встановити, що каталітичну активність мають не лише великі РНК (400 н. у тетрахімени і РНКазі Р), але і короткі 13-20-членні олігонуклеотиди, які можуть бути синтезовані *in vitro*. Такі рибозими стали називати

мінізимами. Одна з досліджуваних моделей функціонування таких рибозимів дістала назву «Голівка молотка». Третинна структура «голівки молотка» стабілізується іонами двовалентних металів, які нейтралізують негативно заряджені атоми кисню фосфодиефірних зв'язків і одночасно сполучають фосфатні групи ковалентними зв'язками, що важливо для утворення стабільного перехідного стану (фермент-субстратний комплекс). Як і ферменти-білки, рибозими і субстрат (молекули РНК) утворюють фермент-субстратний комплекс, а потім - фермент-продуктний комплекс. Спеціально сконструйовані рибозими, що містять необхідну для каталізу адаптерну послідовність, здатні, зокрема, розщепляти РНК ВІЛ 1 в області гена gag, що відкриває можливість створення антивірусних препаратів принципово нового типу.

На жаль, в організмі людини синтетичні рибозими швидко розщеплюються під дією РНКаз. Для стабілізації структури рибозимів (захисту від нуклеаз) проводять модифікацію (метилування) азотистих основ або модифікують залишки рибози, отримуючи фторпохідні або амінопохідні нуклеотидів, що більш ніж в 1 000 разів підвищує стійкість рибозимів в організмі. Інший шлях захисту каталітично активних олігонуклеотидів від нуклеаз полягає в синтезі невластивих природі химерних молекул нуклеозимів, у складі яких разом з рибонуклеотидами присутні дезоксирибонуклеотиди.

Роботи з рибозимами йдуть шляхом пошуку і селекції *in vitro* таких РНК-каталізаторів, які не лише могли б прискорювати деструкцію РНК, але і мали б здатність зшивати (лігувати) молекули РНК або їх фрагменти. У цьому напрямі останніми роками досягнуті вражаючі успіхи: отримані РНК-лігази, здатні здійснювати реакції внутрішньомолекулярного і міжмолекулярного лігування. РНК-лігази різної будови підрозділяють на декілька класів, одні з яких здатні каталізувати утворення 3'- 5'- фосфодиефірних зв'язків (лігази класу 1), а інші - 2'- 5'- фосфодиефірних зв'язків. Усі ці ферменти отримують шляхом транскрипції, відбору (селекції) і ампліфікації спеціально сконструйованих молекул ДНК. Ці молекули ДНК мають центральну ділянку завдовжки - 200 нуклеотидів, розташованих випадковим (хаотичним) чином, і служать для синтезу *in vitro* набору (пулу) різних по структурі РНК, серед яких проводиться відбір рибозимів.

Процесинг мРНК у еукаріот.

Посттранскрипційні модифікації про-мРНК особливо важливі для еукаріот, що пов'язано з мозаїчною будовою їх генів, які містять некодуючі послідовності - інтрони. Чисельність інтронів в генах еукаріот може досягати декількох десятків, що диктує необхідність існування чіткої системи сплайсингу первинних транскриптів. У сплайсингу про-мРНК у вищих еукаріот задіяний ряд білків, а також - малі ядерні РНК (мяРНК). Малі ядерні РНК мають послідовності від 65 до 1000 і більше нуклеотидів (10S-90S), багатих уридиловими нуклеотидами, і тому називаються *u*РНК (U1, U2 і так далі). У дріжджів виявлене 25 різних мяРНК, у хребетних тварин - 15. У жаби *Xenopus laevis* ряд мяРНК (U3, U8, U14 і U22) беруть участь в процесингу рибосомальних РНК, зв'язуючись з кінцевими ділянками спейсерів. Малі ядерні РНК виявлені не лише у хребетних тварин і дріжджів, а також у комах і архібактерій. Нуклеотидна послідовність усіх іРНК еукаріот співпадає більш ніж на 90%, що також відноситься до U1 людини і дрозофіли. Високий консерватизм структури іРНК говорить про те, що сплайсинг дуже давній процес, який почався з аутосплайсинга і трансформувался в сплайсинг за участю мяРНК. Гени мяРНК транскрибуються РНК-полімеразою II і мають різну локалізацію в геномі: частина з них є дискретними незалежними генами, які не мають інтронів, тоді як гени інших мяРНК розташовуються усередині інтронів генів, що кодують білки.

Так, у *Xenopus* U13 кодується трьома унікальними послідовностями, які знаходяться в інтронах 5, 6 і 8 генів білків теплового шоку, а ген U16 знаходиться усередині інтрону рибосомального білка L1. Це доводить, що процесинг рРНК і процесинг мРНК білків рибосом

може бути скоординований мяРНК. Припускають, що мяРНК також здатні служити РНК-шаперонами, беручи участь у фолдингу рРНК - прийнятті необхідної просторової структури.

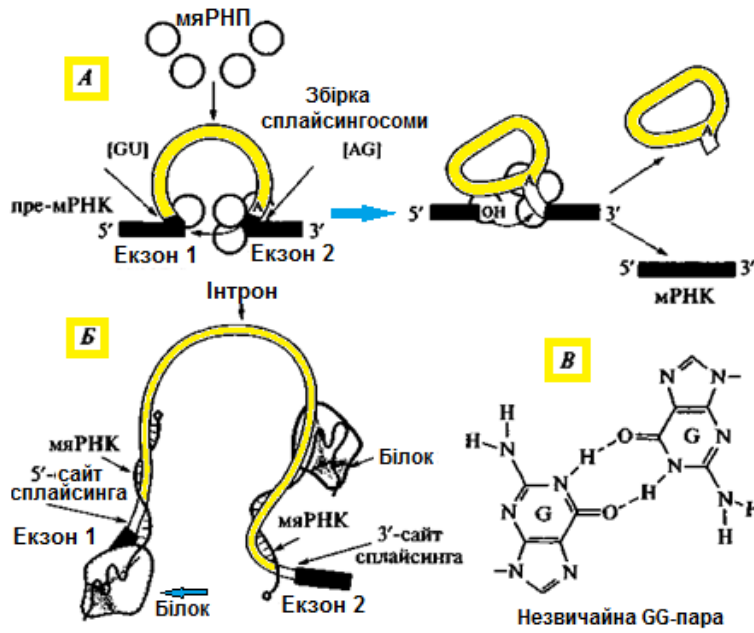


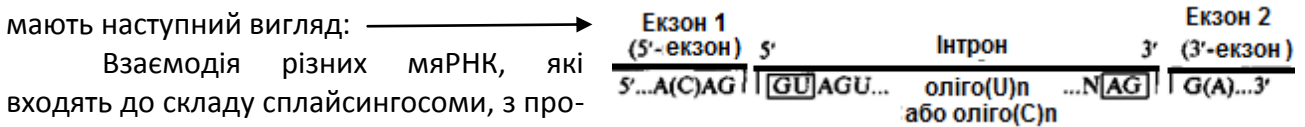
Рис. 4.19. Сплайсинг попередника мРНК за участю мяРНК:

А - етапи сплайсингу за участю сплайсингосом. О - позначені окремі мяРНК; GU і AG - консенсусні пари нуклеотидів інтрону, які розташовані в 5'- і 3'-сайті сплайсингу; Б - схема взаємодії комплементарної мяРНК, що входить до складу мяРНК, з ділянкою інтрону; В - незвичайна G=G-взаємодія, яка зближує 5'- і 3'-кінці інтрону.

Малі ядерні РНК присутні в ядрах в комплексах з білками дістали назву малі рибонуклеопротеїнові частки (мяРНК). Стабільним компонентом мяРНК є фібриларин - білок консервативний по структурі (мол.

маса 34 кДа), локалізований в ядерцях. Комплекс, який складається з безлічі мяРНК та каталізує сплайсинг ядерних про-мРНК, називають сплайсингосомами. Сплайсингосома збирається на інтроні перед його видаленням і містить декілька різних мяРНК. У ссавців мяРНК сплайсингосом завжди містять РНК U1, U2, U4, U5 і U6. Сплайсингосоми - еліпсоподібні частки (25 x 50 нм, мають коефіцієнт седиментації 50-60S. Малі ядерні РНК збираються в сплайсингосомі в певній послідовності.

Різні мяРНК комплементарно зв'язуються з межуючими ділянками інтронів в РНК, що піддаються сплайсингу (рис. 4.21.). Для цієї взаємодії необхідні короткі консенсусні послідовності інтронів: GU - на 5'-кінці і AG - на 3'-кінці. Точкові мутації в цих послідовностях ведуть до порушення сплайсингу і припинення синтезу відповідних білків. Подібні мутації в генах глобіну людини ведуть до анемії. Консенсусні послідовності 5'- і 3'-сайтів сплайсингу мають наступний вигляд:



Взаємодія різних мяРНК, які входять до складу сплайсингосом, з про-мРНК, що піддаються сплайсингу 5'- і 3'-сайтах надає інтрону петлеподібну структуру. При цьому зближуються кінці екзонів, чому сприяє утворення неканонічних (відмінних від уотсон-кріковських пар) водневих зв'язків між двома гуанінами, що містяться в 5'- і 3'-сайтах сплайсингу (рис. 4.21.). Зближення екзонів створює умову для атаки 5'-кінця інтрону аденіновим нуклеотидом, розташованим зблизька 3'-кінця. В результаті розриву фосфодієфірного зв'язку між екзоном 1 і 5'-кінцем інтрону останній взаємодіє з аденіновим нуклеотидом і утворює в інтроні петлю типу "ласо" (рис. 4.19). Далі звільнений 3'-ОН-кінець ексона 1 розрізає 3'-сайт сплайсингу, видаляє інtron і, з'єднуючись з екзоном 2, утворює зрілу молекулу мРНК.

Альтернативний сплайсинг. Декілька інтронів, що містяться в мРНК, можуть зшиватися в різних комбінаціях з утворенням різних матричних послідовностей. Така диференціація шляхів дозрівання мРНК дістала назву альтернативного сплайсинга. Цей сплайсинг був вперше відкритий у аденовірусів, у яких частина кодуючих послідовностей віддаляється подібно до інтронів, а 5'-кеп з'єднується з будь-яким з інших екзонів, і, таким чином, утворюються різні мРНК, які кодують різні білки (рис. 4.22). Цей вид сплайсингу дозволяє невеликій кількості первинних вірусних транскриптів кодувати значну кількість білків, необхідних для існування вірусу.

У еукаріот альтернативний сплайсинг мРНК, які містять велику кількість інтронів, є ефективним способом регуляції активності генів, створює можливість для виникнення ізоформ білків, які можуть істотно розрізнятися в різних клітинах, тканинах і органах багатоклітинних організмів. Альтернативний сплайсинг дозволяє організму синтезувати різні по структурі і властивостям білки на базі одного гена. Такі гени кодують родини споріднених білків, що беруть участь в м'язових скороченнях, формуванні цитоскелету, нервових волокон, молекул імунoglobulinів, пептидних гормонів та ін.

У формуванні альтернативних мРНК можуть бути задіяні три основні механізми. *Перший* полягає в тому, що для утворення різних мРНК можуть використовуватися різні промотори. В цьому випадку утворюються різні по довжині транскрипти з різною кількістю екзонів. Такий механізм сплайсингу виявлений для про-мРНК ланцюга міозину хребетних тварин.

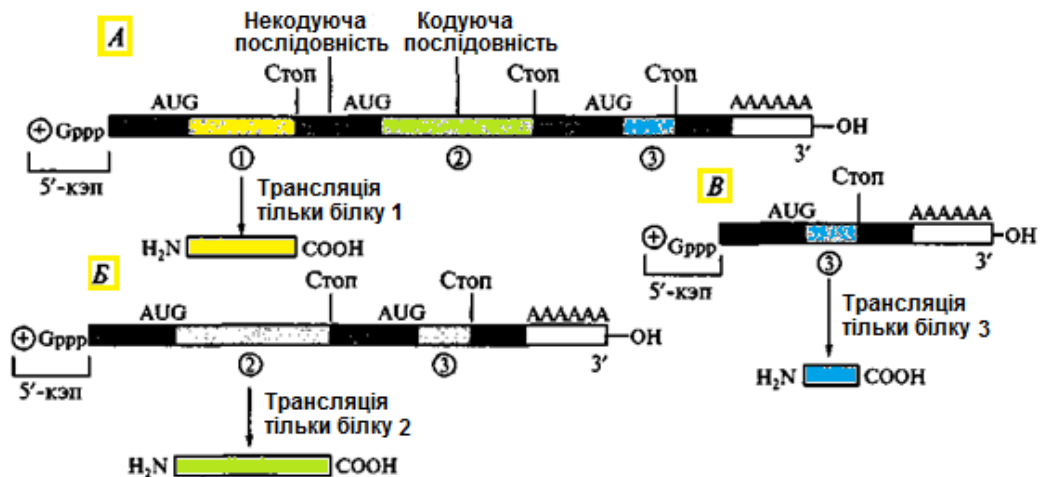


Рис. 4.22.

Три

різні мРНК, які виникають з однієї молекули-попередника аденовірусів (Б. Альбертс та ін., 1994).

Другий тип альтернативного сплайсингу має місце при зміні сайту поліаденілювання первинного транскрипту. В цьому випадку змінюються розміри і структура 3'-кінцевої ділянки про-мРНК (рис.4.23). У такий спосіб утворюються дві мРНК важкого ланцюга імунoglobulinів.

Третій тип альтернативного сплайсингу включає вибір різних екзонів з однакових про-мРНК. При цьому для формування зрілих РНК можуть використовуватися різні екзони, а частина з них не включається в сплайсинг. Таким чином відбувається сплайсинг про-мРНК тропоніна Т скелетних м'язів ссавців, що містить 18 екзонів. При цьому вибір екзонів залежить від стадії розвитку організму: екзон 16 присутній в мРНК тропоніна Т у дорослих, а екзон 17 - в мРНК цього білку у ембріонів. Тонкі механізми вибору сайту сплайсингу ще невідомі. Однією з причин виникнення альтернативних продуктів є мутації, які призводять до руйнування нормальних сайтів сплайсингу і виникненню нових сайтів (рис. 4.24). Такий механізм альтернативного сплайсингу виявлений у хворих таласемією (гемоглобінопатія). Втрата в результаті мутації одного з сайтів сплайсингу не означає відміну сплайсингу в цілому, оскільки інший сайт «шукає» відповідну ділянку і може з'єднатися із скритим сайтом сплайсингу, який раніше не реалізувався, з утворенням нової мРНК. Таким чином, мутації в мозаїчних генах еукаріот можуть стимулювати утворення нових білків, а альтернативний сплайсинг може грати вирішальну роль в еволюції вищих організмів.

Процес дозрівання РНК окрім сплайсинга, кепірування і поліаденілювання включає ще ряд модифікацій первинної структури - редагування РНК. Редагування включає модифікації азотистих основ (дезамінування, метилування, відновлення та ін.), в результаті яких утворюються незвичайні для РНК мінорні основи (інозин, тимін, дегідроурацил та ін.), а також вставки нуклеотидів (частіше уридилових) всередину транскрибованого ланцюга РНК.

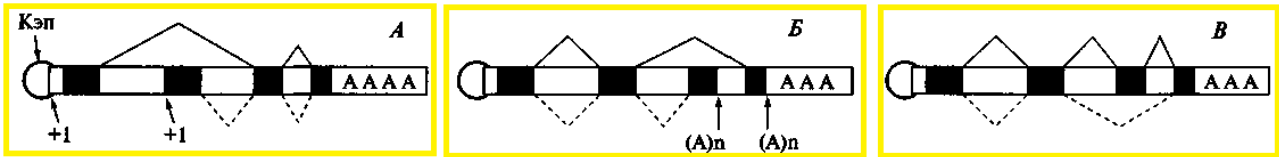


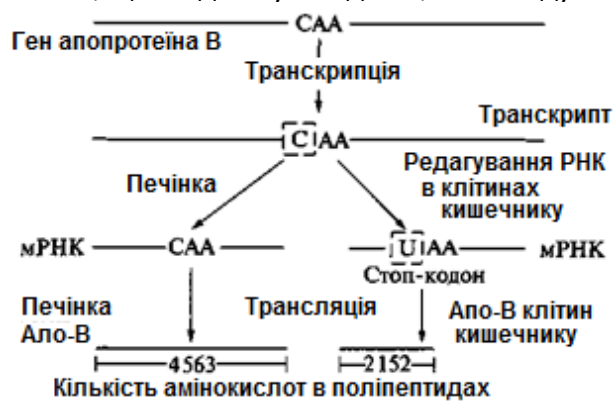
Рис. 4.23. Типи альтернативного сплайсингу про-мРНК: А - альтернативні промотори (тип I); Б - альтернативні сайти поліаденілування (тип II); В - вибір різних екзонів (тип III). Темні ділянки - екзони, світлі - інтрони; суцільними і пунктирними лініями сполучені 5'- і 3'-сайти сплайсингу залежно від того, чи має про-мРНК різні 5'-кінці, різні 3'-кінці або однакові 5'- і 3'-кінці.



Рис. 4.24. Аномальний процесинг мРНК β -глобіна у хворих таласемією: А - первинний транскрипт мРНК нормального β -глобіна (зріла мРНК складається з трьох екзонів); Б - мутація, що призводить до появи нового сайту сплайсингу і подовження ексона 2; В - мутація, що призводить до появи додаткового ексона між екзонами 2 і 3. Сайти мутантів позначені стрілками. Темні ділянки - екзони, світлі - інтрони; заштриховані ділянки - нові послідовності нуклеотидів, які включаються в зрілу мРНК в результаті мутації; лінії сполучають 5'- і 3'-сайти сплайсингу.

Незважаючи на те, що ферментативний апарат редагування мало вивчений. Цей процес може бути дуже важливий для корекції інформаційного значення кодонів мРНК, а отже, і для первинної структури кодованих ними білків. В результаті трансляції таких «відредагованих» РНК в клітині можуть синтезуватися білки, амінокислотна послідовність яких не цілком відповідатиме нуклеотидної послідовності ДНК матриці (гена).

Яскравим прикладом є редагування мРНК апопротеїна В (Апо-В) - ліпопротеїну, який бере участь в транспортуванні жирів з клітин печінки і тонкого кишечника в кров. У печінці в результаті транскрипції утворюється мРНК, яка визначає білок, що складається з 4563 амінокислотних залишків. Аналогічна мРНК в клітинах тонкого кишечника редагується таким чином, що в одному з кодонів, який кодує глютамін (кодон САА), відбувається дезамінування цитозина, він перетворюється на урацил і виникає термінальний кодон UAA. Цей кодон припиняє трансляцію мРНК в середині її молекули, і тому в тонкому кишечнику синтезується укорочений білок з 2152 амінокислотних залишків (рис. 4.25).



У гені апопротеїна показаний триплет (САА) на нематричному ланцюзі ДНК. Транскрипція цього триплету дає мРНК з триплетом [САА]. У печінці мРНК з триплетом САА перекладається в білок з 4563 амінокислотних залишків. У клітинах тонкого кишечника мРНК з триплетом [САА] редагується, і триплет САА перетворюється на триплет UAA. Цей триплет UAA є стоп-кодоном, який припиняє трансляцію мРНК в середині її молекули, і тому в тонкому кишечнику синтезується укорочений білок з 2152 амінокислотних залишків (рис. 4.25).

Рис. 4.25. Редагування мРНК апопротеїну В. У гені апопротеїна показаний триплет (САА) на нематричному ланцюзі ДНК.

Синтезована в ядрах еукаріотичних клітин гетерогенна ядерна РНК (гяРНК) відразу після синтезу зв'язується з білками і утворює гяРНК-частки. До складу гяРНК-часток входить не менше восьми різних білків. Усі ці РНК-зв'язуючі білки містять у своєму складі консервативну послідовність: NH₂..Lys(Arg) - Gly - Phe(Tyr) - Ala(Gly) - Phe(Tyr) - Val - X - Phe(Tyr) COOH. Гетерогенна ядерна РНК є про-мРНК (О.П. Самаріна, Г.П.Георгієв, 1960 р.). Подальші роботи в області вивчення структури гяРНК показали, що високомолекулярні попередники мРНК в ядрах асоційовані з глобулярними білковими частками – інформоферами - носіями інформаційної РНК. На кожен інформофер накручується відрізок РНК завдовжки ~600 нуклеотидів, і утворюється мономерна частина з коефіцієнтом седиментації 30S. При цьому відбувається часткове "плавлення" вторинної структури РНК. Упродовж усього періоду, поки гяРНК знаходиться в ядрі, вона, ймовірно, знаходиться в комплексі з інформоферами. Окремі етапи процесингу, ймовірно, вимагають зміни структури гяРНК. При виході процесированої мРНК з ядра в цитоплазму вона втрачає

зв'язок з інформоферами, зв'язується з іншими білками і присутня в цитоплазмі у вигляді інформосом - цитоплазматичних РНП-часток (О. С. Спірін, 1964 р.). Ця форма існування мРНК має пряме відношення до регуляції трансляції в рибосомальному апараті клітин.

Біосинтез білку.

Біосинтез білку (трансляція) — найважливіший етап реалізації генетичної програми клітин, в процесі якого інформація, закодована в первинній структурі нуклеїнових кислот, трансформується в амінокислотну послідовність білків. Трансляція здійснюється за правилами *генетичного коду*, відбувається за участю спеціалізованих органел — *рибосом*, і в її здійсненні бере участь три головні класи РНК (мРНК, рРНК і тРНК), а також велика група *білкових чинників трансляції*. Особливості молекулярного апарату і механізм трансляції вивчені в основному на бактеріях і бактеріофагах, проте є усі обставини вважати, що основні принципи трансляції реалізуються і в еукаріотичних клітинах, але механізми регуляції білоксинтезуючої системи більш складніші.

Активація амінокислот.

Перед початком трансляції синтезовані в результаті різноманітних біохімічних реакцій або отримані з їжею протейногенні амінокислоти повинні пройти *стадію активації* і приєднатися до тРНК, яка доставляє їх до рибосом. В усіх клітинах є набір тРНК, які служать адаптерами при перекладі нуклеотидних послідовностей мРНК в амінокислотні послідовності білків. У структурі тРНК міститься декілька функціональних ділянок (петель), головними з яких для адаптерної функції є антикодон і акцепторний кінець.

Антикодон служить для взаємодії з комплементарним кодоном мРНК, а акцепторний кінець (розміщений на 3'-кінці тРНК послідовність ССА-ОН) — для приєднання амінокислоти. Наявність антикодону і акцепторні властивості тРНК дозволяють їм виконувати адаптерну функцію: зв'язувати і переносити амінокислотний залишок і приєднуватись за рахунок антикодону до комплементарного кодону мРНК, який визначає порядок амінокислотних залишків колінеарній послідовності нуклеотидів в матричній молекулі РНК, і таким чином сприяють перетворенню послідовності нуклеотидів НК відповідно до правил генетичного коду в послідовність амінокислотних залишків синтезованого білку.

Кожна тРНК може переносити тільки одну з протейногенних амінокислот. Для більшої частини амінокислот є декілька тРНК, які називаються *ізоакцепторними* і позначаються відповідно до тРНК1Gly, тРНК2Gly і так далі. Існування ізоакцепторних тРНК пов'язано з виродженістю генетичного коду. В результаті приєднання амінокислот до 3'-кінця молекули тРНК амінокислоти активуються — між карбоксильним кінцем молекули і кінцевим аденозином акцепторного кінця тРНК виникає *макроергічний зв'язок*, енергія якого використовується далі для синтезу пептидного зв'язку під час трансляції на рибосомах. В результаті специфічної взаємодії тРНК і відповідної амінокислоти виникає *аміноацил-тРНК* — комплекс, що містить активований амінокислотний залишок і відповідний антикодон, який і є *субстратом* для реакції синтезу поліпептидного ланцюга.

Для кожної з амінокислот існує своя особлива аміноацил-тРНК-синтетаза, яка здійснює специфічне впізнавання і зв'язування амінокислот і тРНК, внаслідок чого і виникає аміноацил-тРНК. Аміноацил-тРНК-синтетази (АРСази) мають виключно високу субстратну специфічність, активуючи тільки амінокислоти L-ряду і приєднують їх до тРНК з певним антикодон. Вони як би повідомляють амінокислоті шифр з трьох нуклеотидів антикодону тРНК і тому ці ферменти іноді називають *кодазами* або *шифрами*. Видатна роль АРСаз у безпомилковому синтезі поліпептидних ланцюгів білків була доведена в спеціальних експериментах з використанням безклітинних систем білкового синтезу. У цих дослідах здійснювали хімічне перетворення амінокислотних залишків у складі аміноацил-тРНК, замінюючи, наприклад, залишок цистеїну на залишок аланіну. При використанні таких молекул в ході біосинтезу неправильні амінокислотні залишки (Ala) включалися в

поліпептидний ланцюг в усіх тих положеннях, які відповідали антикодонам тРНК (тРНК_{Cys}).

АРСази можуть утворювати комплекси (кодосоми), до складу яких входять декілька АРСаз, а також ферменти, які регулюють їх активність (протеїнкінази, протеїнфосфатази, метилтрансферази та ін.) шляхом відповідних ковалентних модифікацій (фосфорилування, метилування та ін.). АРСази можуть приєднувати амінокислотні залишки як до 3'-, так і 2'-гидроксильним групам кінцевого аденозину, розміщеного на акцепторній ділянці тРНК. Одні з АРСаз переважно зв'язують амінокислоту із 3'-ОН групою рибози (серил-, глицил-тРНК-синтетази), а інші — з 2'-ОН-групою (фенілаланіл-тРНК-синтетаза). Проте для біосинтезу білку це не має істотного значення, оскільки амінокислотний залишок може досить легко переходити з однієї позиції в іншу через утворення 2', 3'- циклу. Після утворення аміноацил-тРНК ці молекули надходять до *рибосом*.

Рибосоми. Вивчення рибосом і механізму білкового синтезу триває вже більше за півстоліття, що пов'язано із складністю їх просторової організації і самого процесу трансляції. У диференційованих клітинах еукаріот синтез білку йде переважно в ендоплазматичній сітці в гранульованому ЕПС, мембрани якого усяні численними рибосомами. У клітинах бактерій рибосоми розташовані по всій протоплазмі, і їх число досягає ~104 на одну клітину. Цитоплазма недиференційованих ембріональних клітин еукаріот також містить переважно вільні рибосоми. Певна кількість білків синтезується також в ядрі, в мітохондріях і хлоропластах рослин. У мітохондріях виявлені рибосоми, які дещо відрізняються від цитоплазматичних рибосом за розміром, що пов'язано з особливостями походження цих органел, специфікою їх геномів і генетичного коду.

Так, мітохондріальні рибосоми грибів мають коефіцієнт седиментації 75S, а мітохондріальні «мінірибосоми» ссавців — 55S. Цитоплазматичні рибосоми еукаріот і рибосоми прокаріот дуже схожі по структурі. Кожна з них складається з великої і малої субодиниці, комплекс яких і є власне рибосомаю з молекулярною масою 2,5 МДа.(70S) у прокаріот або 4,2 МДа.(80S) — у еукаріот. Мала субодиниця (30-40S) зв'язується з мРНК і тРНК, а велика - утворює пептидний зв'язок. Основу кожної субодиниці складають молекули

рибосомальних РНК, навколо яких в певному числі і порядку групуються білки малої (S-білки) і великої (L-білки) субодиниць рибосоми (рис. 4.26.).

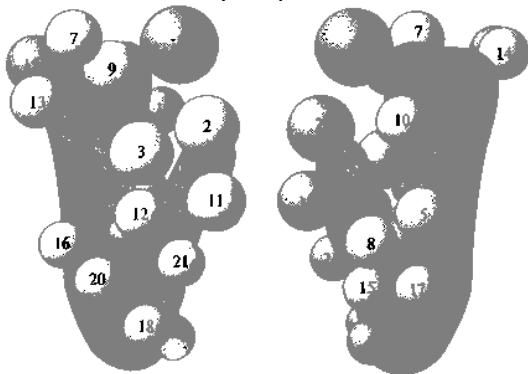


Рис. 4.26. Білки рибосоми в певному порядку групуються навколо молекули рРНК (Спірін А.С., 1986). Зображені дві проекції розташування 21 білку (S-білки) навколо Y-подібної молекули 16S рРНК в 30S-субодиниці рибосоми бактерій.

Порівняння структурних компонентів прокаріотичних і еукаріотичних рибосом

приведено на рис. 4.27.

В усіх прокаріотів (еубактерій, актиноміцетів, синьо-зелених водоростей і архебактерій) є 70S рибосоми (практично ідентичні у усіх прокаріот). Співвідношення РНК : білок у них складає 2:1.

Близько 2% сухої маси рибосом складає Mg. В рибосомах прокаріот, зазвичай є органічні полікатіони, такі, як спермін, спермідин, кадаверін і путресцин (≈2,5% від сухої маси рибосом).

У цитоплазмі еукаріот містяться більші 80S рибосоми, у яких співвідношення РНК: білок близько до 1 : 1. У їх складі виявлені іони Mg²⁺ і Ca²⁺, невелика кількість поліамінів.

Найдетальніше вивчена структура 70S рибосом бактерій (*E.coli*). У складі малої (30S) субодиниці рибосом розрізняють певні ділянки, які називають «голівкою», «тілом» і бічним виступом, або платформою (рис. 4.28).

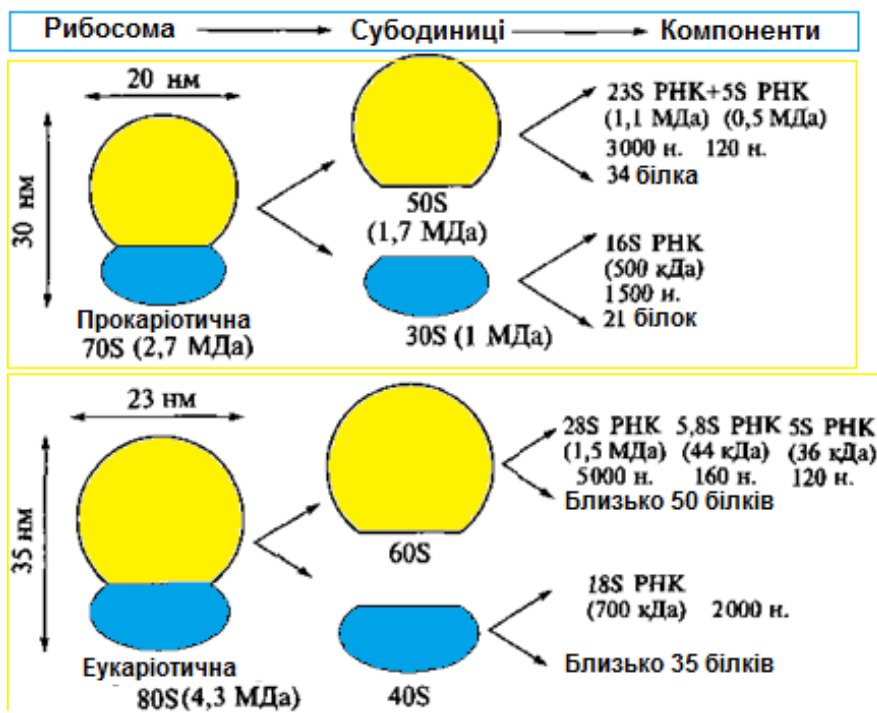
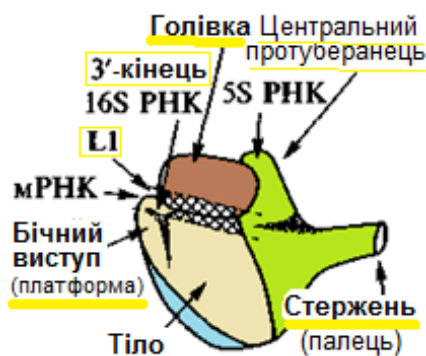


Рис. 4.27. Порівняння складу прокаріотичних і еукаріотичних рибосом.

Велика (50S) субодиниця містить три виступи, або протуберанці: центральний протуберанець (голівка) і два бічних, серед яких розрізняють «L7/L12-стержень» («палець») і розташовані по іншу сторону від голівки «L1-ребро» (бічна частка). У назві цих виступів відбита локалізація в них відповідних білків великої субодиниці (L-білків).



Останніми роками методом криоелектронної мікроскопії одержані детальні зображення субодиниць рибосом бактерій. На них окрім вищеназваних часток в 30S-субодиниці ідентифіковані «канал» і виступ («шпора»).

Рис. 4.28. Структура 70S рибосоми бактерій. Заштрихована ділянка - РНК-зв'язуюча ділянка на 30S-субодиниці (на першому плані). 50S-субодиниця зображена на другому плані (Frank et al. 1995.)

Рибосома - складна просторова структура з місцями підвищеної електронної щільності. Наявні в рибосомі заглиблення («канал», «тунель» та ін.), служать для взаємодії з мРНК і аміноацил-тРНК, а також використовуються для виходу синтезованого поліпептиду (н., E1 і E2-сайти). В процесі трансляції при просування по мРНК рибосомальні субодиниці, ймовірно, динамічно контактують одна з другою і з мРНК.

У 2011 р. завершена робота по визначенню просторової структури 40S-субодиниці еукаріотичної рибосоми (рис. 4.29).

Рибосомальні РНК мають дуже складну просторову організацію і виконують провідну роль у біосинтезі білка. При деяких відмінностях структури великих (16-18S і 23-28S) і малих (5S) рРНК в цілому дуже схожі у різних організмів, що говорить про універсальний характер і ключову роль цих молекул у функціонуванні рибосом.

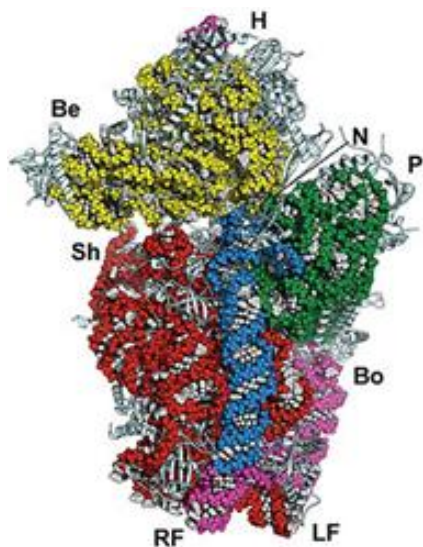


Рис. 4.29.А. Просторова третинна структура 40S-субодиниці еукаріотичної рибосоми. За даними рентгеноструктурного аналізу з розширенням 3,9 А: Н — голівка; Ве — дзьоб; N — шия; P — платформа; Sh — плече; U — тіло; RF — права ступня; LF — ліва ступня (Julius Rabi et al., 2011).

Встановлено, що для подолання просторових перешкод під час процесу трансляції, які пов'язані з елементами вторинної структури мРНК рибосоми мають внутрішню хеліказну активність, для розплітання молекули мРНК. Канал для мРНК еукаріотичної рибосоми має свої особливості в порівнянні з аналогічною структурою бактеріальних рибосом, що зумовлює різницю ініціації трансляції.

Зараз відомо, що білки еукаріотичних рибосом утворюють між собою довгі контакти, а не з рРНК, як у прокариот. «Дзьоб» малої субодиниці схожий на таку структуру малої субодиниці прокариотичної рибосоми і утворений білками, а не рРНК.

До складу рибосом входить значна кількість білків, амінокислотні послідовності яких в еволюції мінялися значно сильніше, ніж структура рРНК. Частина з цих білків, можливо, взагалі не потрібна для роботи рибосом. Головні функції в її роботі виконують РНК, тоді як білки можуть лише посилювати ці функції (рис. 4.29).

Наприклад, провідну роль в зв'язуванні мРНК виконує 3'-кінцева ділянка 16S рРНК малої субодиниці рибосоми прокариот. У основі формування великої (50S) субодиниці лежить комплементарна взаємодія певних ділянок 23S і 5S рРНК. Відбір і зв'язування аміноацил-тРНК в рибосомі також здійснюються за допомогою 16S рРНК, тоді як сам синтез пептидного зв'язку визначає 23S рРНК.

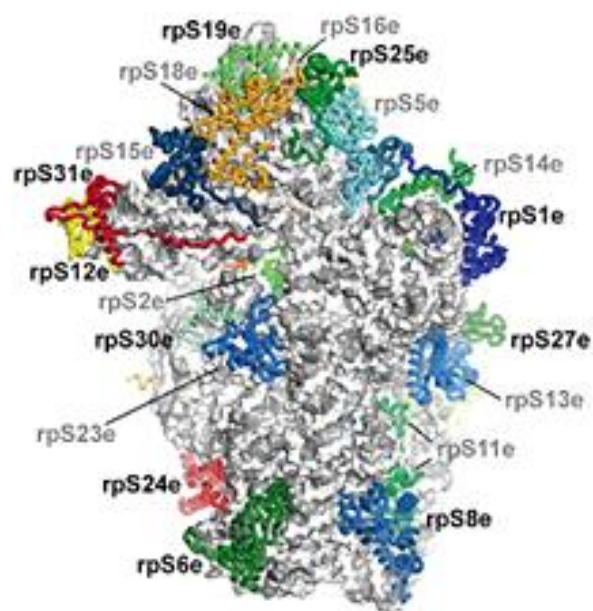


Рис. 4.29.Б. Рибосомальні белки 40S-субодиниці. Еукаріотична 40S-субодиниця містить 33 білкові молекули, 18 з яких відсутні у бактерій. Показані просторові розміщення усіх рибосомальних білків малої 40S-субодиниці.

Різноманітні функції рРНК в здійсненні трансляції, ймовірно, відіграють важливе значення на первинних етапах біологічної еволюції, коли самі РНК могли формувати каталітично активні поверхні і виконувати функції рибозимів.

У складі великої субодиниці всі рибосоми містять по одній високополімерній РНК на кожну субодиницю і одну низькомолекулярну (5S РНК), яка утворює голівку (центральный протуберанець). У еукаріотичних рибосомах міститься низькомолекулярна 5,8S РНК, яка є гомологом 5'-кінцевої ділянки високополімерної РНК великої субодиниці рибосом прокариот. Ця РНК і аналогічна 4,5S рРНК хлоропластів вищих рослин є результатом процесингу попередника високополімерній РНК великої субодиниці і бере участь в її формуванні.

Нуклеотидна послідовність усіх видів рРНК прокариот розшифрована і повністю вивчена їх просторова структура. У складі цих молекул виявлені певні ділянки (домени), вивчено їх структурно-функціональне значення. В цілому 16S рРНК бактерій має Y-образну структуру, окремі гілки якої формують голівку, тіло і платформу малої субодиниці. Найбільш примітний той факт, що загальна форма цієї РНК нагадує форму самій 30S - субодиниці. Саме здатність 16S рРНК до вільного укладання в просторі (без участі білків) визначає загальну форму і розміри рибосомальної субодиниці, в якій 16S рРНК служить каркасом для асоціації S-білків.

Високомолекулярна 23S рРНК бактерій має кулясту форму, що пов'язано з особливостями її вторинної структури: 5'-кінець і 3'-кінець 23S рРНК зближені і утворюють стійку спіраль з 8 нуклеотидних пар. У певній області (петлі) вторинної структури 23S рРНК відбувається комплементарна взаємодія з 5S рРНК. За винятком декількох редукованих виступів (протуберанців) контури 23S рРНК співпадають з контурами 50S-субодиниці, що

доводить лідируючу роль РНК у формуванні просторової структури рибосоми.

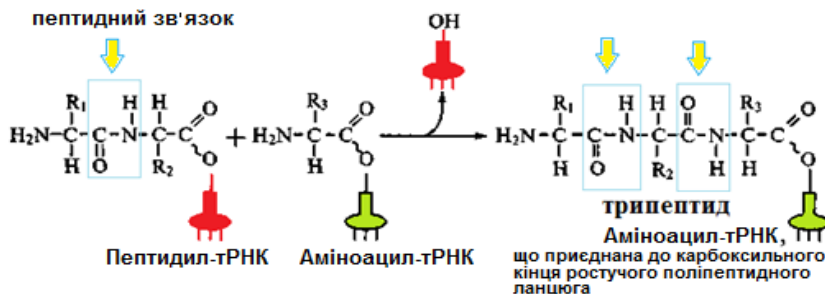
Процеси біосинтезу білків на рибосомах поділяють на три великі етапи: *ініціацію*, *елонгацію* і *термінацію*.

Процес трансляції мРНК стартує з певної ділянки, де починається кодуєча послідовність нуклеотидів. Для забезпечення ініціації трансляції потрібні: стартовий кодон мРНК, ініціаторна аміноацил-тРНК і білкові чинники ініціації. Після ініціації рибосома послідовно транлює мРНК у напрямі її 3'-кінця. Трансляція - синтез поліпептидного ланцюга відбувається шляхом послідовного приєднання амінокислотних залишків до карбоксильного (С-кінця) зростаючого поліпептиду.

Елонгація відбувається колінарно послідовності кодонів мРНК, читання кожного з яких супроводжується приєднанням до пептиду одного амінокислотного залишку, який транспортується відповідною тРНК. Для забезпечення елонгації потрібні: аміноацил-тРНК, білкові фактори елонгації, а також енергія для просування рибосоми по мРНК. Джерелом енергії для трансляції служить GTP (ГТФ). Центральним моментом елонгації є реакція транспептидилування — синтез пептидного зв'язку за участю активованих амінокислотних залишків, які доставляє аміноацил-тРНК. Реакція здійснюється між С-кінцевою карбоксильною групою зростаючого поліпептидного ланцюга і вільною аміногрупою чергової амінокислоти, яку транспортує тРНК.

Упродовж усього процесу карбоксильний кінець поліпептиду залишається в активованій формі, будучи пов'язаний макроергічним зв'язком з тРНК. У кожній реакції синтезу чергового пептидного зв'язку макроергічний зв'язок розривається і тут же заміщається таким же зв'язком, утвореним наступним амінокислотним залишком, доставленим аміноацил-тРНК (рис. 4.30). Термінація трансляції відбувається тоді, коли рибосома досягає термінального кодону мРНК.

З цим кодоном зазвичай не взаємодіє жодна з аміноацил-тРНК, замість цього до мРНК



приєднуються білкові чинники термінації, під дією яких синтезований пептид звільняється з рибосоми.

Рис. 4.30. Реакція транспептидилування.

У разі трансляції моноцистронних мРНК біосинтез білку на цьому закінчується. При трансляції поліцистронних мРНК рибосома може продовжити рух, поки не дійде до чергового кодону, з якого розпочнеться новий повний цикл трансляції. Послідовність подій, що відбуваються в ході одного циклу трансляції, представлена на рис. 4.30. Рибосома в процесі трансляції виконує ряд функцій: зв'язує і утримує мРНК, зв'язує аміноацил-тРНК, здійснює синтез пептидного зв'язку, утримує зростаючий поліпептид, бере участь в гідролізі GTP і просувається по мРНК, взаємодіє з білковими чинниками трансляції (рис. 4.31).

Для виконання усіх цих функцій рибосома повинна мати відповідні функціональні центри, які не всі ще ідентифіковані. Так, мРНК, ймовірно, зв'язується з 30S субодиноцею у ділянці жолобка, який відділяє голівку від бічної лопаті і голівку від тіла. У зв'язуванні мРНК у прокаріот головну роль відіграє взаємодія певної комплементарної ділянки, багатой пуринами (*послідовність Шайна-Дальгарно*) з короткою ділянкою багатою на пиримідини 3'-кінця молекули 16S рРНК, локалізованою у 30S-субодиноці. У зв'язуванні і утримуванні мРНК, ймовірно, приймають участь білки малої субодиноці (S3, S5, S10, S14), а також палець великої субодиноці (білковий комплекс L7/L12).

Зв'язування аміноацил-тРНК відбувається в рибосомі в двох центрах, які формуються в результаті об'єднання великої і малої субодиниць — Р-центрі (пептидильний центр) і А-центрі (аміноацильний центр). Обидва центри досить компактні і розташовані поруч один з одним поблизу голівки 30S-субодиниці і великого протуберанця 50S-субодиниці (Рис. 4.32). Тут відбувається взаємодія акцептуючих кінців аміноацил-тРНК і пептидил-тРНК з утворенням пептидного зв'язку (реакція транспептидирування). Для формування А- і Р-центрів, потрібна взаємодія усіх рРНК рибосоми, а також ряду білків великої і малої субодиниць.

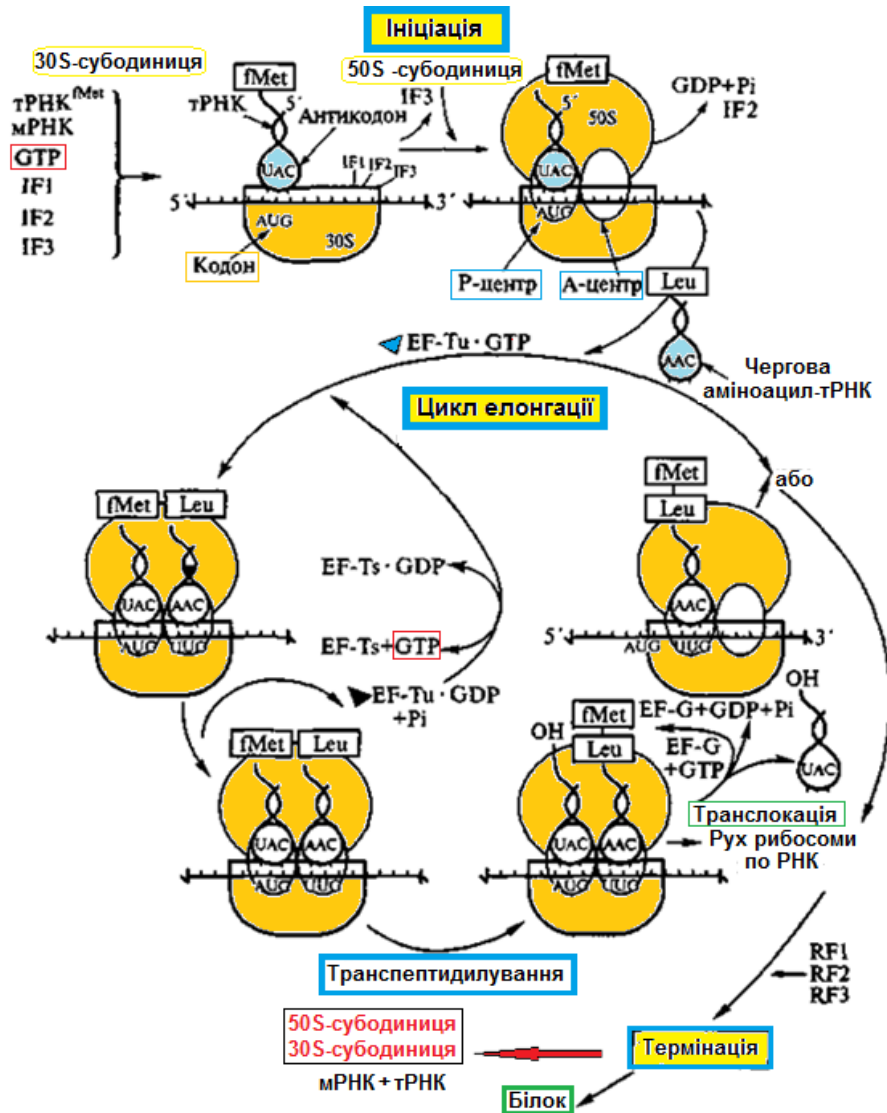


Рис. 4.31. Етапи трансляції у бактерій.

Зв'язування різноманітних білкових чинників елонгації і GTP, очевидно, відбувається на 50S-субодиниці в ділянці L7/L12 - пальця. До зв'язування GTP здатні специфічні білкові чинники трансляції: EF-Tu, EF-G (чинники елонгації), IF-2 (чинник ініціації) і RF-2 (чинник термінації). Ці фактори завжди взаємодіють з рибосомою в комплексі з GTP, і з GTP-зв'язуючими білками (G-білки). При зв'язуванні з рибосомою активується GTPаза активність того чи іншого з цих чинників, а вивільнена в результаті гідролізу енергія GTP використовується на відповідних енергоємних стадіях трансляції.

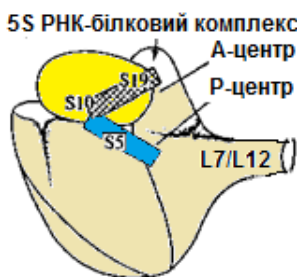


Рис. 4.32. Схема розташування тРНК (заштриховані області) в А- і Р-центрах рибосоми.

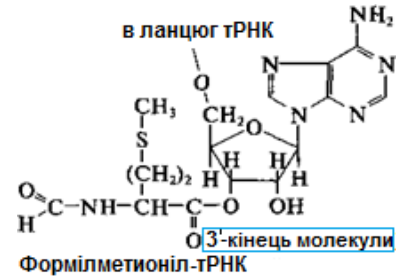
Пептидилтрансферазний центр, в якому йде синтез пептидного зв'язку, локалізований в 50S-субодиниці і розташований поблизу центрального протуберанця на увігнутій поверхні, контактуючі з 30S-субодиниці. В організації цього центру, ймовірно, беруть участь один з доменів 23S рРНК і деякі білки 50S-субодиниці.

Численні спроби ідентифікувати пептидилтрансферазу серед білків рибосом не мали успіху, і складається враження, що за синтез пептидного зв'язку відповідає 23S рРНК. Комплекс транслокації молекули мРНК, деацильованої тРНК і пептидил-тРНК, здійснюється за GTP-залежному механізмі, і ймовірно, в результаті взаємодії субодиниць рибосом (їх розмикання і зімкнення) за участю пальця великої субодиниці.

Етапи трансляції.

Ініціація білкового синтезу складається з декількох стадій і обслуговується рядом *білкових чинників ініціації* (IF — Initiation Factors). У бактерій існують три такі чинники: IF-1, IF-2 і IF-3. Чинник IF-2 має АТРазну активність і відіграє центральну роль в зв'язуванні ініціаторної аміноацил-тРНК. Два інші фактора, ймовірно, впливають на конформацію 30S-субодиниці, допомагаючи їй зв'язуватися з тРНК^{fMet}, що переносить модифікований залишок метіоніну — формілметіоніл: \longrightarrow

Саме цій тРНК належить зв'язатися з кодоном AUG, що ініціюється кодоном мРНК. В деяких випадках перший амінокислотний залишок включається не на метіоніновому кодоні AUG, а на кодоні GUG, який кодує валін. Це пов'язано з тим, що для ефективної ініціації у прокаріот стартовий кодон повинен розміщуватися на вершині шпилькової структури мРНК, перед якою на відстані від 3 до 10 нуклеотидів повинна розташовуватися пурин-багата послідовність. Спаровування комплементарного антикодону тРНК^{fMet} з ініціальним кодоном, має принципово важливе значення, оскільки саме ця взаємодія визначає *рамку зчитування* (трансляції) нуклеотидної послідовності мРНК, яка може декодуватися з трьох різних позицій (по числу нуклеотидів в кодоні), і в результаті можуть синтезуватися три різних поліпептидних ланцюга (рис. 4.32).



На наступній стадії ініціації відбувається приєднання 30S-субодиниці до мРНК і пізнання кодону AUG, який ініціює метіонін. Ініціаторна тРНК^{fMet} при цьому зв'язується з 30S-субодиницею у вигляді комплексу з чинниками ініціації і GTP.

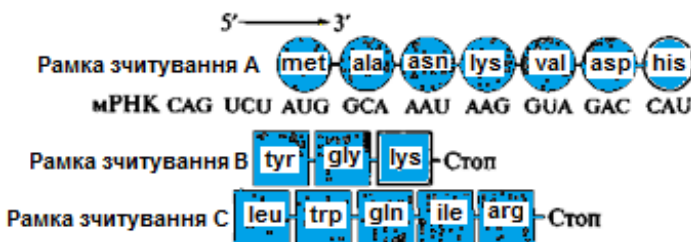


Рис. 4.33. Різні рамки зчитування (трансляції) нуклеотидної послідовності мРНК.

Трансляція може здійснюватися за допомогою однієї з трьох рамок зчитування. У наведеному прикладі рамки зчитування В і С перериваються

стоп-кодонами. «Відкритою» є тільки рамка А, що розпочинається з кодону AUG.

Вибір правильної точки ініціації на молекулі мРНК визначається, очевидно, 30S-субодиницею. Вибір стартового кодону у бактерій відбувається за участю короткої (5-8 н.) багатопуриною послідовності Шайна-Дальгарно в мРНК, яка комплементарно зв'язується з багатопіримідиною ділянкою 3'-кінця 16S рРНК, яка локалізована в 30S-субодиниці рибосоми. Таким чином, взаємодія трьох видів РНК (мРНК, 16S рРНК і тРНК^{fMet}) встановлює рамку зчитування і зумовлює амінокислотну послідовність синтезованого білку.

Після утворення комплексу 30S-субодиниці з мРНК і тРНК білкові чинники ініціації IF-3 і IF-1 покидають 30S-субодиницю, поступаючи місцем 50S-субодиниці, приєднання якої завершує процес складання повної (70S) рибосоми прокаріот. Об'єднання субодиниць призводить до формування двох центрів зв'язування тРНК: Р-центру і А-центру. Далі під дією чинника IF-2 відбувається гідроліз GTP, а вивільнена енергія витрачається на стабілізацію тРНК^{fMet} в Р-центрі рибосоми. Одночасно формується А-центр рибосоми призначений для приєднання наступної аміноацил-тРНК і, таким чином, закінчується процес складання активної рибосоми, здатної до елонгації білкового синтезу.

Елонгація трансляції у бактерій обслуговується 3 білковими факторами (EF-Tu, EF-Ts і EF-G) і може бути поділена на три стадії. На першій стадії до А-центру рибосоми приєднується аміноацил-тРНК, яка приносить другий (після f-Met) амінокислотний залишок, що кодує другий (після триплета AUG) кодон мРНК. Таким чином, створюються умови для утворення пептидного зв'язку між амінокислотними залишками, зв'язаними з відповідними

tРНК, які закріплюються в А- і Р-центрах рибосоми. Надходячи в А-центр, аміноацил-tРНК закріплюється в ньому в комплексі з білковим фактором EF-Tu и GTP. У зв'язуванні аміноацил-tРНК приймають участь не тільки антикодони, але и інші ділянки, тому що посттранскрипційні модифікації її молекули суттєво впливають на зв'язування с рибосоною. При участі фактора EF-Tu здійснюється гідроліз GTP до GDP и фосфату, а енергія, що виділяється втрачається на зближення двох акцептуючих кінців молекул tРНК з прикріпленими до них амінокислотними залишками. Комплекс EF-Tu—GDP при цьому покидає рибосому и регенерує за участю фактора EF-Ts, тому що фактор EF-Tu знову зв'язується з молекулою GTP, а потім - з наступною молекулою аміноацил-tРНК.

На наступній стадії елонгації — транспептидилування — перший (формілметионіновий) залишок переноситься на вільну NH₂-групу другого амінокислотного залишку, пов'язаного з tРНК, розташованою в А-центрі рибосоми. В результаті цієї реакції утворюється перший пептидний зв'язок у молекулі синтезованого білку і виникає дипептидил-tРНК. Першим на N-кінці знаходиться залишок fMet (у еукаріот - залишок Met), який згодом відщеплюється за участю амінопептидаз. Відщеплення метіоніну важливе тому, що N-кінцевий амінокислотний залишок може визначати час життя білку, впливаючи на убіквітин-залежний шлях його деградації.

Третя стадія елонгації — *транслокація* — полягає в тому, що дипептидил-tРНК, залишаючись пов'язаною з відповідним кодоном мРНК, переміщується з А-центру в Р- центр рибосоми, одночасно з просуванням трансльованої мРНК через рибосому. При цьому tРНК^{fMet}, яка звільнилася від амінокислотного залишку в результаті реакції транспептидилування видаляється з Р-центру, рухається в Е-центр рибосоми, і далі виводиться з неї.

Одночасно звільняється А-центр, необхідний для зв'язування наступної аміноацил-tРНК. Транслокація, яку можна розглядати як «крок» рибосоми по мРНК у напрямі 5'→3', відбувається на відстань, що відповідає розміру одного триплету в мРНК. В результаті транслокації навпроти А-центру, який звільнився, розміщується, черговий кодон мРНК, який визначає приєднання відповідної аміноацил-tРНК. Транслокація у бактерій йде за участю чинника EF — G і супроводжується гідролізом ще однієї молекули GTP.

Багатократне послідовне відтворення усіх вищевідзначених стадій елонгації забезпечує подовження поліпептидного ланцюга відповідно до коду білкового синтезу і відбувається з великою швидкістю: у бактерійній клітині тривалість одного циклу елонгації складає - 1/20 с, а увесь синтез білку середнього розміру (- 400 амінокислотних залишків) займає близько 20 с.

Термінація трансляції у бактерій пов'язана з функціонуванням трьох білкових чинників: RF - 1, RF - 2 і RF - 3 (від англ. recognize - дізнаватися), які розпізнають «безглузді» стоп-кодони в мРНК. Чинник RF - 1 впізнає кодони UAG і UAA, а чинник RF - 2 - кодони UAA і UGA. Чинник RF - 3 виконує допоміжну роль, стимулюючи роботу RF- 1 і RF- 2. При надходженні в рибосому одного з термінальних кодонів, з ним негайно зв'язується відповідний RF-фактор і тим самим блокує приєднання аміноацил-tРНК. До того ж в клітинах зазвичай відсутні tРНК з антикодонами, комплементарними стоп-кодонам tРНК.

Приєднання чинників термінації стимулює пептидилестеразну активність в рибосомі (вона властива, зокрема, білкам L11 і L16), яка призводить до гідролізу складноефірного зв'язку між С-кінцем синтезованого поліпептиду і акцептуючим кінцем tРНК. В результаті синтезований білок відділяється від рибосоми; одночасно відділяються tРНК і мРНК, а рибосома дисоціює на 30S- і 50S-субодиниці. У термінації транскрипції бере участь молекула GTP, яка також є алостеричним регулювальником активності білкових чинників термінації.

Оскільки мРНК бактерій, як правило, поліцистронна, вони містять декілька ділянок, що ініціюють і декілька кодонів, що термінують. Хоча рибосома бактерій розпізнає

термінальні кодони, вона може пройти по мРНК і далі, почавши трансляцію наступної ділянки в поліцистронній мРНК. Окрім цього, трансляція може стартувати не з першого, а з другого або наступного ініціального кодону, і таким чином на одній мРНК можуть синтезуватися різні білки.

У клітинах еукаріот етапи біосинтезу білку в основному відповідають таким у прокаріот, але вони є більш тонко організованими процесами, пов'язаними з особливістю організації їх мРНК і іншим набором білкових чинників трансляції. Як відомо, зрілі мРНК еукаріот утримують на 5'-кінці особливу структуру – Кеп, який потрібний для зв'язування мРНК з малою (40S) субодиноцею рибосоми. У більшості моноцистронних мРНК еукаріот як стартовий використовується найближчий до 5'-кінця триплет AUG, і жоден з інших триплетів AUG, розташованих в кодуєчій області мРНК, не може бути використаний як ініціативний. Ініціація трансляції з кодону AUG відбувається тільки тоді, коли він знаходиться у складі відповідного нуклеотидного оточення: за два нуклеотиди до нього повинен розташовуватися пуриновий нуклеотид (А або G), а відразу після нього - G:

NNN A(G) NN AUG GNNN, де N - піримідиновий нуклеотид.

Перед початком трансляції у еукаріот послідовність мРНК, як би сканується починаючи з 5'-кінця (Кепа) для пошуку AUG, розташованого у вищевідзначеному оптимальному нуклеотидному оточенні. Ініціація трансляції у еукаріот пов'язана з функціонуванням великого числа білкових чинників ініціації, які називаються eIF-факторами (eukaryotic Initiation Factors). До власне чинників ініціації трансляції у еукаріот відносять білки, які позначають eIF1 - eIF5. Ці чинники умовно підрозділяються на дві групи. До першої групи відносять ті з них, які взаємодіють з субодиноцями рибосоми і тим самим полегшують приєднання ініціаторної аміноацил-тРНК (тРНК^{Met}) і мРНК. Чинники другої групи беруть участь в підготовці 5'-кінцевої області мРНК до ініціації трансляції. До першої групи належать чинники eIF-1, eIF-2 і eIF-3 (аналоги чинників IF-1 - IF-3 прокаріот), а також ряд додаткових чинників (eIF-2B і eIF-5). Друга група чинників специфічна для еукаріот і включає мРНК-зв'язуючі і мРНК-розплітаючі білки. Найважливішими з них є чинники з групи eIF-4 (eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E і eIF-4F). Чинник ініціації eIF~4F є білковим комплексом, який зв'язується з Кепом еукаріотичної мРНК. Він складається з трьох субодиноць (α , β і γ), субодиноця β має РНК-залежну АТРАЗну активність. Активність чинників eIF - 4E регулюється шляхом їх фосфорилювання/дефосфорилювання.

Після зв'язування Кепа для ініціації трансляції потрібне розплітання вторинної структури мРНК в 5'-нетрансльованій ділянці. Цей АТФ-залежний процес у еукаріот здійснюється за рахунок РНК-хеліказної активності білкових чинників eIF-4A і eIF-4B. Чинник eIF-4A існує як у вільному виді (білок з масою 45 кДа), так і в комплексі з чинником eIF-4F, і саме йому властива АТРАЗна і РНК-хеліказна активність.

В цілому більшість білкових чинників ініціації еукаріот функціонують у вигляді великих білкових комплексів ініціації трансляції (коефіцієнти седиментації 43S і 48S). Зв'язування і просування цих комплексів по мРНК (разом з малою субодиноцею рибосоми) блокується особливим білком-репресором ініціації. Репресор взаємодіє з елементами вторинної структури (шпильками) мРНК, розташованими в 5'-нетрансльованій ділянці мРНК (або на початку кодуєчої ділянки), стабілізує відповідні шпильки і тим самим запобігає функціонуванню комплексу чинників ініціації.

У елонгації трансляції у еукаріот беруть участь два чинники (eEF-1 і eEF-2), які є аналогами чинників EF-Tu і EF-G бактерій. Чинник eEF-1 утворює комплекс з аміноацил-тРНК і GTP, і цей комплекс приєднується до А-центру рибосоми. Після попереднього "впізнання" (кодон-антикодонової взаємодії) чинник елонгації розщепляє GTP і відходить від рибосоми разом з GDP, звільняючи тим самим акцептуючий кінець пептидил-тРНК і відкриваючи можливість для подовження пептиду в наступній реакції транспептидируванні. Невелика

пауза між впізнаванням і гідролізом GTP достатня для відділення від мРНК некомплементарного антикодону аміноацил-тРНК. Таким чином цей чинник знижує вірогідність включення невідповідних амінокислотних залишків у поліпептидний ланцюг. Чинники елонгації еукаріот на відміну від відповідних чинників прокаріот мають виражену РНК-зв'язуючу здатність. Ці білки, як і аміноацил-тРНК-синтетази, взаємодіють з кодуючою ділянкою мРНК, до якої приєднуються ферменти, які мають специфічну спорідненість до РНК (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа та ін.). Припускають, що ці NAD^+/NADH -залежні ферменти беруть участь в енергетичному забезпеченні біосинтезу білка, сприяючи створенню вищої концентрації ATP і GTP у білоксинтезуючій системі.

У термінації трансляції еукаріот бере участь один білковий чинник - R, функція якого аналогічна білковим чинникам термінації бактерій.

Посттрансляційна модифікація білків

Посттрансляційна модифікація, ПТМ (англ. *Posttranslational modification, PTM*) — процеси зміни первинної структури поліпептиду, хімічна модифікація білка після його трансляції і формування просторової структури білкових молекул. Посттрансляційна модифікація включає ковалентну хімічну модифікацію білка після його синтезу на рибосомі. Для багатьох білків посттрансляційна модифікація виявляється завершуючим етапом біосинтезу, який є частиною процесу експресії генів. Разом з альтернативним сплайсингом посттрансляційні модифікації збільшують різноманітність білків в клітині. У результаті цього білки набувають специфічних властивостей і функціональної активності. У модифікації білків дуже велику роль відіграють різні білки (ферменти, шаперони). Специфічні пептидази відщеплюють невеликі фрагменти білка з N-термінального кінця або розрізають поліпептидний ланцюжок в середині. Наприклад, молекула інсуліну після трансляції додатково видозмінюється утворенням внутрішньомолекулярного дисульфідного зв'язку, після чого певна ділянка вирізається з середини ланцюга пропептиду, що перетворює проінсулін на інсулін.

Посттрансляційна модифікація розширює функціональний склад білка за допомогою додаткового приєднання таких груп як ацетатна (*ацетилювання*) або фосфатна (фосфорилування), а також цукрів (*глікозилювання*) і ліпідів. Посттрансляційна модифікація може також включати зміну хімічної природи амінокислоти (наприклад, трансформацію залишку аргініну в цитрулін) або утворення дисульфідних зв'язків у білку. Спостерігається також метилування аргінінових або лізинових амінокислотних залишків білка, наприклад гістонових ядерних білків.

На сьогодні відомі більше двохсот варіантів посттрансляційної модифікації білків, і, помічено що, модифікаціям піддаються переважна більшість білків, більше того, один і той же білок може піддаватися декільком різним модифікаціям. Посттрансляційні модифікації роблять різні ефекти білків: регулюють тривалість їх існування в клітині, ферментативну активність, взаємодії з іншими білками. У ряді випадків посттрансляційні модифікації є обов'язковим етапом дозрівання білку, інакше він виявляється функціонально неактивним. Наприклад, при дозріванні інсуліну і деяких інших гормонів потрібний обмежений протеоліз поліпептидного ланцюга, а при дозріванні білків плазматичної мембрани - глікозилювання.

Посттрансляційні модифікації можуть бути як поширеними, так і рідкісними, аж до унікальних. Так глікозилювання є однією з модифікацій, що найчастіше зустрічаються, вважається, що близько половини білків людини глікозилювано, а 1-2 % генів людини кодують білки, пов'язані з глікозилюванням. До рідкісних модифікацій відносять тирозинування, детирозиннування і полигліцилізування тубуліну (рис.4.34).

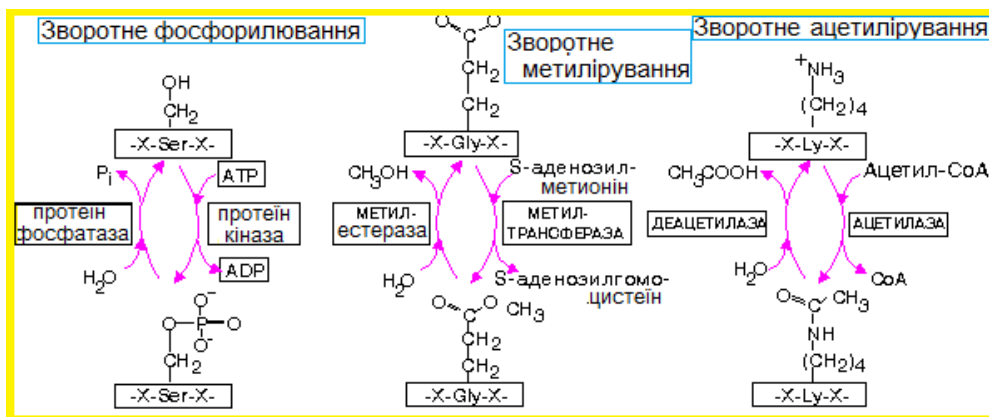


Рис.4.34. Три типи зворотніх ковалентних модифікацій білків, які впливають на його активність.

Фосфорилування — один з найпоширеніших видів посттрансляційної модифікації білків.

Процеси

фосфорилування і дефосфорилування різних субстратів є одними з найважливіших біохімічних реакцій. Ферменти, якими здійснюються ці процеси, називаються кінзами (або фосфотрансферазами) та фосфатазами відповідно. Зокрема фосфорилування або дефосфорилування білка часто регулює його функціональну активність (активує або деактивує його).

Виняткове значення посттрансляційних модифікацій для нормального функціонування організму підтверджується тим, що існують захворювання, в основі яких лежить порушення системи посттрансляційної модифікації білків (муколіпидоз, хвороба Альцгеймера, різні види раку). На сьогодні для вивчення посттрансляційної модифікації застосовують методи мас-спектрометрії і вестерн-блоттінг.

Після утворення поліпептидного ланцюгу відбувається формування його нативної конформації (фолдінг). За сучасними уявленнями, процес згортання поліпептиду починається з швидкого формування вторинної структури, що слугує основою для утворення складніших структур; далі (дуже швидко) відбувається утворення супервторинної структури (поєднання декількох α -спіралей, β -ланцюгів та інших елементів). Наступним етапом є утворення специфічних контактів між ділянками віддаленими одна від одної в первинній структурі з формуванням третинної структури. На шляху, що веде до набуття білком своєї конформації є стадія, пов'язана з формуванням основних елементів третинної структури (специфічного поєднання α -спіралей, β -тяжів, з'єднувальних петель та ін..) – утворення гідрофобного ядра молекули. Молекула набуває просторової структури, близької до структури нативного білка. Разом з тим, вона ще не має функціональної активності даного білка, але відрізняється від нативного меншим ступенем впорядкованості структури. Ця структура отримала назву «розплавлена глобула», у ній неполярні групи, що формують гідрофобне ядро молекули, «упаковані» пухко. Відсутність специфічних взаємодій призводить до зміни орієнтації рухомих петель і така молекула лабільна, схильна до «злипання» з іншими такими ж молекулами і утворенню агрегатів.

У фізіологічних умовах синтезовані поліпептидні ланцюги набувають своєї конформації достатньо швидко і ефективно. Отже, у клітині повинні існувати спеціальні механізми регуляції процесу згортання. За сучасними уявленнями, клітина має, принаймні два типи механізмів згортання: перший - регуляція швидкості перетворення «розплавленої глобули» в нативну структуру і другий - захист частково згорнутого білка від неспецифічної агрегації.

Стадія перетворення «розплавленої глобули» в нативний білок є найповільнішою, такою, що обмежує швидкість всього процесу. Це зумовлено тим, що формування специфічних взаємодій, які стабілізують нативну конформацію, пов'язані з відносно повільними структурними перебудовами, такими як цис-транс-ізомеризація пептидного зв'язку. Оскільки транс-конформація стабільніша, вона переважає в щойно синтезованому

поліпептидному ланцюгу. Проте для утворення нативної структури білка необхідно, щоб близько 7% зв'язків, утворених залишками проліну, ізомеризувалися в цис-конформацію. Ця реакція призводить до повороту ланцюга на 180° навколо C–N зв'язку, відбувається *in vivo* надзвичайно повільно і прискорюється завдяки дії спеціального ферменту — пептидил-проліл-цис/транс-ізомерази. Протеїндисульфідізомераза (другий фермент), який прискорює процес згортання і каталізує утворення й ізомеризацію дисульфідних зв'язків. Він локалізується в ендоплазматичному ретикулумі і сприяє згортанню секреторних білків, які містять дисульфідні містки (н., імуноглобулінів, інсуліну, рибонуклеази).

Дані ферменти не здатні зв'язуватися з нативними білками; їх субстрати мають частково розгорнену структуру, близьку до стану «розпавленої глобули», вони прискорюють стадії, що лімітують швидкість згортання та сприяють утриманню нативної структури білка, знижують ризик протеолітичної деградації і агрегації лабільних проміжних форм.

В клітині існує особлива категорія білків, основною функцією яких є забезпечення правильного характеру скручування поліпептидних ланцюгів у нативну структуру. Процес формування просторової структури білка — фолдінг — процес становлення третинної структури білка. У 1987 р. було запропоновано називати білки, за допомогою яких здійснюється фолдінг, молекулярними *шаперонами* (molecular chaperones). Термін «шаперони» застосовується відносно трьох різних груп білків: нуклеоплазмів (ядерні нуклеосомні білки), білків Hsp 70-Bip (білки теплового шоку Heat shock proteins і їх гомологів) і власне белків-шаперонів (шапероніни), які мають безпосереднє відношення до згортання поліпептидного ланцюга в нативний білок.

Взаємодія шаперонів з білком розпочинається ще до сходження поліпептидного ланцюга з рибосоми. Зв'язуючись з окремими ділянками поліпептидного ланцюга, молекули Hsp70 утворюють міцні комплекси, що утримують ланцюг у розгорненому стані. Взаємодія не є специфічною (шаперони не розрізняють білки) і в основному реалізується завдяки силам гідрофобного характеру. Міцно фіксований на шаперонах поліпептидний ланцюг не здатний до згортання в нативну структуру, оскільки не має необхідної для цього рухливості. Головна функція Hsp70 полягає в утриманні синтезованих білків від неспецифічної агрегації і їх передача шапероніну, який забезпечує оптимальні умови для ефективного згортання.

У клітинах еукаріотів шаперони виконують також важливу роль у транспорті білків через мембрани мітохондрій, хлоропластів і ендоплазматичного ретикулуму. Такий транспорт необхідний, оскільки багато білків клітинної органели синтезуються в цитоплазмі, а остаточне їх згортання відбувається у місці своєї постійної локалізації. Роль Hsp70 - транспортувати до мембрани частково *розгорнений* білок, тому що розгортання - обов'язкова умова проникнення білкової молекули через мембрану. Цікаво, що мітохондріальний матрикс (ЕПС, хлоропласти) містить власні шаперони, що «підхоплюють» білок, який перетинає мембрану, і сприяє його «втягуванню» в мітохондрію.

Механізм, який дозволяє розгорненому білку звільнитися від Hsp70 і перейти на шаперонін (Hsp60) – це є здатність шаперону зв'язувати АТФ, у певних умовах здійснювати його гідроліз і змінювати міцність взаємодії з поліпептидним ланцюгом залежно від АТФ або АДФ. Шапероніни є складними олігомерними структурами. Н., найбільш вивчений Hsp60 побудований з 14 субодиниць, організованих у два семичленних кільця, що лежать одне під одним. У центрі циліндра є порожнина - канал (діаметром 4,5 нм), в якому і відбувається скручування поліпептидного ланцюга, який перейшов на шаперонін з Hsp70.

У центральному каналі молекули шапероніну, поліпептидний ланцюг виявляється повністю ізольованим і дістає можливість реалізовувати стадії згортання і утворення нативного білка. Як і в разі Hsp70, зв'язування розгорненого білка з шапероніном і його

відщепленням регулюються АТФ-азною активністю шапероніну. У зв'язуванні білка (що знаходиться в стані «розплавленої глобули»), бере участь кожна з 14 субодиниць молекули шапероніну. Кількість місць зв'язування залежить від стадії згортання: чим ближче структура до нативної, тим менше ділянок, «розпізнаних» шапероніном. Роль маленького шапероніну Hsp 10 (ко-шаперонін) – закривати вхід до центрального каналу і запобігти виходу в зовнішнє середовище білка, який не завершив набуття своєї конформації.

Не підлягає сумніву, що найважливішу роль у регуляції згортання білків *in vivo* відіграють білок-білкові взаємодії, що виникають між окремими білками і шаперонами. Розшифрування молекулярних механізмів пострансляційних модифікацій і формування функціонально активних білків – одна з актуальних проблем молекулярної біології.

Регуляція експресії генів

Регуляція експресії генів. Регуляція експресії генів у прокариот. Катаболічні і анаболічні оперони бактерій. Контроль експресії генів у еукаріот. Регуляція на рівні процесів транскрипції. Білки – чинники транскрипції. Поняття про епігенетичну регуляцію експресії генів. Метилування ДНК, імпринтинг генома. Гормональна регуляція експресії генів. Контроль на рівні трансляції і посттрансляційних процесів.

Регуляція експресії генів.

Контроль експресії генів здійснюється на усіх етапах експресії генів:

- на рівні транскрипції (контролюється час і характер транскрипції гена);
- на рівні процесінгу первинного транскрипту;
- при транспорті зрілих мРНК в цитоплазму;
- на рівні трансляції - відбір в цитоплазмі мРНК для трансляції на рибосомах
- на рівні деградації - вибіркова дестабілізація певних типів мРНК в цитоплазмі,
- на рівні активності білка - селективна активація, інактивація або компартаментація молекул білка після їх синтезу.

Регуляція транскрипції. Регуляція транскрипції має важливе значення для розуміння механізмів диференціальної активності (експресії) генів в онтогенезі будь-кого про- і еукаріотичного організму. Шляхом регуляції генної експресії клітини пристосовуються до змін зовнішнього і внутрішнього середовища. Фенотип клітин визначається кількістю і властивостями продукованих ними структурних, каталітичних, регуляторних або інших класів білків. Повинна існувати ефективна система контролю реалізації генетичної інформації в клітині, яка б дозволяла в кожен момент підтримувати її функціональну активність синтезуючи достатню кількість різних білків.

У бактерій набір білків регулюється в основному наявністю мРНК, придатних для біосинтезу білка (трансляції), регуляцією самого процесу трансляції в рибосомальному апараті клітини, а також регуляцією процесів деградації (протеолізу) білків. У еукаріот білковий пул в клітині може додатково контролюватися за допомогою процесів дозрівання (процесінгу) первинних транскриптів і транспорту зрілих РНК з ядра в цитоплазму. Додаткові можливості контролю клітини еукаріот придбали в результаті роз'єднання у просторі та часі процесів транскрипції (в ядрі) і трансляції (в цитоплазмі). У прокариот транскрипція і трансляція відбуваються практично одноразово в єдиному неструктурованому клітинному вмісті: синтез РНК на ДНК-матриці ще триває, а вже починається трансляція за участю рибосом, тРНК і білкових чинників трансляції.

Першим і головним етапом контролю реалізації потоку генетичної інформації на шляху від ДНК до білку у усіх організмів є контроль на рівні транскрипції.

Регуляція транскрипції у прокариот.

Транскрипція у прокариот регулюється переважно на стадії ініціації і пов'язана з

діяльністю регуляторних білків — активаторів і репресорів транскрипції. В ході елонгації транскрипції важливого значення набуває вторинна структура синтезованою РНК: від неї багато в чому залежить, чи будуть синтезовані зрілі молекули, або процес зупиниться на синтезі коротких функціонально непридатних транскриптів. Регуляція транскрипції у бактерій зазвичай охоплює групу (кластер) генів, що кодують функціонально споріднені білки, які беруть участь в регуляції процесів тісно пов'язаних між собою хімічними перетвореннями.

Такими білками зазвичай є ферменти, зайняті здійсненням серії реакцій (метаболічним шляхом), що ведуть до розпаду або синтезу тих або інших сполук. Група погоджено регульованих генів, що кодують ці ферменти, називається опероном. До найкраще вивчених оперонів бактерій відносяться лактозний (lac)-оперон, галактозний (gal)-оперон і триптофановий (trp)-оперон E.coli. До складу кожного з цих оперонів входять декілька структурних генів, що кодують ферменти, а також регуляторні області — промотор і оператор — ділянка оперону, до якого приєднуються білки-репресори і активатори транскрипції. Зони промотора і оператора часто перекриваються, і це пояснює, як білки-регулятори впливають на ініціацію транскрипції. Розрізняють негативну і позитивну регуляцію транскрипції оперонів, які включають не лише дію відповідних регуляторних білків, але і ряду внутрішньоклітинних метаболітів небілкової природи, що розглядаються як *корепресори* або *коактиватори* транскрипції.

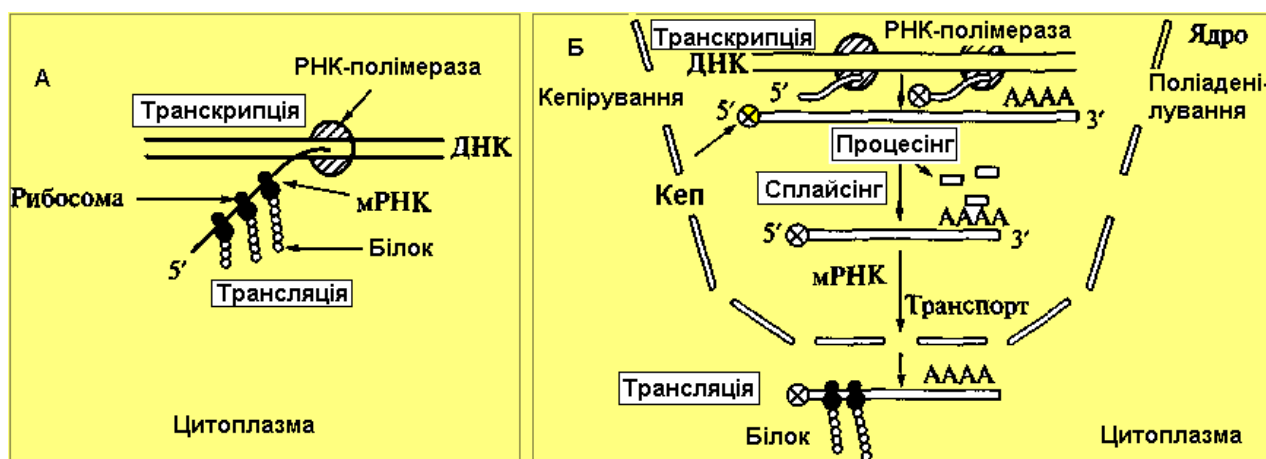


Рис. 5.1. Відмінності в транскрипції і трансляції у прокаріот (А) і еукаріот (Б). Транскрипція і трансляція у еукаріот розділені в часі і просторі: транскрипція відбувається в ядрі, а трансляція - в цитоплазмі. Між транскрипцією ДНК і трансляцією РНК відбувається процесінг і транспорт РНК. Транскрипція і трансляція у прокаріот здійснюються одночасно.

Однією з перших стала відома структура і механізм експресії lac-оперона E.coli. До його складу входять структурні гени Z, Y, A, що кодують ферменти метаболізму лактози — головного поживного дисахариду, на якому ростуть клітини бактерій. Ген lac Z кодує фермент β-галактозидазу, що розщеплює β-галактозиди (лактозу), з утворенням глюкози. Ген lac Y кодує β-галактозидтрансферазу (перміазу) — фермент, необхідний для транспорту β-галактозидів через клітинну мембрану. Ген lac A кодує фермент β-галактозидтрансацитилазу (функція повністю не з'ясована). Усі ці гени є індукцибельними. Їх транскрипція і утворення відповідних білків відбувається в клітині тільки тоді, коли в ній накопичується надлишок лактози і відчувається нестача глюкози.

Окрім структурних генів до складу оперону входять промотор (40 н.п.) і оператор (27 н.п.). З оператором взаємодіє білок-репресор. Lac-репресор є продуктом експресії відповідного гена (L-гена) і міститься у E.coli в кількості не більше 10 молекул на 1 клітину. Молекулярна маса lac-репресора складає 37 кДа, його активна форма являє собою гомотетрамер, який зв'язується із зоною оператора і блокує дію РНК-полімерази (рис. 5.1). Така негативна регуляція транскрипції спостерігається при достатній концентрації глюкози в

клітині і у відсутність надлишку лактози.

При надлишку лактози його молекули зв'язуються з субодиницями репресора з утворенням репресор-індукованого комплексу, в якому індуктор (β -галактозид) виступає в ролі алостеричного регулятора, що змінює конформацію білка-репресора та інактивує його. У інактивованого репресора різко знижується спорідненість до оператора і репресор від'єднується від промотора, відкриваючи «вхід» для РНК-полімерази - починається транскрипція оперону, а потім і синтез ферментів, що розщеплюють лактозу.

Позитивна регуляція оперону полягає в індукції транскрипції, що досягається за допомогою приєднання до промотора комплексу, що складається з CAP-білку (білок-активатор катаболічних оперонів) і cAMP — універсального внутрішньоклітинного регулятора багатьох метаболічних процесів. Комплекс CAP-cAMP зв'язується з ДНК на самому початку промотора безпосередньо перед сайтом зв'язування РНК-полімерази і здатний багаторазово (майже в 50 разів) посилювати транскрипцію оперону (рис . 5.3).

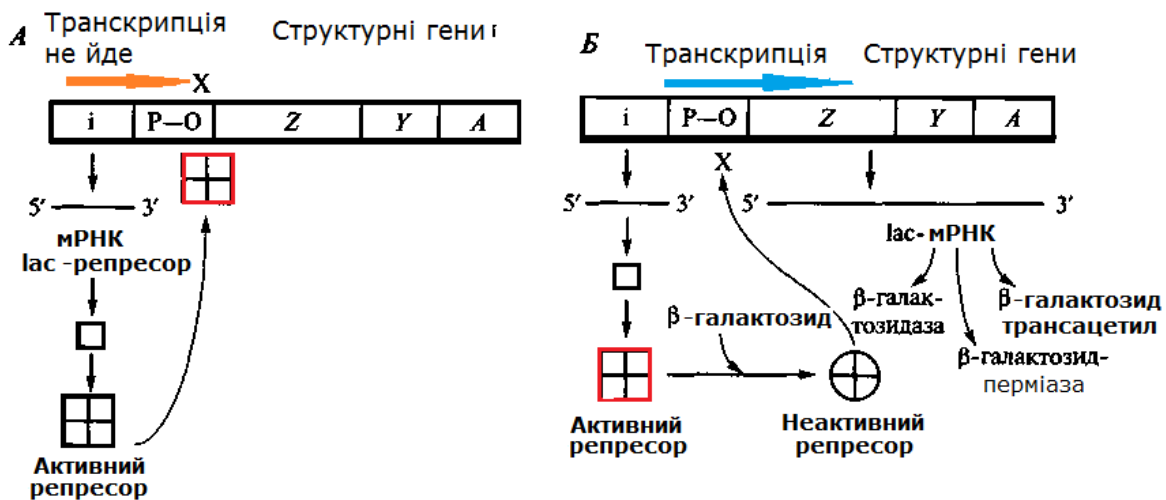


Рис 5.2. Схема регуляції лактозного оперону *E.coli*:
 А — лактозний оперон репресований приєднанням білка-репресора до зони оператора (транскрипція не йде); *i* — ген білка-репресора; *P* — промотор; *O* — оператор;
 Б - дерепресія оперону шляхом інактивації білка-репресора. Відбувається транскрипція структурних генів і синтезується поліцистронна *lac*-мРНК.

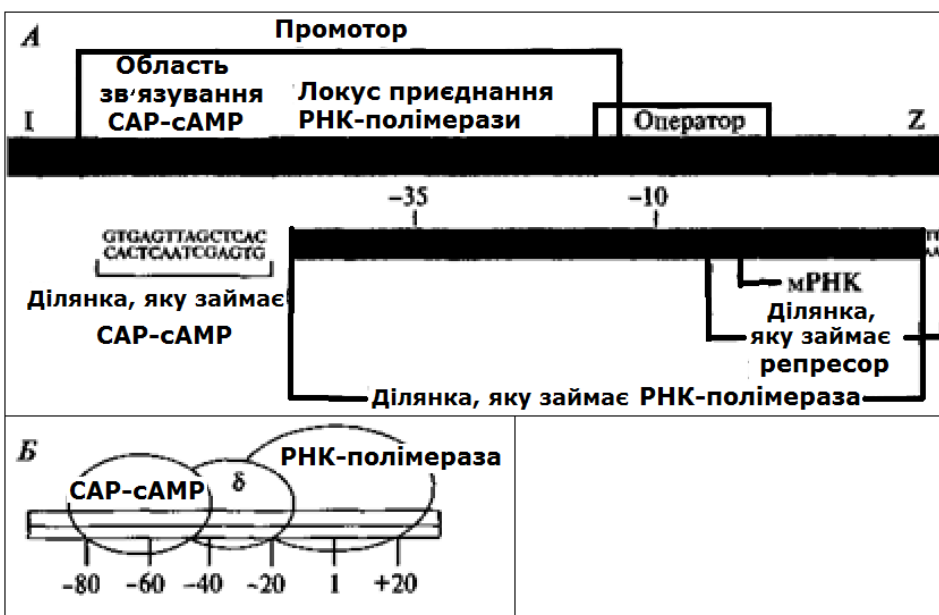


Рис. 5.3. Регуляторні області *lac*-оперона *E.coli* (М.Сингер, П.Берг, 1998):
 А — нуклеотидні послідовності, задіяні в регуляції експресії оперону; Б — схема взаємодії комплексу CAP-білок-cAMP з δ -фактором і кор-ферментом РНК-полімерази. Цифри означають число нуклеотидних пар, розташованих перед (-) початком і після (+) початку транскрипції *lac*-оперона.

Складніша система регуляції транскрипції притаманна триптофановому (*trp*-) оперону. Він має п'ять генів, що кодують ферменти синтезу триптофану. Репресія цього оперону, як і

Іас-оперону, здійснюється з допомогою білка-репресора з молекулярною масою 58 кДа, який кодується геном *trp R*, розташованим на значній відстані від *trp*-оперону. Білок-репресор блокує оператор в комплексі з самим триптофаном тільки при високій концентрації цієї амінокислоти в клітині. Нуклеотидні послідовності промотора і оператора в *trp*-опероні перекриваються, тому приєднання комплексу *trp*-білок-репресор автоматично перешкоджає зв'язуванню РНК-полімерази з промотором. Додаткові можливості репресії *trp*-оперону пов'язані з наявністю в його структурі особливої *атенюаторної* послідовності, яка розміщується між зоною промотора і областю структурних генів (рис. 5.4). Ця послідовність входить до складу так званої *лідерної області*, що кодує лідерний пептид у складі першого ферменту, що синтезується на поліцистронній мРНК цього оперону. Атенюаторна послідовність здатна викликати передчасну термінацію транскрипції з цього і ряду інших оперонів бактерій, впливаючи на вторинну структуру синтезованої РНК.

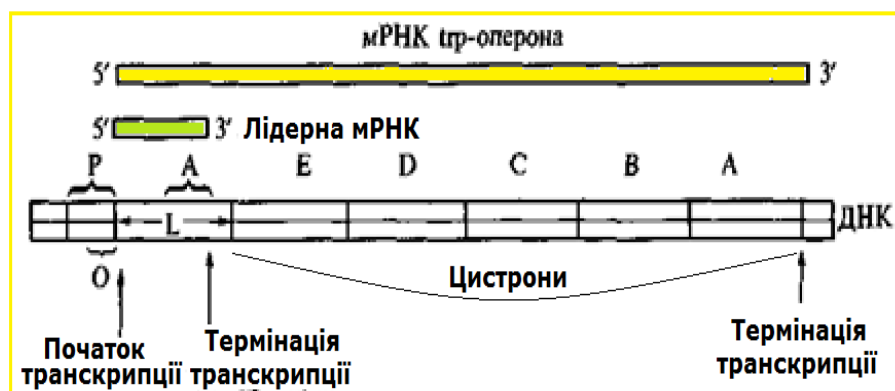


Рис. 5.4. Схема триптофанового оперону *E. coli*.
P — промотор;
O — оператор;
A — атенюатор;
L — лідерна послідовність;
E, D, C, B, A — цистрони, що кодують ферменти біосинтезу триптофану. Лідерна мРНК, що виникає в результаті термінації транскрипції в зоні атенюатора, а також зріла поліцистронна мРНК *trp*-оперону.

Такі атенюатори («ослаблювачі»), які називають також регульованими термінаторами, містяться не лише в оперонах *E. coli*, але і у бактерій роду *Salmonella*. Атенюаторна послідовність в *trp*-опероні *E. coli* містить дві області з оберненими повторами. Транскрипція цих послідовностей призводить до утворення в мРНК шпилькових структур, які можуть зупиняти подальший хід транскрипції. В результаті утворюється функціонально не придатна для транскрипції *лідерна РНК* завдовжки 140 нуклеотидів, що відбувається при високій концентрації триптофану в клітині. При зниженні концентрації триптофану РНК-полімераза долає зону атенюатора і транскрипція призводить до синтезу зрілої мРНК. Встановлено, що такий альтернативний хід транскрипції пов'язаний із зміною вторинної структури лідерної області РНК-транскрипту, на формування якої впливає апарат трансляції.

Оскільки в зоні атенюатора оперону розташовані області обернених повторів, в РНК-транскрипті також утворюються відповідні комплементарні повтори, які можуть утворювати шпильки у вторинній структурі РНК. Одна з цих шпильок є термінаторною, за якою йде послідовність оліго-(U), і при її виникненні настає термінація транскрипції відповідно до вищерозглянутому механізму (рис. 5.5). Термінаторна шпилька утворюється у тому випадку, якщо здійснюється швидкий і «плавний» рух рибосоми, починаючи з 5'-кінця мРНК в умовах достатньої кількості усіх амінокислот, включаючи триптофан. В цьому випадку в ході трансляції рибосома закриває два з чотирьох обернених повторів, а два інші утворюють термінаторні шпильки. Навпаки, при нестачі триптофану (і відповідно тРНК (Trp) рибосома зупиняється в тій ділянці лідерної послідовності мРНК, де знаходяться підряд два триплета (кодона), що кодують цю амінокислоту у складі синтезованого лідерного пептиду. При цьому рибосома закриває першу з чотирьох областей обернених повторів, що веде до виникнення іншої антiterмінаторної *шпильки*, термінаторна шпилька не утворюється, і транскрипція продовжується в область структурних генів. Термінація транскрипції в атенюаторній зоні *trp*-оперону відбувається і тоді, коли з якоїсь причини порушується система трансляції в цілому.

В цьому випадку вторинна структура мРНК формується незалежно від рибосоми, що також веде до утворення термінаторної шпильки і зупинки транскрипції (рис. 5.5).

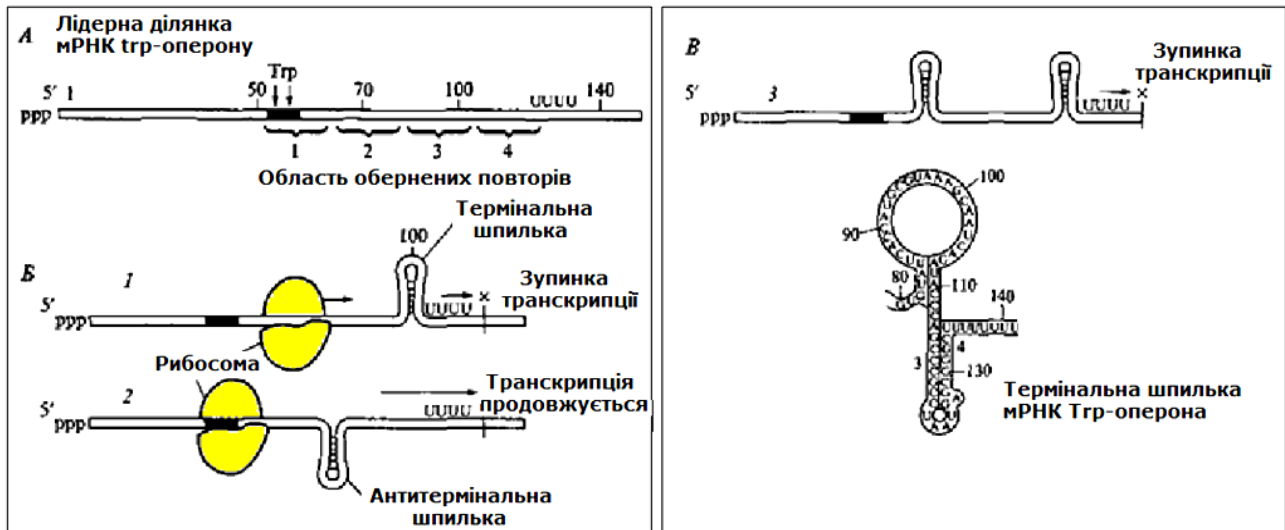


Рис. 5.5. Схема регуляції транскрипції мРНК *trp*-оперону за участю рибосоми: А — лідерна ділянка мРНК *trp*-оперону, що містить чотири області обернених повторів, здатних утворювати шпилькові структури. Стрілками показано положення двох поруч розташованих кодонів, що детермінують включення амінокислотних залишків триптофану (*Trp*) в поліпептид, що синтезується; Б — спрощена схема трьох варіантів формування структури лідерної ділянки мРНК *trp*-оперону, один з яких призводить до продовження транскрипції (у центрі), а два інших — до зупинки транскрипції (1 — достатня кількість усіх амінокислот, включаючи *Trp*; 2 — нестача *Trp*; 3 — порушення системи трансляції); В — структура термінаторної шпильки мРНК *Trp*-оперона.

Регуляція транскрипції у бактеріофага λ

Регуляція транскрипції у бактеріофага λ представляє собою приклад того, як окремі ключові регуляторні білки здатні фундаментально змінити напрям транскрипції генома і тим самим змінити увесь модус існування вірусу в клітині. Фаг λ , як відомо, існує в зараженій клітині в пасивній (лізогенній) або активній (літичній) формі. Молекулярною основою зміни способів існування фага λ є події, що відбуваються в апараті транскрипції. Регуляція транскрипції цього фага здійснюється двома білками: *Cro*-білком і *A*-репресором. Вони можуть взаємно репресувати синтез один одного таким чином, що зв'язування λ -репресора з відповідною областю оператора блокує транскрипцію мРНК *Cro*-білку і визначає лізогенний шлях існування фага, і навпаки, *Cro*-білок може виступати в ролі репресора, що веде до транскрипції генів лізису, синтезу фагових білків і літичного шляху розвитку фага.

λ -репресор, що кодується геном *cl*, є білком, що складається з 236 амінокислотних залишків, організованих в два глобулярні домени, пов'язаних між собою містком із серії амінокислотних залишків. Він функціонує у вигляді димера, в якому контактують С- і N-кінцеві домени. Білок *Cro* також є гомодимером, окремі протомери якого являють собою глобулярні частки, що містять 66 амінокислотних залишків (рис. 5.6).

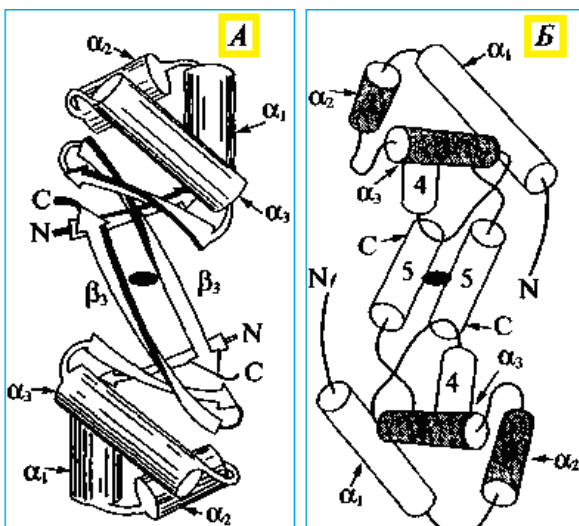


Рис. 5.6. Димерні молекули білку *Cro*(А) і репресора фага λ (Б). α -спіралі показані у вигляді циліндрів, β -шари — у вигляді стрілок. Точкою позначена вісь симетрії. Спіралі α_2 і α_3 λ -репресора беруть участь у взаємодії з ДНК (рис. 5.7)

λ -репресор і *Cro*-білок зв'язуються з ДНК в області великої борозни в зоні оператора, де відбувається тонка і точна взаємодія структурних елементів (α -спіралей) білків з азотистими

основами нуклеотидної послідовності ДНК, яка упізнається білками (рис. 5.7). У обох білків є характерний структурний елемент «спіраль-петля-спіраль», завдяки якому вони контактують з ДНК. Одна з цих спіралей входить в зону великого жолоба ДНК, а інша (замикаюча спіраль) фіксує першу в цьому положенні.

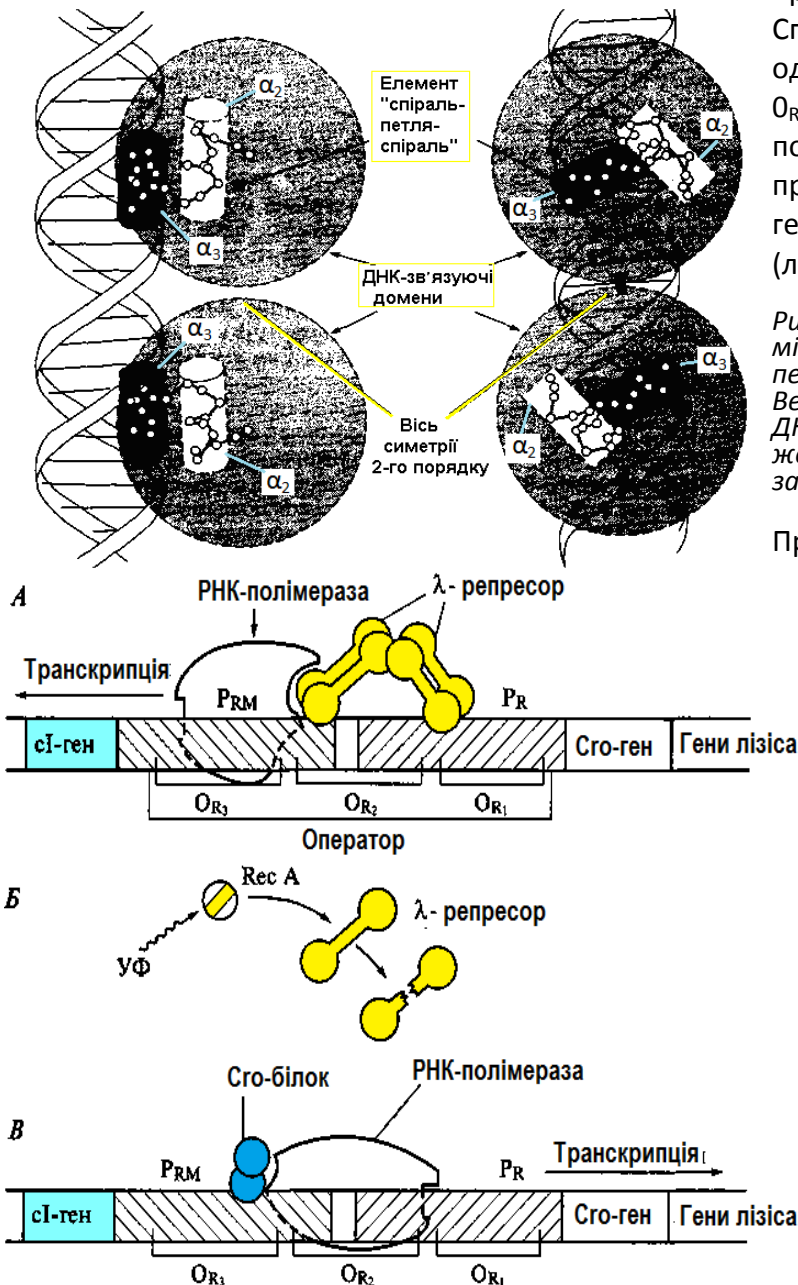
У фага λ ідентифіковані два промотори: сильний (P_R), з якого відкривається транскрипція гена білка Cro і генів лізису, і слабкий (P_{RM}), приєднання до якого РНК-полімерази детермінує синтез λ -репресора. Обидва промотори перекриваються із зоною оператора, в якій виділяють три ділянки: O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} (рис. 5.8). Ділянка O_{R1} перекривається з сильним (правим) промотором (P_R); ділянка O_{R2} перекривається із слабким (лівим) промотором (P_{RM}); ділянка O_{R3} перекривається з обома промоторами. Різні операторні ділянки мають різну спорідненість до білків-регуляторів, а ефективність зв'язування цих білків залежить від їх концентрації в клітині. Так, λ -репресор при невисокій концентрації зв'язується тільки з ділянкою O_{R1} , а при високій може зв'язатися з ділянками O_{R2} , O_{R3} і тим самим закрити вхід для РНК-полімерази, що блокує транскрипцію гена cl (блокує транскрипцію своєї мРНК). Коли λ -репресор зв'язується з O_{R1} він закриває сильний (правий)

промотор і блокує транскрипцію гена Cro -білку і генів лізису. Одночасно ще один димер λ -репресора взаємодіє з O_{R3} і сприяє зв'язуванню РНК-полімерази із слабким (лівим) промотором, що веде до транскрипції гена cl і підтримує пасивний (лізогенний) стан фага.

Рис. 5.7. Взаємодія з ДНК білків, що містять структурний елемент «спіраль-петля-спіраль» (М.Сингер, П.Берг, 1998). Великі круги — домени, що зв'язуються з ДНК; α_3 — спіраль, що входить у великий жолоб ДНК; α_2 — фіксувальна (що замикає) спіраль.

При УФ-опроміюванні λ -репресор руйнується. У цьому процесі бере участь білок $Rec A$, який в нормі є білком рекомбінації, але під дією ультрафіолету набуває протеолітичну активність. Білок $Rec A$ розщеплює λ -репресор в ділянці містка (рис. 5.8) і інактивує його.

Рис. 5.8. Схема взаємодії молекул λ -репресора і Cro -білку із зоною оператора ДНК фага λ : А — λ -репресор визначає лізогенний шлях існування фага; В — білок $Rec A$, під дією УФ-проміння, що набуває протеолітичну активність і розщеплює молекулу λ -репресора; У — Cro -білок, що визначає активний (літичний) шлях існування фага; P_{RM} — лівий (слабкий) промотор; P_R — правий (сильний) промотор; O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} — ділянки оператора; cl — ген, що кодує λ -репресор.



Інактивований λ -репресор залишає зону O_{R3} , після чого РНК-полімераза зв'язується з сильним промотором і починається транскрипція генів білка Cro і генів лізису, а бактеріофаг вступає на активний (літичний) шлях розвитку. По мірі збільшення концентрації Cro-білку він зв'язується з O_{R3} і блокує синтез λ -репресора. Коли концентрація Cro-білку збільшується, він вимикає також O_{R1} і O_{R2} і зупиняє транскрипцію свого власного гена. Приклад бактеріофага показує, що досить складна система регуляції активності генів може сформуватися в результаті взаємодії всього декількох регуляторних білків. Якщо врахувати, що у еукаріот число регуляторних білків незрівнянно більше, то стає зрозумілим, які великі у них можливості контролю експресії генів.

Регуляція транскрипції у еукаріот. Інтенсивність транскрипції визначається просторовою структурою ДНК, в якій нерідко спостерігаються вигини, петлі (домени), а також надспіралізовані ділянки. Усі ці мотивні структури ДНК сприяють посиленню транскрипції, оскільки створюють додаткові можливості для приєднання до ДНК різноманітних білків-регуляторів транскрипції. Ці білки здатні зв'язуватися з певними нуклеотидними послідовностями ДНК, розташованими як в самих транскриптонах, так і в інших, нерідко досить віддалених від зони транскрипції областях, що носять назву *енхансерів* (підсилювачів) і *адапторних елементів*. У останньому випадку дія регуляторних елементів генома може опосередкуватися особливими білками, сприяючими посиленню або послабленню інтенсивності транскрипції. Самі білки-регулятори транскрипції набувають або втрачають функціональну активність в результаті модифікацій, що викликають каталітично активні білки-ферменти, або виникають при з'єднанні з речовинами небілкової природи, які модулюють їх регуляторні властивості. У прокариот в регуляції транскрипції безпосередньо беруть участь різні клітинні метаболіти і транскрипція безпосередньо пов'язана з змінами структури *хроматину*. Перехід цього комплексу в активну форму є додатковим елементом регуляції транскрипції у вищих організмів.

Адапторні елементи генома еукаріот проявляють вибіркова чутливість по відношенню до стероїдних гормонів, cAMP, глюкокортикоїдів. Вони специфічно регулюють клітинну відповідь на тепловий шок, дію металів (Cd^{2+} , Zn^{2+}) і деяких хімічних сполук (н., діоксину).

Адапторні елементи мають специфічні нуклеотидні послідовності, які впізнають білки. Так, наприклад, чинник транскрипції білків теплового шоку впізнає в ДНК послідовність CNGAANNTTCNNG (де N – будь-який нуклеотид), а глюкокортикоїдний білок-рецептор зв'язується з ДНК в області послідовності TGTTCCT. В області промоторів багатьох еукаріотичних генів виявлений СААТ-бокс — елемент, що регулює частоту ініціації транскрипції. Результати вивчення енхансерів, які видалені іноді на значні відстані (до 20 тис. н.п.) від промоторів, а також регуляторних ділянок поблизу промоторів, дозволили зробити деякі узагальнення. По-перше, регуляторні послідовності в ДНК мають модульну будову і складаються з серії певних нуклеотидних послідовностей (Рис. 5.9).



Рис. 5.9. Модульна будова регуляторних послідовностей в ДНК еукаріот.

Стрілки вказують на можливість різної орієнтації регуляторних послідовностей.

Кожна така послідовність містить 8-15 нуклеотидів і з'єднується в процесі регуляції транскрипції з серією білків-регуляторів. Деякі з цих білків є присутніми в окремих типах клітин, а інші — в усіх клітинах. Енхансери діють в двох орієнтаціях: нормальній і інвертованій.

По-друге, існують білки-регулятори, які активують транскрипцію, а інші її пригнічують. Н., у хребетних тварин сильну активуючу здатність мають білки AP1, AP2 і Ery F1, а також CACCC-чинник і білок SP1. Негативно впливає на транскрипцію чинник NF1. Дія регуляторного елемента залежить від комбінації регуляторних білків і може мінятися у процесі розвитку клітин. Таким чином, енхансер може не лише активувати, але і пригнічувати транскрипцію, тому назва цих елементів не точно відображає їх функцію. Залежно від білків, які зв'язуються з регуляторними елементами, кожен з них сильніше або слабкіше, позитивно або негативно діє на транскрипцію.

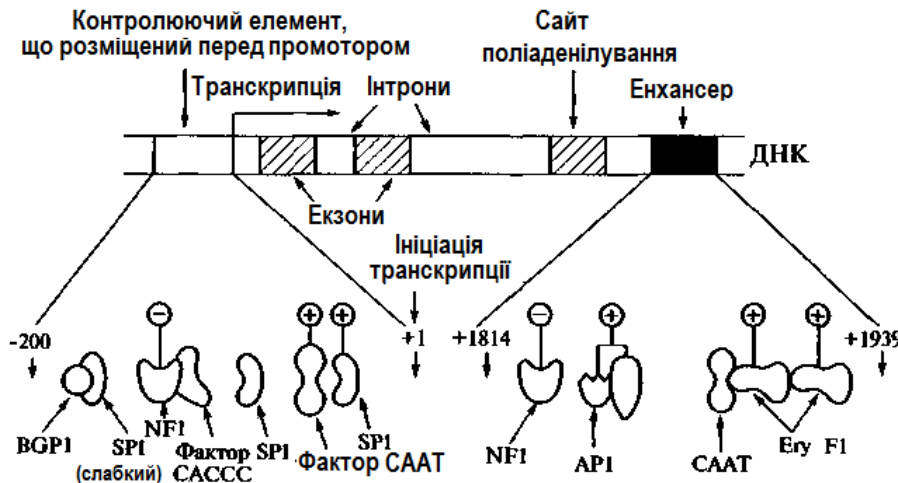
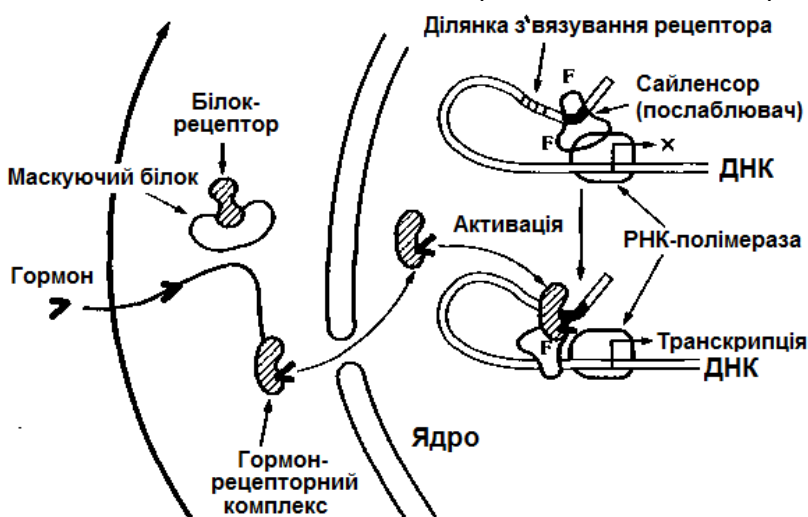


Рис. 5.10. Приєднання білків, які посилюють (+) та послаблюють (-) транскрипцію до регуляторних елементів гену β-глобіна курки (Б.Албертс та ін., 1994).

По-третє, енхансери і елементи, які розташовані перед промоторами, зв'язують багато однакових білків. Прикладом може служити ген β-глобіну курки. Енхансер цього гену, розташований після області, що кодує білок, зв'язує групу білків, які можуть приєднуватися до регуляторного елемента, розташованого перед промотором (рис. 5.10.).

Білки-регулятори транскрипції у свою чергу можуть активуватися або інактивуватися за допомогою різних механізмів. Їх активація може відбуватися шляхом приєднання низькомолекулярних лігандів, додаткової субодиниці, фосфорилування певних амінокислотних залишків та ін. Прикладом активації регуляторних білків можуть служити



події, що відбуваються за участю білків-рецепторів стероїдних гормонів (рис. 5.11).

Рис. 5.11. Дія стероїдних гормонів на транскрипцію (по В.О.Гвоздіву, 1996): F - білкові чинники транскрипції.

Ці білки забезпечують реакцію клітин на дію різних гормонів, активуючи або пригнічуючи експресію певних генів. У складі цих білків є ДНК-зв'язуючий домен. Він розміщений на N-кінці молекули, що містить 100 амінокислотних залишків, які утворюють серію «цинкових пальців». Інший (гормон-зв'язуючий) домен цих білків розташований на С-кінці їх поліпептидних ланцюгів. Після проникнення в клітину стероїдний гормон зв'язується з білком-рецептором (який є чинником транскрипції), змінює його конформацію і сприяє звільненню рецептора від білків, що маскують його. Далі гормон-рецепторний комплекс проникає в ядро і зв'язується з певними регуляторними послідовностями в ДНК. Зв'язування гормон-рецепторного комплексу може сприяти видаленню білка-сайленсора і таким чином

знімати заборону на транскрипцію генів.

Довгий час вважали, що у еукаріот, як і у прокариот, білки-активатори і репресори транскрипції діють безпосередньо, контактуючи з ДНК. Потім було встановлено існування медіаторів (посередників) між цими білками і транскриптонами у дріжджів і вищих еукаріот. Одні з них діють на хроматин, інші взаємодіють з РНК-полімеразою і зв'язаними з нею білками. Перша група регуляторів включає білкові комплекси, які модифікують структуру хроматину: гістонацетилтрансферазні комплекси і гістондеацетилазні комплекси. Друга група представлена медіаторним комплексом дріжджів і декількома подібними комплексами в клітинах ссавців. Ймовірно, ці дві групи медіаторів функціонують на різних стадіях: змінам в хроматині передують стимуляції РНК-полімеразної активності. На рівні медіатора визначається чи ініціюватиметься транскрипція і з якою частотою. До складу медіатора входять білки, здатні ініціювати або пригнічувати транскрипцію. Медіатор РНК-полімерази II еукаріот є полімеразним холоферментом. Медіатор інтегрує і передає позитивні і негативні стимули від енхансерів до промоторів, діючи безпосередньо через РНК-полімеразу на промотор-залежну транскрипцію.

Вперше медіатор був виявлений при вивченні транскрипції, що здійснювалася РНК-полімеразою II у дріжджів. У цих дослідах було встановлено, що в системі, що містить РНК-полімеразу, транскрипційний чинник TFIIIB, TATA-зв'язуючий білок (TBP) і інші, раніше відомі білки-регулятори, транскрипція здійснювалася тільки у присутності молекули адаптера між білком-активатором і іншими вище переліченими компонентами транскрипції. Цей адаптер і був названий медіатором. Медіатор дріжджів є комплексом, що складається з 20 субодиниць, чотири з яких (Srb2, Srb4, Srb5 і Srb6) є продуктами чотирьох домінуючих генів-супресорів. Ще дев'ять субодиниць медіатора є продуктами експресії раніше ідентифікованих у дріжджів генів, а інші сім субодиниць кодуються раніше невідомими генами, що дістали назву Med. Встановлено, що субодиниці типу Srb взаємодіють з С-кінцевим доменом (CTD) РНК-полімерази II. Припускають, що в клітинах дріжджів медіатор зв'язується з РНК-полімеразою II. Потім холофермент, що утворився, входить до складу комплексу преініціації транскрипції, після чого відбувається фосфорилування С-кінцевого домена РНК-полімерази. Медіатор вивільняється, а активна РНК-полімераза зв'язується з новим комплексом білків — елонгатором, який регулює елонгацію транскрипції. Окрім 20-субодиничного медіатора у дріжджів були знайдені додаткові білки-посередники (Srb8, Srb9, Srb10 і Srb11), які беруть участь в негативній регуляції транскрипції.

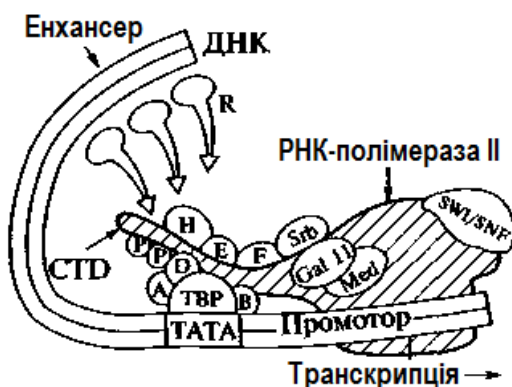


Рис. 5.12. Комплекси білків, що беруть участь в регуляції транскрипції у еукаріот.

R — білки-регулятори, які передають сигнал від енхансера; *A, B, D, E, F, H* — чинники транскрипції (TF); *Srb, Gal 11, Med* — білки субмедіаторного комплексу; *SWI/SNF* комплекс білків, що модифікує структуру хроматину; *TBP-TATA-зв'язуючий білок*; *CTD* — С-кінцевий домен РНК-полімерази II з приєднаними до нього фосфорними залишками (*P*).

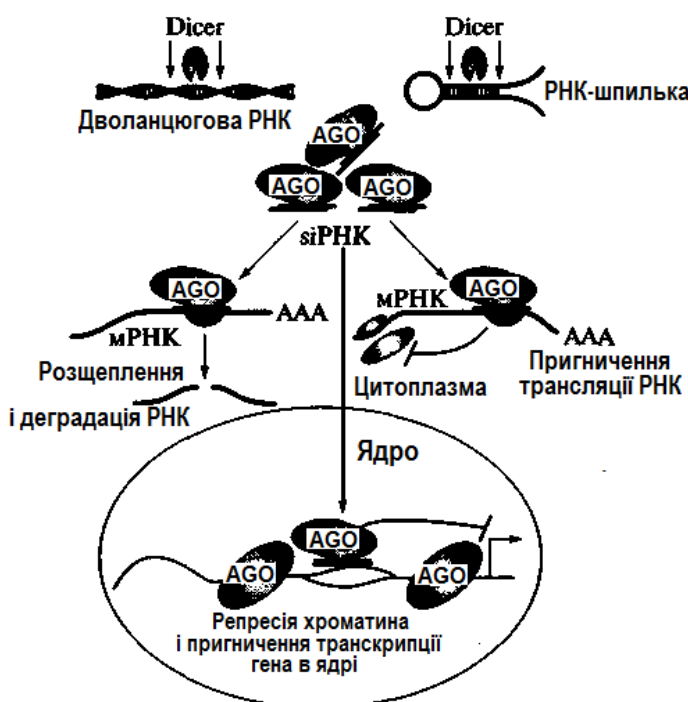
У ссавців першим встановленим медіатором став TRAP-коактиваторний комплекс ядерного рецептора тиреоїдних гормонів. У людини і мишей виділені сім медіаторних комплексів, що дозволяє вважати медіатори основними посередниками при передачі інформації від енхансерів до промоторів у вищих еукаріот (рис. 5.12). Порівняння структур медіаторів, виділених з різних об'єктів, показало, що вони мають модульну будову, і один з модулів зазвичай представлений Srb-подібними білками, які потрібні для ініціації транскрипції усіх генів, що транскрибуються РНК-полімеразою II.

Одним з важливих механізмів регуляції експресії генетичної інформації в клітинах

еукаріот є відкритий Е.Майєром і К.Мелло процес *РНК-інтерференції* (RNA-interference, Нобелівська премія в 2006 р). РНК-інтерференція є фундаментальним механізмом пригнічення експресії (сайлейсинга) генів на стадіях транскрипції і трансляції. Цей механізм функціонує у ссавців, рослин і грибів і задіяний в регуляції розвитку, диференціювання і захисту організму від паразитичних геномів вірусів та переміщення транспозонів, здатних викликати в геномі негативні перебудови (рис. 5.13).

Процес РНК-інтерференції розпочинається з дії ферменту DICER (*to dice* — нарізувати кубиками), який діє як ендонуклеаза і розрізає экзо- і ендогенні дволанцюгові РНК (або одноланцюгові РНК, які містять «шпильку») на короткі фрагменти завдовжки 21-25 нуклеотидів. Ці фрагменти дістали назву *малі інтерферуючі РНК* (siRNA, міРНК). Один з ланцюгів міРНК (ведучий ланцюг, англ. – *guide strand*) включається далі до складу РНК-білкового комплексу RISC (комплекс сайлейсинга, що індукується РНК; *RNA-induced silencing complex*), каталітичною складовою якого є білки-ендонуклеази сімейства аргонавт1 (AGO на рис. 5.13).

Ендонуклеази AGO викликають розщеплювання і деградацію певних мРНК. При цьому провідний ланцюг міРНК в комплексі з AGO знаходить певні комплементарні ділянки нуклеотидних послідовностей молекул РНК, а AGO розщепляє ці молекули. Відбувається деградація мРНК і зупиняється процес трансляції на рибосомах. Важливо, що міРНК можуть



пригнічувати транскрипцію гомологічних їм ділянок ДНК в ядрі клітини, здійснюючи контроль за експресією генів на найпершому етапі реалізації генетичної інформації. Таким чином, широкі можливості міРНК як інструментів РНК-інтерференції доповнюють уявлення про різноманітність функцій РНК в молекулярно-біологічних процесах в клітині. Крім того, міРНК забезпечують захист від РНК-вмісних вірусів, які утворюють дволанцюгові РНК (длРНК) на деяких стадіях свого існування.

Рис. 5.12. Загальна схема РНК-інтерференції.

Починаючи з 2002 року у різних видів тварин і рослин були виявлені сотні видів ендогенних коротких РНК (мікроРНК), які виникають з длРНК-шпильок, що формуються при транскрипції РНК. Встановлено, що мікроРНК беруть участь у формуванні вісей тіла і диференціюванні тканин у тварин і людини, у рослин визначають форму листя. У людини близько третини усіх мРНК можуть бути мішенями мікроРНК, це дозволяє обмежувати експресію багатьох білків в певних клітинах. РНК-інтерференція стала популярною в роботах по функціональній геноміки та для масового скринінгу генів. міРНК (природні і синтезовані) можуть бути використані для виборчої дії на певні ділянки генома та блокувати роботу потенційно небезпечних генів, виявляти функції генів, у тому числі і при вивченні генома людини. За допомогою РНК-інтерференції можливе створення в майбутньому ліків нового покоління, що будуть діяти на певний ген і вимикати синтез кодованого ним білку. Такими мішенями можуть бути гени, активні в клітинах пухлин або гени, що забезпечують розмноження вірусів.

Хроматин і загальна (тотальна) регуляція транскрипції у еукаріот.

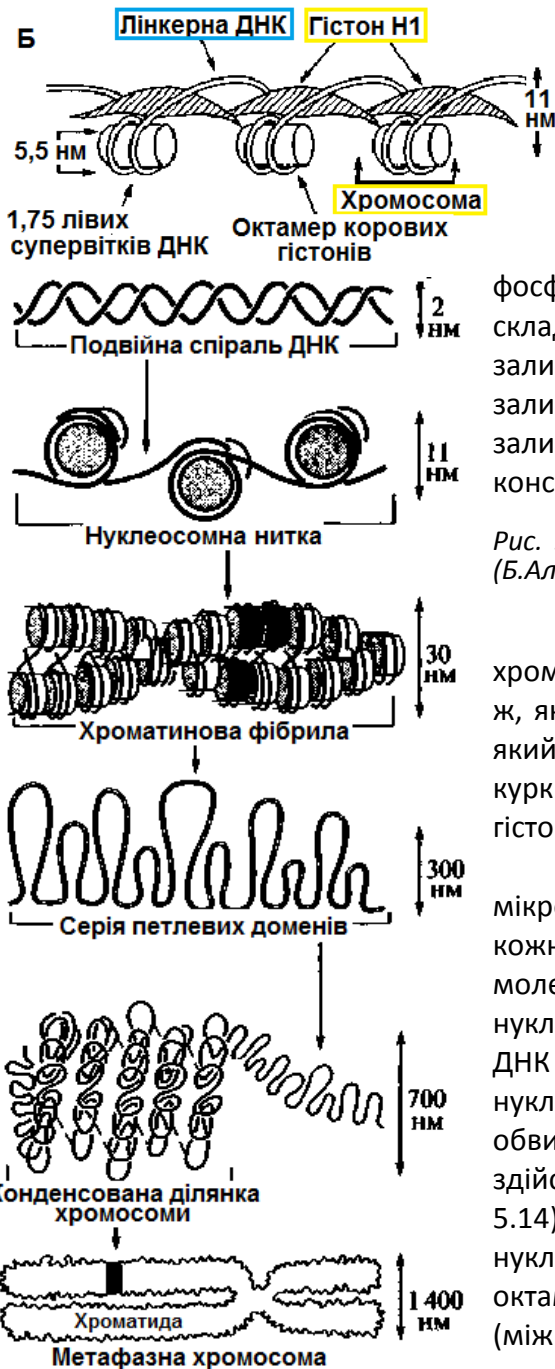
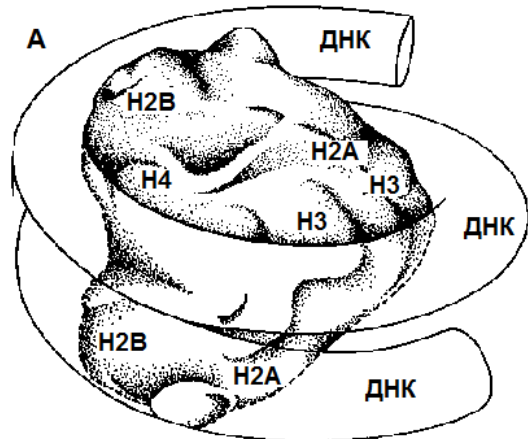
На регуляцію транскрипції у еукаріот має великий вплив упаковка ДНК у складі

хроматину — білково-нуклеїнового комплексу, у якому постійно перебуває ДНК вищих організмів. Зміни в упаковці ДНК безпосередньо впливають на експресію генів. Хроматин є комплексом ДНК і білків (гістонових і негістонових), який забезпечує компактну упаковку

довгих (≥ 1 м) молекул ДНК еукаріот в ядрах клітин. Лінійний чотирьох літерний генетичний код, «словами» в якому є кодони, дозволяє зберігати величезну інформацію в малому об'ємі. Уся генетична інформація, що міститься у геномі людини, закодована в 3×10^9 н.п., може бути упакована в кубик з ребром – 1,5 мкм.

Рис. 5.14. Взаємодія ДНК і гістонів у складі хроматину (Kornberg R., Klug A.).

А — модель нуклеосомного кора: ділянка ДНК завдовжки 145 н.п. обвиває октамер корових гістонів, здійснюючи 1,75 обертів;
Б — схема будови 11 нм фібрили («нитка намиста»).



У складі хроматину є присутніми п'ять білків-гістонів (H1, H2A, H2B, H3 і H4). Гістони - невеликі білки з молекулярною масою від 11,3 кДа (H4) до 23 кДа (H1) з високим вмістом основних амінокислот (Lys і Arg), завдяки чому вони взаємодіють з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК. Так, в гістоні H1 кролика, що складається з 213 амінокислотних залишків, 65 складають залишки Lys і Arg, а в гістоні H3 бика з 135 амінокислотних залишків на долю основних амінокислот доводиться 32 залишки. По первинній структурі гістони дуже консервативні.

Рис. 5.15. Компактизація молекули ДНК у складі хроматину (Б.Албертс та ін., 1984).

Співвідношення гістонів H2A, H2B, H3 і H4 в хроматині нижчих еукаріот (дріжджі, цвільові гриби) таке ж, як в хроматині ссавців. Виключення складає гістон H1 який має варіабельну первинну структуру (в еритроцитах курки заміщений на гістон H5), у хроматині дріжджів гістон H1 взагалі відсутній.

У зображеннях, отриманих методом електронної мікроскопії, хроматин нагадує нитку намиста, в якій кожна намистинка є октамером з гістонів (по дві молекули гістонів H2A, H2B, H3 і H4), що називається нуклеосомним кором. Таким чином, гістони допомагають ДНК організуватися в структурні одиниці, які називаються нуклеосомою. Навколо октамера корових гістонів обвивається ділянка спіралі ДНК завдовжки 145 н.п., здійснюючи 1,75 обертів і утворюючи надспіраль (рис. 5.14). Молекули гістону H1 не входять до складу нуклеосомного кора; вони сполучають між собою окремі октамери, контактуючи з лінкерною ДНК (міжнуклеосомна). Центральна глобулярна частина

гістону H1 приєднується до поверхні нуклеосомного кола, а N- і С-кінцеві ділянки утворюють «плечі», які взаємодіють з лінкерною ДНК і з сусідньою нуклеосою. Субнуклеосомні частки, що містять нуклеосомний кор, гістон H1 і 168 н.п. ДНК, називаються хроматосоми.

Ланцюжок нуклеосоми («нитка намиста») має діаметр ~11 нм і може конденсуватися з утворенням хроматинових фібрил завтовшки 30 нм (рис. 5.15.), в якій є проміжки, що містять нещільно упаковану ДНК. У цих місцях до ДНК приєднуються негістонові білки хроматину (сайт-специфічні ДНК-зв'язуючі білки, що впізнаються особливими послідовностями ДНК). Серед негістонових білків виділяють білки високорухливої групи (HMG- білки). HMG-14 і HMG-17 приєднуються до ДНК в тих ділянках, де йде активна транскрипція генів. Мабуть, приєднання цих білків передує і сприяє зв'язуванню гормон-рецепторних комплексів з ДНК, що активує транскрипцію. Далі в хроматині спостерігаються більш високі рівні конденсації: петельні домени, велетенські петлі ДНК (конденсований хроматин), який суперспіралізується утворюючи метафазні хромосоми (рис. 5.15).

Компактизація ДНК у еукаріот є одним із способів контролю активності генів, оскільки характер укладання ДНК впливає на транскрипційну активність генома. Розрізняють щільно організований (конденсований) хроматин — гетерохроматин, і менш компактний еухроматин, з більшою активністю транскрипції.

Передача спадкової інформації у еукаріот про функціональний статус генів може здійснюватися у вигляді структурної організації хроматину. Ця особливість чітко виражена в інактивації Х-хромосом у ссавців: відомо, що жіночий тип у них визначається наявністю двох Х-хромосом, одна з яких інактивується (ДНК, що міститься в ній, не транскрибується). У мишей інактивація відбувається на 5-6-й день ембріонального розвитку, при цьому Х-хромосома є повністю конденсованою. Неактивна структура однієї з Х-хромосом стійко успадковується.

У складі хроматину гени еукаріот включені в петельні домени різного розміру (від 20 до 200 тис. н.п.) Ці петлі – функціонально незалежні домени, що містять один або декілька генів. Петлі відокремлені один від одного особливими послідовностями — інсуляторами (insulate — ізолювати), особливі білки взаємодіють з ними і впізнають їх. Інсулятори перешкоджають впливу регуляторних послідовностей однієї петлі на експресію генів іншої петлі домену і сприяють цілеспрямованій дії енхансерів на транскрипцію генів домену. Деякі рухливі генетичні елементи (елемент gypsy дрозофіли) містять в собі нуклеотидні послідовності інсуляторів, і їх впровадження в певні ділянки хроматину впливає на експресію генів. Переміщення таких рухливих елементів може змінювати межі доменів, експресія яких контролюється певним енхансером, а впровадження між промотором і оператором може взагалі блокувати транскрипцію.

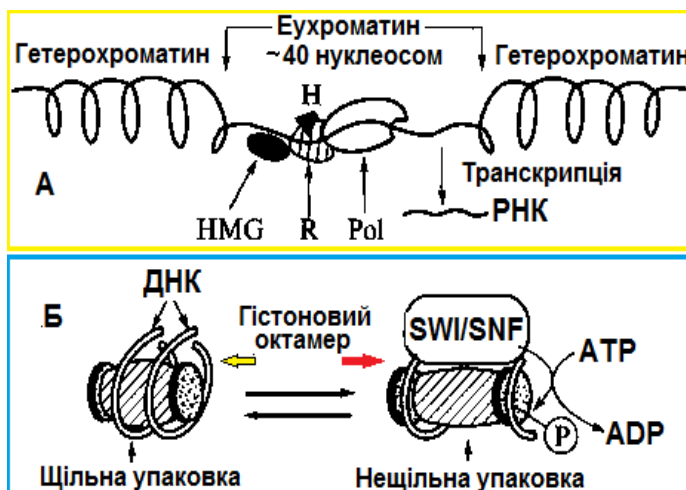


Рис. 5.16. Деконденсація хроматину в зоні активної транскрипції:

А — білки, зв'язані з ДНК в області еухроматину;
 Б — зміна міцності зв'язування гістонів з ДНК по АТФ-залежному механізмі;
 R — рецептор стероїдного гормону;
 H — стероїдний гормон;
 Pol — РНК-полімеразний комплекс;
 SWI/SNF — білковий комплекс, що фосфорилує гістони.

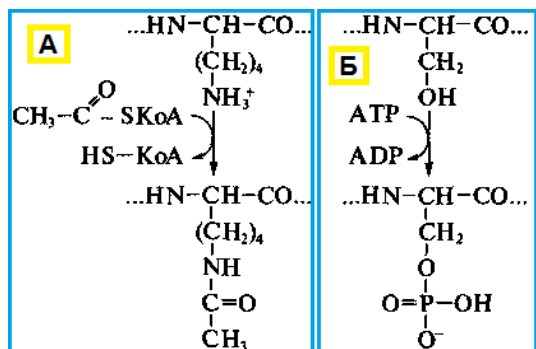
При активації еукаріотичних генів відбувається виборча деконденсація хроматину. Це встановлено в експериментах з ДНКазою I — ферментом,

здатним атакувати ДНК поза суперспіралізованих ділянок. Обробка ДНКазою I викликає деградацію тільки тих ділянок ДНК, яка складає 1/10 частину генома, що транскрибується. У гені лізоциму курки виявлено сім гіперчутливих до ДНКазі I ділянок в області еухроматину (20000 н.п.). Повністю механізм активації хроматину ще не з'ясований. Встановлено, що при декомпактизації хроматину слабшає зв'язок гістону H1 з ДНК. Вільні від гістону H1 області піддаються інтенсивній транскрипції.

Вважають, що корові гістони беруть участь в регуляції ініціації транскрипції. Встановлено, що виборче включення ТАТА-боксів в нуклеосомі блокує роботу РНК-полімерази, проте якщо утворення нуклеосоми відбувається в кодуючій ділянці генів, то транскрипція не блокується, хоча інтенсивність її знижується. Вважають, що гістони запобігають зв'язуванню основних білкових чинників транскрипції (базальних чинників) з ДНК. Так, нуклеосома блокує приєднання чинника TFIID і TBP до ДНК. Відомо, що рецептори глюкокортикоїдів здатні приєднуватися як до вільної, так і організованої в нуклеосому ДНК.

Білки-активатори транскрипції конкурують з гістонами за зв'язок з ДНК. Послаблення зв'язку гістонів з ДНК відбувається швидше за все в результаті взаємодії між білком-активатором і одним з доменів гістону H4. Цей домен, мабуть, не бере участь в складанні нуклеосоми, має ниткоподібну форму і здатний до взаємодії з навколишніми молекулами. Ацетилювання цього (N-кінцевого) домена гістону H4 веде до зниження його позитивного заряду, зміни його конформації і до тимчасового від'єднання від гістонів H2A і H2B. Далі відбувається розкручування ДНК навколо решти гістонів і ДНК стає доступною для базальних чинників транскрипції. Ниткоподібні хвости гістонів H4 і H3 можуть брати участь і в репресії транскрипції, що встановлено для генів дріжджів. N-кінцеві ділянки («хвости») гістонів H3 і H4 найбільш консервативні в еволюційному плані і є об'єктами ряду ковалентних модифікацій, які можуть призводити до зміни взаємодії цих гістонів з іншими компонентами нуклеосоми, а також з самою ДНК і ДНК-зв'язуючими білковими чинниками транскрипції.

Серед ковалентних модифікацій ацетилювання гістонів найбільш важливе для тотальної регуляції транскрипції генів еукаріот. Цей процес каталізується гістонацетильтрансферазою (HATS) - ферментом, здатним переносити ацетилові залишки з



молекули ацетилкоензиму А на залишки лізину в молекулах гістонів і тим самим знижувати їх позитивний заряд (рис. 5.17).

Рис. 5.17. Ковалентні модифікації гістонів, що ослаблюють їх зв'язок з ДНК:

А — ацетилювання, що знімає позитивний заряд із залишків лізину; Б — фосфорилування радикалів серину з утворенням негативно зарядженого залишку фосфосерину.

Встановлений тісний взаємозв'язок між ацетилюванням гістонів, їх взаємодією з ДНК і транскрипцією. Один з компонентів білкового комплексу TFIID у людини містить білок TAFII250, який має ацетильтрансферазну активність і потребує ацетилювання для початку транскрипції. Ацетилювання гістонів має зворотний характер: для їх деацетилювання, ймовірно, потрібний особливий білковий комплекс. Саме ацетилювання стимулюється особливим білковим комплексом (Nat-комплекс), що зв'язується з лінкерною ДНК поблизу сайту приєднання РНК-полімерази.

Фосфорилування гістонів є ще одним шляхом активації транскрипції. Цей АТР-залежний механізм, в основі якого лежить фосфорилування радикалів серину корових гістонів (рис. 5.17.). У фосфорилуванні гістонів бере участь специфічний білковий комплекс, підсумок роботи якого полягає в послабленні зв'язку гістонів з ДНК. Менш щільна упаковка ДНК у складі нуклеосоми після фосфорилування гістонів створює умови для успішної ініціації

і елонгації транскрипції. В ході елонгації транскрипції, здійснюваної РНК-полімеразою I, нуклеосома розташовується перед і після працюючої полімерази, що вказує на можливість переміщення нуклеосоми або їх руйнування (перевертання) і реконструкцію після проходження ферменту (рис.5.18.). Білковий комплекс SWI/SNF, задіяний у фосфорилуванні гістонів (рис.5.16), бере участь в подоланні РНК-полімеразою нуклеосомного бар'єру під час елонгації транскрипції.

Останніми роками встановлено, що у дріжджів, рослин і ссавців модифікації гістонів можуть регулюватися за участю малих інтерферуючих РНК(міРНК). міРНК здатні також спрямовувати процес метилування ДНК, що призводить до утворення гетерохроматину і репресії транскрипції певних генів.



Рис. 5.17. Зміни в нуклеосомній організації хроматину під час транскрипції (гіпотетична модель).

Регуляція трансляції.

Біосинтез білків в клітинах про- і еукаріот визначається як

загальними для усіх типів клітин механізмами, так і специфічними елементами контролю, більшою мірою властивими білоксинтезуючої системі еукаріот.

Перший етап регуляції трансляції ще до початку біосинтезу білку на рибосомах пов'язаний з діяльністю аміноацил-тРНК-синтетаз. Встановлено, що АРСази взаємодіють з усіма тРНК, але проявляють вибірковість до певних акцепторних ділянок тРНК. Помилки, що допускаються АРСазами, при синтезі аміноацил-тРНК, дуже рідкісні (1 на 10 000 реакцій). У разі помилки, АРСази здатні до самокорекції: вони гідролізують зв'язок між тРНК і неправильними приєднаними амінокислотними залишками.

Ініціація трансляції на рибосомах є ключовим моментом регуляції усього процесу і включає декілька механізмів. У прокариот, мРНК яких не містять Кепа і відсутня кеп-залежна регуляція ініціації, провідну роль в запуску трансляції грає «сила» послідовностей ініціації мРНК. Чим довше ця послідовність і чим вище її компліментарність до 16S рРНК, тим швидше досягається ініціація трансляції. Окрім цього має місце регуляція ініціації за рахунок просторової структури ділянки мРНК, що ініціює згортання цієї ділянки в стабільну вторинну і третинну структуру і може блокувати ініціацію. Для продовження трансляції необхідно, щоб рибосома «розплела» цю структуру або спрацювали дестабілізуючі білкові чинники. Виборча негативна регуляція трансляції може досягатися зв'язуванням білків-репресорів з сайтом ініціації мРНК.

Регуляторними білками можуть виступати спеціалізовані білки: білкові чинники трансляції, а також інші білки контролю трансляції або білки, що мають в клітині інші функції, але здатні за певних умов виступати в ролі регулювальників трансляції. Н., трансляція мРНК ферменту треоніл-тРНК-синтетази у бактерій контролюється самим продуктом трансляції. Надлишковий синтез цього ферменту призводить до того, що частина його молекул зв'язується з 5'-нетрансльованою областю, властивою мРНК, внаслідок чого в цій області формується шпилькова структура, що перешкоджає зв'язуванню рибосом з триплетом ініціації. В результаті такої авторегуляції ініціація трансляції мРНК треоніл-тРНК-синтетази зупиняється. Такий спосіб регуляції трансляції за принципом зворотного зв'язку, характерний і для трансляції рибосомних білків бактерій. Зазвичай бактеріальна клітина не допускає надпродукції рибосомних білків, синтезуючи їх в кількості, достатньої для зборки рибосом. Синтез цих білків відбувається скоординовано не дивлячись на те, що їх гени представлені оперонами, розсіяними по усій ДНК, на яких синтезуються поліцистронні мРНК, що кодують групи рибосомних білків. Координація синтезу досягається тим, що один з білків може виступати репресором трансляції своєї мРНК. Н., один з продуктів трансляції (білок S7)

поліцистронної мРНК (кодує також білок S12 і фактори елонгації EF-Tu і EF-G) при підвищенні концентрації в клітині здатний прикріпитися до певної ділянки мРНК і блокувати трансляцію усіх кодованих нею білків. Таким чином, регуляція синтезу рибосомних білків йде по простому і елегантному механізму: репресія синтезу цих білків настає тоді, коли вичерпується кількість рРНК, необхідна для зборки рибосом (білки рибосом через їх високу спорідненість до рРНК використовуються для формування рибосом, по мірі використання рРНК надлишок рибосомних білків пригнічує трансляцію власних мРНК).

У клітинах еукаріот білком-репресором початкового етапу трансляції певних білків може виступати один з ферментів вуглеводного обміну - аконітатгідратаза. Цей фермент каталізує взаємоперетворення лимонної і ізолимонної кислот з утворенням проміжної сполуки цис-аконітової кислоти. Встановлено, що цей фермент також задіяний в регуляції трансляції мРНК феритину - білку, що зв'язує токсичні для клітин іони заліза. Регуляція трансляції цієї мРНК залежить від певної послідовності, що утворює шпилькову структуру в області 5'-нетрансльованої ділянки її молекули. Ця шпилька у відсутності заліза зв'язується із специфічним білком-репресором - аконітат-гідратазою, яка стабілізує структуру шпильки і перешкоджає просуванню (скануванню) рибосом по 5'-кінцю мРНК, пригнічуючи таким чином ініціацію трансляції мРНК-феритину. Репресор, що має спорідненість до іонів заліза, при підвищенні їх концентрації в клітині відходить від мРНК, що і викликає ініціацію трансляції і синтез феритину. Синтезований феритин здатний віднімати залізо у білка-репресора, який знову може зупинити трансляцію по вищезгаданому механізму (рис. 5.18).

Елонгація трансляції також схильна до регуляції, на що вказує непостійна швидкість трансляції, виявлена при "прочитанні" рибосомами різних мРНК. Така переривчаста елонгація трансляції виявлена при синтезі глобінних ланцюгів, в інтактних клітинах і безклітинних системах синтезу інших білків: фіброїну шовку, вітеллогеніна і сироваткового альбуміну хребетних, білків вірусу тютюнової мозаїки і білку оболонки фага MS2.

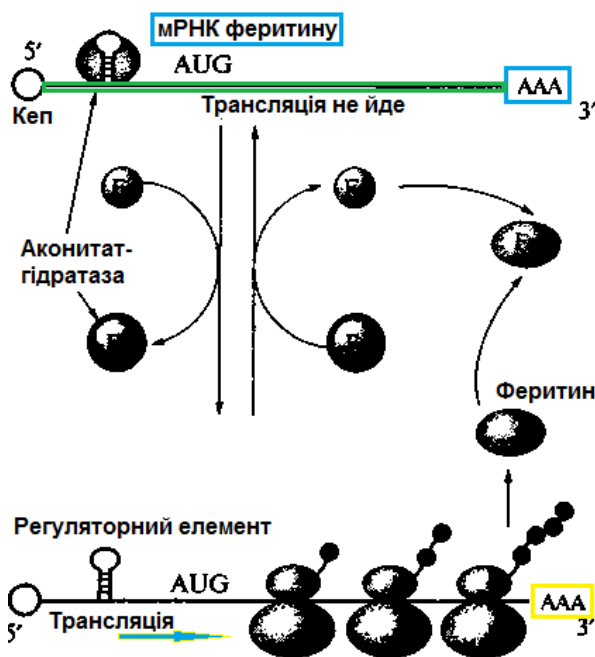


Рис.5.18. Регуляція трансляції мРНК феритину за участю аконітатгідратази і іонів заліза.

Паузи трансляції пов'язані:

1) з тим, що рибосоми можуть затримуватися на кодонах, яким відповідають мінорні ізоакцепторні тРНК (присутні в клітинах в малих кількостях). Кодони мінорних тРНК називають ще модульними, оскільки вони можуть зменшувати швидкість трансляції.

2) уривчастість трансляції полягає в неоднаковій доступності різних ділянок мРНК для рибосом: швидкість трансляції знижується при подоланні рибосомами стабільних елементів вторинної і третинної структури різних ділянок мРНК. Подоланню «важких»

ділянок мРНК у еукаріот сприяє чинник елонгації eEF-2, що володіє на відміну від чинника EF-G прокаріот РНК-зв'язуючою і РНК-хеліказною активністю.

3) Третє пояснення пауз трансляції пов'язане з діяльністю особливих регуляторних білків або малих рибонуклеопротейнів (мРНП-часток). У еукаріот таку здатність має мРНП-частка, що містить 7S РНК. Вона визначає особливу гідрофобну послідовність (сигнальний пептид) на N-кінці білку, що синтезується, приєднується до транслуючої рибосоми і затримує елонгацію до тих пір, поки рибосома не вступить у взаємодію з мембраною

ендоплазматичного ретикулула, куди повинен впровадитися сигнальний пептид. Переривчастий характер просування рибосом по мРНК, ймовірно, пов'язаний з можливостями «перекодування» мРНК.

Вищі еукаріоти для тонкої регуляції трансляції мають особливі можливості, пов'язані із структурною організацією їх мРНК. мРНК в клітинах еукаріот контактують з білками у вигляді ядерних і цитоплазматичних рибонуклеопротеїдних комплексів (мРНП). На відміну від прокариот експресія мРНК у еукаріот відбувається не відразу після синтезу, а тільки після закінчення процесінгу і виходу мРНК з ядра в цитоплазму, де здійснюється цитоплазматичний контроль біосинтезу білку, пов'язаний з відбором і селективною активацією або інактивацією різних популяцій мРНК. Механізми цитоплазматичного контролю реалізуються в основному за допомогою взаємодії особливих білків - чинників контролю трансляції - з визначеними ділянками молекули мРНК (рис. 5.19).

У мРНК еукаріот за Кепом розташовується 5'-нетранслююча область (5'-UTR), з якою зв'язуються білки регуляції ініціації трансляції. До їх числа відносяться власне білкові чинники ініціації (eIF), а також білки-репресори трансляції. У ініціації трансляції бере участь також 3'-ділянка, яка не транслюється (3'-UTR) і полі(А)-хвости мРНК. У 3'-UTR є особливі послідовності: сигнали поліаденілування і сигнал внутрішньоклітинної локалізації. Із 3'-UTR здатні зв'язуватися маскуючі білки (вони роблять мРНК недоступною для трансляції рибосомами) і дестабілізуючі білки, що детермінують доступність мРНК для нукліаз і визначають час життя мРНК в клітині. У довгій ділянці 3'-UTR приєднується також білок мРНП.

Кодуюча ділянка мРНК здатна зв'язуватися не лише з чинниками елонгації eEF, APCази і рибосоми, але і коровим білком мРНП-часток, а також з певними ферментами, необхідними для процесу трансляції. У кодуючій області мРНК розташовані також сигнали перекодування (репрограмування) трансляції, завдяки яким з однією і тією ж мРНК можуть транслюватися різні білки.

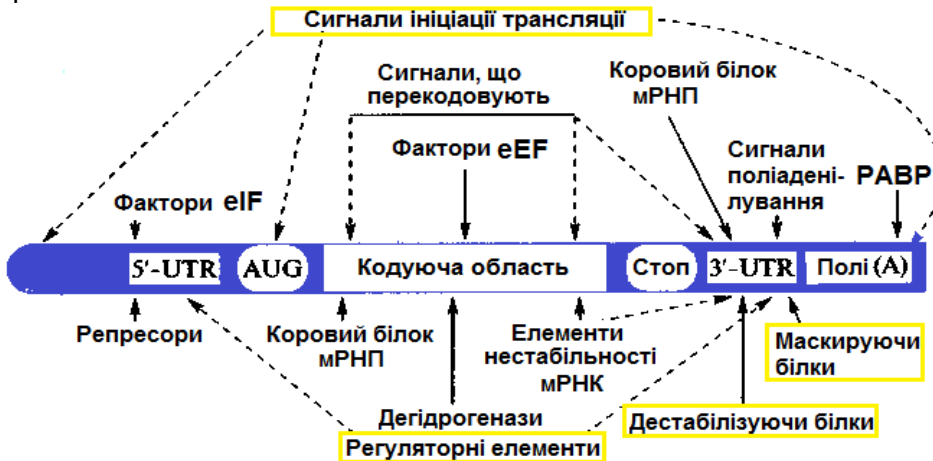
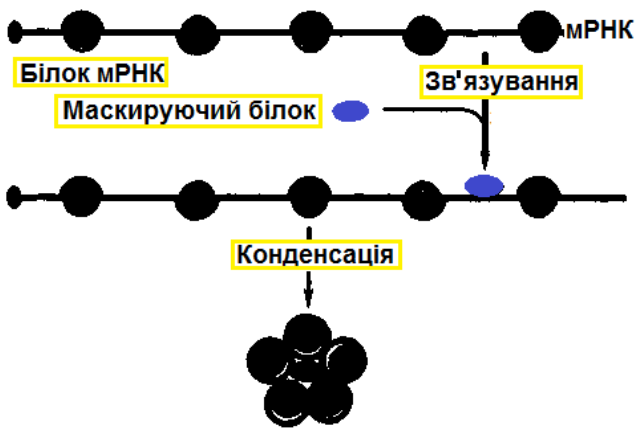


Рис. 5.19. Схема розташування функціональних ділянок в молекулі мРНК еукаріот (О.С. Спін, 1996). Суцільні стрілки - області приєднання білків, які беруть участь в регуляції трансляції, пунктирні стрілки - регуляторні послідовності (сигнали) в різних ділянках мРНК.

Механізми контролю трансляції за участю інших ділянок мРНК.

3'-UTR грає, ймовірно, вирішальну роль в активації (чи інактивації) і деградації мРНК, внутрішньоклітинній локалізації і структурній організації мРНП. Ця область відповідає за маскування мРНК і посилення трансляції. Маскування здійснюється білками, які роблять мРНК недоступною ні рибосомам, ні ферментам деградації (нуклеазам). Така мРНК набуває стабільної і неактивної в сенсі трансляції форми і називається запасною мРНК. Ця РНК властива ооцитам і сперматозоїдам, а в окремих випадках і соматичним клітинам.

3'-UTR і пов'язані з нею білки беруть участь в блокуванні ініціації трансляції, яка відбувається на протилежному кінці мРНК (5'-UTR). Припускають, що 3'- і 5'-UTR контактують один з одним або за допомогою білка-посередника, або завдяки прямому зближенню, що відбувається із зміною структури мРНП. В цьому випадку під дією маскуючого білку релаксована (втягнута) форма мРНП, може переходити у конденсовану форму (компактну),



завдяки чому 5'- і 3'-UTR зближуються (Рис. 5.20). До 3'-UTR здатні приєднуватися дестабілізуючі білки, які стимулюють швидку деградацію певних видів мРНК. Такі короткоживучі мРНК виявлені у цитокінінів і протоонкогенів (с-тус, с-фос та ін.).

Рис. 5.20. Передбачуваний механізм маскування мРНК (О.С.Спін, 1996).

Вони містять в 3'-UTR AU-багаті послідовності, які, розпізнаються дестабілізуючими білками. Навпаки, існують

білки, що стабілізують мРНК, які взаємодіють з особливими структурними елементами в 3'-UTR і захищають мРНК від атаки нуклеаз. До них відноситься вищезгадана аконітат-гідратаза, регулююча трансляцію мРНК феритину.

Істотну роль в регуляції трансляції грає і полі(А) послідовність на 3'-кінці мРНК. Сигналом для ядерного поліаденілювання є послідовність AAUAAA, розташована близько 3'-кінця молекули. У ооцитах амфібій і сухих зародках пшениці процесінг мРНК в ядрі не відбувається, мРНК не використовуються протягом певного часу для біосинтезу білка.

Активація цих мРНК супроводжується їх поліаденілюванням в цитоплазмі, для чого служить певний сигнал в 3'-UTR (у амфібій таким сигналом є послідовність (U) 6 AUAAAG).

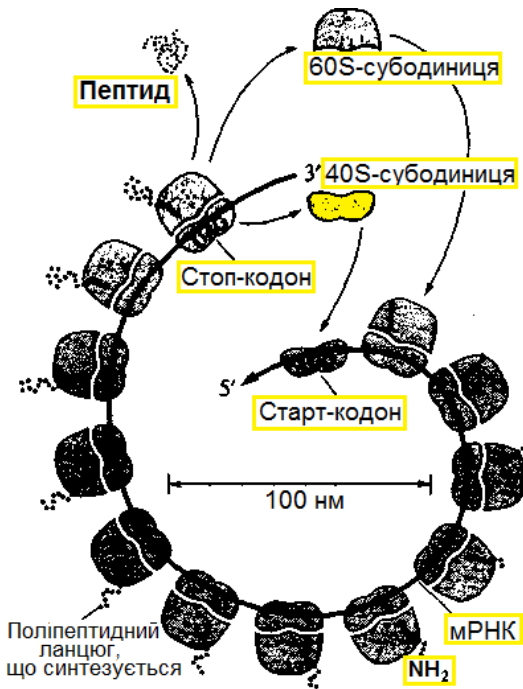


Рис. 5.21. Схематичне зображення полірибосоми, що демонструє можливість зближення 5'- і 3'-кінців молекули мРНК, де розташовані КЕП, 5'-UTR і полі (А)-хвіст, які беруть участь в ініціації трансляції (Б. Албертс та ін., 1994).

Полі (А)-хвіст мРНК знаходиться часто в комплексі з полі (А)-зв'язуючим білком (РАВР), молекули якого виконують функцію стабілізаторів мРНК. РАВР містить чотири РНК-зв'язуючих домена, і його комплекс з полі (А)-хвостом оберігає мРНК від деградації, а також виступає енхансером ініціації трансляції. Припускають, що РАВР полегшує приєднання 60S-субодинаці рибосоми еукаріот до комплексу 40S-субодинаці. Цей процес вимагає зближення Кепа і 5'-UTR з полі(А)-хвостом, що

досягається в ході трансляції еукаріотичних мРНК при утворенні полірибосом (полісом) - структур, що складаються з однієї молекули мРНК і пов'язаних з нею рибосом, що здійснюють послідовну інтенсивну трансляцію цієї мРНК (рис. 5.21).

Методом електронної мікроскопії встановлено, що полірибосоми в клітинах еукаріот мають замкнуті структури типу «кола», «розеток» і тому подібне. Разом з білками, що розпізнають певні ділянки в мРНК, еукаріотам властива особлива група неспецифічних мРНК-зв'язуючих білків, які універсально взаємодіють з усіма мРНК. Вони формують в цитоплазмі матричні рибонуклеопротеїни (мРНП), або інформосоми.

Серед них переважає білок р-50, який зв'язується як з вільними мРНК, так і з полісомами. Цей білок, як і багато інших білків мРНП, фосфорилується за участю ферментів, які також виявлені у складі білків, що зв'язуються з мРНК. Зрозуміло, що зміна заряду білку р-50, що відбувається в результаті фосфорилування/дефосфорилування, здатна впливати на

ефективність його зв'язування з мРНК.

Перепрограмування трансляції. Вважалося, що послідовність нуклеотидів мРНК завжди транлюється безперервно від сайту ініціації до термінального кодону. А останні роки були відкриті можливості динамічного перепрограмування трансляції, внаслідок чого по ходу трансляції може змінюватися первинна структура білку, що синтезується. Таким чином, мРНК може бути матрицею для синтезу різних по структурі білків. Встановлено, що клітини і віруси, що вражають їх, з малим числом генів здатні «економно» використовувати свій генетичний потенціал не лише шляхом альтернативного сплайсингу але і за рахунок перепрограмування (перекодування) мРНК.

Зміна рамки зчитування (перепрограмування трансляції і порядку зчитування кодонів мРНК) зазвичай відбувається на один - два нуклеотиди у різних напрямках: у бік 5'-кінця мРНК (-1 н.) або у бік 3'-кінця (+1, +2 н.). Так відбувається у тому випадку, коли кодуєчі (трансльовані) області деяких мРНК виявляються "пошкодженими" присутністю в їх складі термінальних кодонів. Проте такі мРНК все ж можуть транлюватися за рахунок зміни рамки зчитування, для чого потрібна наявність певних сигналів в трансльованій області (рис. 5.22.).

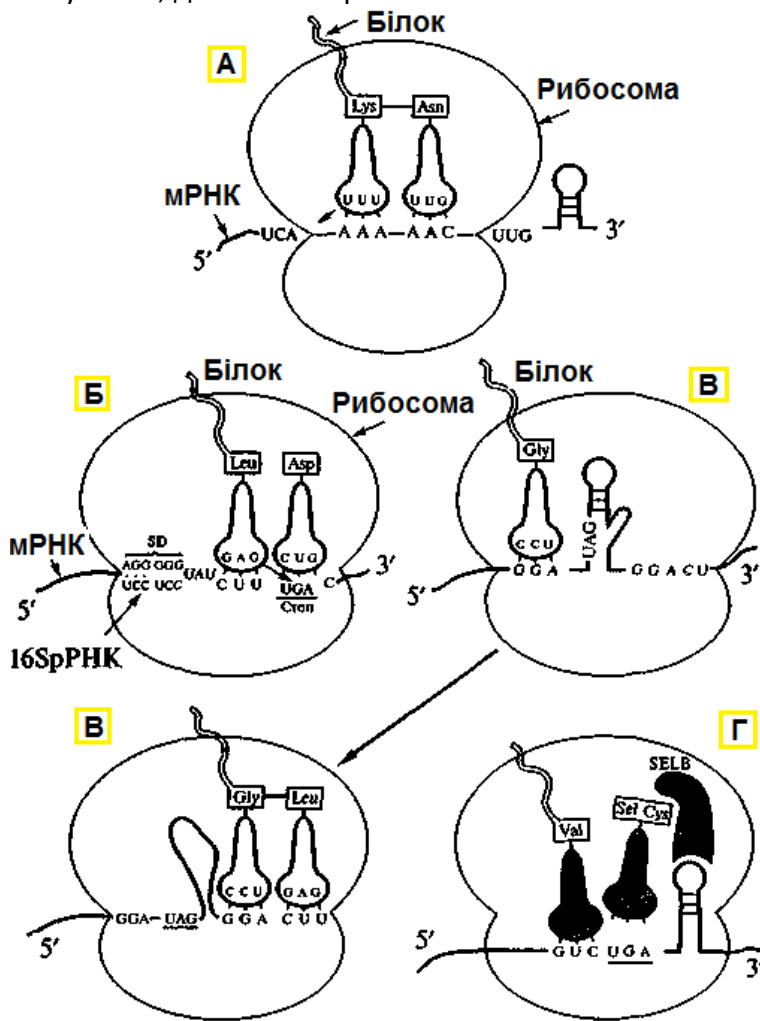


Рис. 5.22. Перепрограмування в ході трансляції:

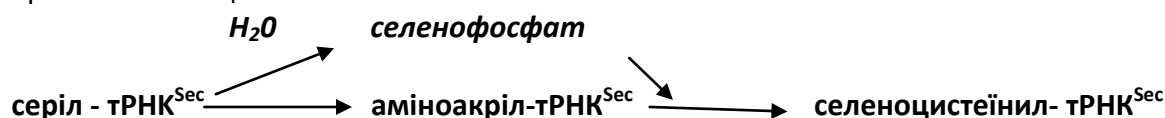
А - зміщення рамки зчитування на (-1) при трансляції вірусної РНК;
 Б - зміщення рамки зчитування на (+1) при трансляції мРНК бактеріального чинника термінації RF-2 (SD-послідовність Шайна-Дальгарно);
 В - «стрибок» рибосоми на 50 нуклеотидів при трансляції мРНК одного з білків бактеріофага T4;
 Г - зчитування термінального кодону UGA, як кодону амінокислоти селеноцистеїна (Sec) при біосинтезі форміатдегідрогенази у *E.coli*.

Зміщення рамки зчитування на (-1) при трансляції РНК ретровірусів відбувається в ділянці особливої гептануклеотидної послідовності перед шпильковою структурою (рис. 5.22). У бактерій при трансляції мРНК, що кодує білковий чинник термінації RF2, зрушення рамки на (+1) також залежить від оточення кодону UGA, що термінує. У інших випадках рибосоми в ході трансляції можуть здійснювати «стрибки», які обходять термінальний кодон і

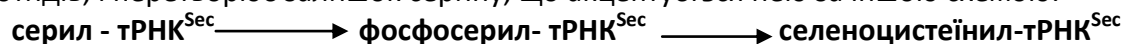
пропускають значну частину кодуєчої послідовності мРНК, що має особливу петельну структуру. Так, при трансляції мРНК фага T4 рибосома переходить з кодону GGA (кодує Gly) на кодон GGA, віддалений від першого на 50 нуклеотидів і обходить термінальний кодон UAG і петлеподібну область мРНК, що йде за ним.

До перекодування відносять включення в поліпептидні ланцюги ряду білків рідкісної, але функціонально важливої (21-й) амінокислоти - селеноцистеїна. Приєднання унікальною по структурі аміноацил-тРНК (tРНК^{Sec}), що переносить залишок селеноцистеїна, відбувається в ході трансляції до термінального кодону UGA, якщо за ним розташована особлива

стимулююча послідовність мРНК. Ця послідовність може розташовуватися на значному видаленні (≥ 200 н.) від місця зв'язування $tRNA^{Sec}$ і локалізуватися в 3'-UTR мРНК (рис. 5.21). $tRNA^{Sec}$ має комплементарний кодону UGA антикодон ACU і акцептує залишок серину. В результаті виникає серил- $tRNA^{Sec}$, яка потім у бактерій перетворюється в результаті ряду перетворень в селеноцистеїнил- $tRNA^{Sec}$ за схемою:



У *E. coli* $tRNA^{Sec}$ (продукт гена SelC) містить 76 нуклеотидних залишків. Її первинна і вторинна структури розшифровані (рис. 5.23). $tRNA^{Sec}$ печінки бика складається з 90 нуклеотидів, і перетворює залишок серину, що акцептується нею за іншою схемою:



Для прикріплення $tRNA^{Sec}$ до рибосоми потрібний специфічний білковий чинник SEL B (мол. маса 68 кДа), який є аналогом чинника елонгації EF-Tu з N-кінцевим доменом, що зв'язує GTP (ГТФ). У мРНК форміатдегідрогенази (білок *E. coli*, який містить селеноцистеїнил) ідентифікована особлива зона впізнання завдовжки 40 н. в області кодону UGA, що слугує для приєднання селеноцистеїнил- $tRNA^{Sec}$, яка відрізняє це місце від інших стоп-кодонів.

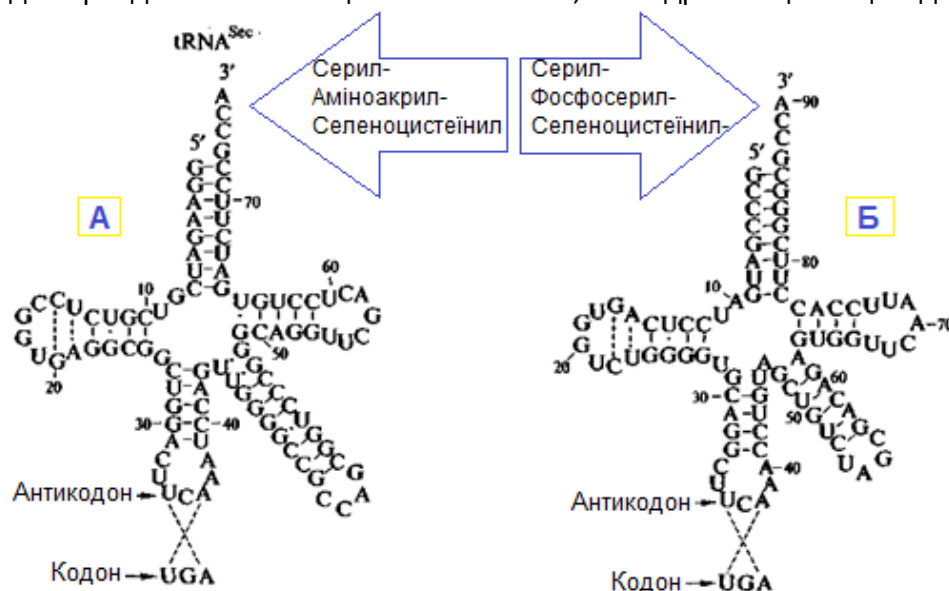


Рис. 5.23. Структура $tRNA^{Sec}$ (Stadtman T. C., 1996): А - структура $tRNA^{Sec}$ прокаріот. У *E. coli* $tRNA^{Sec}$ акцептує серин, а потім перетворюється в селеноцистеїнил- $tRNA^{Sec}$; Б - структура $tRNA^{Sec}$ еукаріот. У печінці бика $tRNA^{Sec}$ також акцептує серії, а потім перетворюється на селеноцистеїнил- $tRNA^{Sec}$.

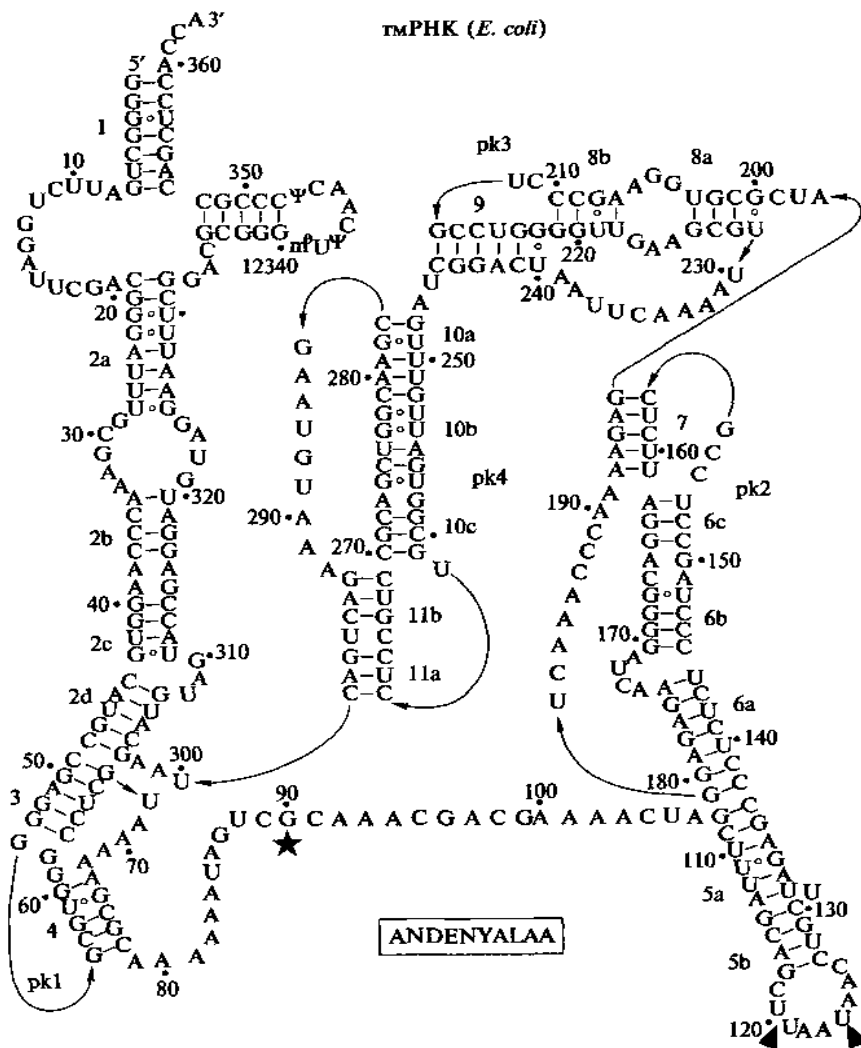
Цей елемент структури мРНК дуже важливий, оскільки встановлено, що два

інших стоп-кодона (UAA і UAG) можуть служити для включення селеноцистеїна в синтезований пептид, якщо вони асоційовані з такою «впізнаною» зоною в мРНК.

До перепрограмування умовно може бути віднесений і активно досліджуваний в останні декілька років процес транстрасляції, коли синтез поліпептиду, початий рибосомою на одній мРНК, потім перемикається на трансляцію іншої РНК. Такий варіант трансляції був виявлений у еубактерій. Він проходить за участю незвичайного виду РНК - тмРНК (10S аРНК). Така невелика по розмірах РНК поєднує в собі властивості транспортної і матричної РНК. Вона бере участь в звільненні рибосом, не здатних закінчити біосинтез білку на мРНК, які втратили в результаті випадкової модифікації стоп-кодони.

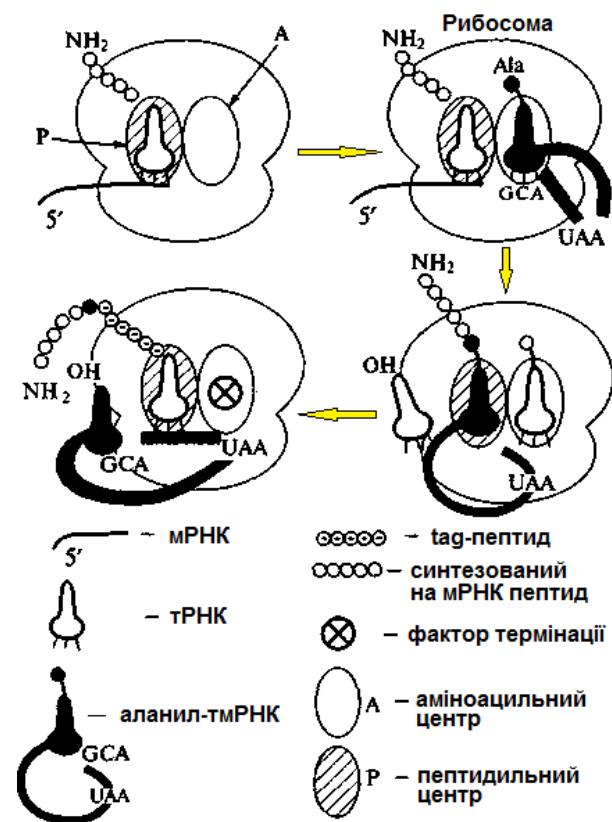
У *E. coli* тмРНК кодується моноцистронним геном *ssrA*, що має власний промотор і термінатор. Розмір тмРНК варіює від 349 до 411 нуклеотиду. Нині визначена нуклеотидна послідовність тмРНК більш ніж у 50 видів бактерій. Створена модель вторинної структури тмРНК, заснована на порівняльному аналізі первинної структури цієї РНК з 50 мікроорганізмів (рис. 5.24).

У вторинній структурі тмРНК виражені три ділянки: одна з них включає 3'- і 5'-кінці молекули і утворює характерну $tRNA$ -подібну структуру, що складається з акцептуючого



стебла і РРС-петлі. Друга ділянка містить лінійну транслуючу (матричну) послідовність. Третя, сильно структурована ділянка включає тРНК- і мРНК-подібні області молекули. Трансльована ділянка тмРНК кодує короткий поліпептид - tag-пептид, який упізнається специфічними протеазами. Кодуючої tag-пептид послідовності передують типова адапторна послідовність Шайна-Дальгарно (AAGG).

Рис. 5.24. Модель вторинної структури тмРНК *E. coli* (М. Е. Зверев та ін., 2000). Зірочкою позначений початок трансльованої ділянки; А - стоп-кодони в рамці зчитування; pk1-pk4 – псевдовузли. У рамці виділена амінокислотна послідовність tag-пептида.



рибосоми від'єднується гібридний білок, що утримує на С-кінці tag-пептид, який

Взаємодія тмРНК і

70S рибосом досліджена в системі трансляції *in vitro*. За результатами дослідження розроблена модель транстрансляції за участю тмРНК, здатною акцептувати амінокислоту аланін з утворенням аланіл-тмРНК. Згідно цієї моделі, схема якої представлена на рис. 5.25., аланіл-тмРНК входить в А-центр рибосоми у той момент, коли трансляція зупиняється на 3'-кінці пошкодженою мРНК, у якій відсутній стоп-кодон.

Рис. 5.25. Схема транстрансляції за участю аланіл-тмРНК (М. Е. Зверев та ін., 2000).

Недосинтезований поліпептидний ланцюг переноситься на аланіл-тмРНК (реакція транспептидирування), і далі рибосома продовжує трансляцію, використовуючи матричну ділянку тмРНК. Синтез продовжується до вступу в А-центр стоп-кодона тмРНК (UAA), після чого вступає в дію чинник термінації і трансляція завершується. Після термінації трансляції від

«розпізнається» протеазами, що атакують і руйнують незвичайний продукт трансляції. Термінація звільняє раніше пов'язану рибосому, яка далі може брати участь в синтезі інших білків.

Таким чином, тмРНК виконує дві істотні функції: звільняє рибосоми від зв'язку з дефектними мРНК і одночасно сприяє швидкій деградації «неправильних» білків, приєднуючи до них tag-пептид, що упізнається протеазами.

Оскільки тмРНК відсутня у вищих організмів, не виключена можливість її використання як мішені при створенні нових антибактеріальних препаратів, які могли б блокувати функції тмРНК у бактерій і привести до загибелі патогена, не зачіпаючи синтез білків людини.

Епігенетична регуляція експресії генів.

Епігенетика вивчає спадкові зміни в фенотипі або в експресії генів, що зумовлені іншими, не генетичними механізмами. Найкращим прикладом епігенетичних змін у еукаріот є процес диференціації клітин. На сучасному етапі розвитку науки виявлена низка епігенетичних феноменів, до яких належать ефект положення, парамутація, трансвенція, РНК-інтерференція, пріонізація білків, супресія транспозонів, геномний імпринтинг, особливий стан хроматину, метилювання ДНК і інактивація Х-хромосоми (рис. 5.26).

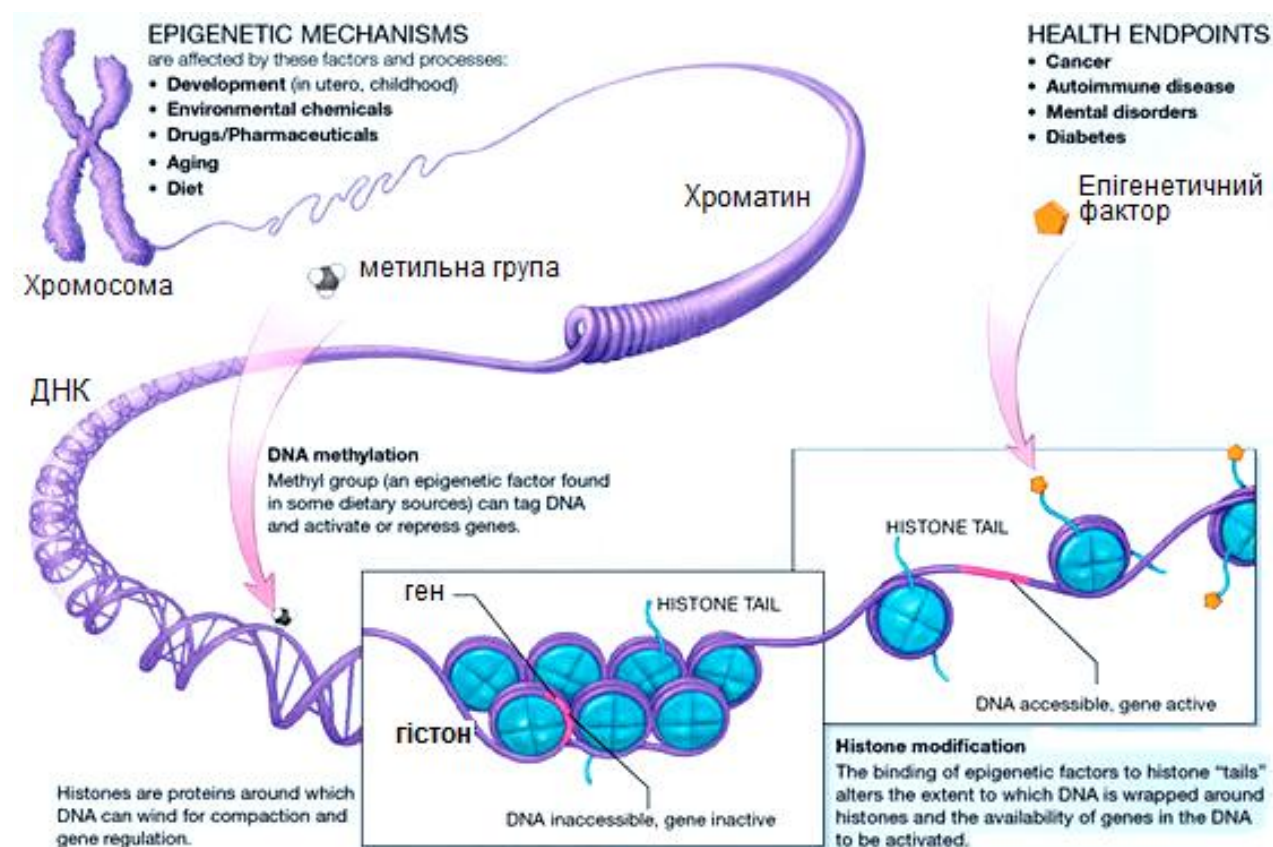


Рис. 5.26. Епігенетичні механізми.

Процеси, що керують програмою розвитку, називаються *епігенетичними*. Можливо, програма розвитку, закладена в генах зародка, «включає» або «вимикає» їх (на певний час або назавжди) у заздалегідь заданій послідовності. При цьому змінюється склад білків у клітинах, що знову формуються, і тим самим змінюються властивості клітин. Наявність програми розвитку не пояснює, чому доля перших клітин різна. На ДНК повинен діяти якийсь процес, що керує розгортанням програми, та відбирає ті або інші гени для «включення» або «вимкнення» в даній клітині на цей час. Без цього всі соматичні клітини тіла, які мають одноковий геном, розвивалися б однаково. Крім того, щось повинно керувати передачею

розподілу станів «включений-вимкнений» між генами від одного покоління клітин до іншого. Дочірнім клітинам призначається зберегти рівень диференціювання батьківської клітини або перейти до спеціалізації.

З генетичної точки зору питання про причини диференціювання трильйонів (10^{12}) тотипотентних клітин організму людини зводиться до проблеми диференціальної експресії генів у різних клітинах організму, який розвивається. Зрозуміло, що стабільна підтримка цих відмінностей зумовлена епігенетичним контролем генної експресії. На теперішній час під епігенетичною мінливістю розуміють зміну експресії генів без зміни первинної структури ДНК. Епігенетична регуляція - це модифікація генної експресії, яка зумовлена потенційно зворотними змінами у структурі хроматину в результаті метилювання ДНК.

Інтенсивні дослідження регуляції активності генів різних видів мікроорганізмів, рослин, комах, тварин і людини, секвенування геномів, привели до відкриття різних епігенетичних процесів. Експресія генів в багатьох випадках активно регулюється, змінюючи час та кількість синтезованого генетичного продукту. Кілька етапів у процесі експресії генів можуть модулюватися, зокрема транскрипція і посттрансляційна модифікація. Регулювання експресії генів надає клітині контроль за кількістю та структурою синтезованих біополімерів і є основою диференціації клітин, морфогенезу і адаптації організму до умов навколишнього середовища. Більшість генів людини здатні продукувати різні поліпептиди в клітинах різних тканин і на різних стадіях онтогенезу. Наприклад, один з генів у клітинах щитоподібної залози продукує фермент, який знижує вміст кальцію в крові, а в клітинах гіпоталамуса він утворює поліпептид, який розширює судини.

Імпринтинг генома. Поняття «імпринтинг» (від англ. «відбиток») вперше застосував Хелен Кроуз (1960 р.) для опису селективної елімінації батьківських хромосом у комах. Імпринтинг – епігенетичний процес, при якому відбувається диференційне маркування материнських і батьківських гомологічних хромосом, що призводить до різних фенотипових проявів у потомстві мутантних генів, які успадковуються від матері або батька.

Всі ми отримуємо один набір генів від матері, інший - від батька. У більшості генів працюють обидві копії. Але є гени, в яких працює або материнська, або батьківська алель. Інша алель в цьому випадку не діє, «мовчить» - вона «знаходиться під імпринтингом». Такий спосіб регуляції роботи генів свідчить про нееквівалентний внесок батьків у геном потомків.

Зазвичай для синтезу будь-якого білка організму достатньо однієї алелі гена. Якщо в геномі зародка, який розвивається, є і материнські і батьківські гени, то будь-який імпринтований ген має працюючу алель. Імпринтовані гени і транскрипти виявлені на багатьох хромосомах людини – 1,5,6,7,13,15,19,20. Відомо близько 30 таких генів і транскриптів, і передбачається, що їх число може досягати 500.

Встановлений кластер імпринтованих генів, розташованих на довгому плечі хромосоми 15 людини. Порушення роботи даних генів призводить до двох класичних хвороб генома імпринтингу: синдрому Ангельмана (СА) і синдрому Прадера-Віллі (СПВ). Ці захворювання мають різні клінічні ознаки (ожиріння, розумова відсталість, гіпогонадізм при СПВ і атаксію; при СА - гіперкінези, пароксизмальний сміх, відсутність мови), але при цитогенетичному дослідженні в обох випадках у більшості хворих виявляється делеція загальної ділянки q11- q13 хромосоми 15. При аналізі батьківського походження хромосом виявлено, що СПВ виникає в результаті делеції батьківської хромосоми 15, а СА-материнської.

Запропоновано гіпотези, які пояснюють функцію імпринтингу генома. Одна з них пояснює роль імпринтингу з погляду захисту генома хазяїна від проникнення в нього чужорідних елементів. Згідно з цією теорією, імпринтинг, і зокрема метилювання ДНК, це захисний механізм, який забезпечує інактивацію послідовностей ДНК, таких, як транспозони і провірусні ДНК.

Імпринтована експресія певного гена в окремій клітині або тканині не означає, що він (ген) буде імпринтований в усі інші, а його відсутність в деяких тканинах зовсім не виключає його наявності в інших. Отримані дані про те, що тканиннспецифічна епігенетична модифікація генів є одним з основних механізмів, що забезпечують диференціальну експресію генів клітин різних тканин під час онтогенезу.

Метилування ДНК. Метилування ДНК - це модифікація молекули ДНК без зміни нуклеотидної послідовності ДНК, що можна розглядати як частину епігенетичної складової генома. Метилування ДНК полягає в приєднанні метильної групи до цитозину у складі CpG - динуклеотида у позиції С5 цитозинового кільця.

Метилування ДНК вважається, в основному, властивим еукаріотам. У людини метиловано близько 1% ДНК генома. У соматичних клітинах дорослого організму метилування ДНК зазвичай відбувається в CpG - динуклеотидах; метилування ДНК зовні CpG - динуклеотидів зустрічається в ембріональних стовбурових клітинах.

У рослин метилування цитозина відбувається як симетрично по обох ланцюгах (на CpG або CpNpG), так і асиметрично лише на одному з двох ланцюгів (на CpNpNp, де N означає будь-який нуклеотид).

Метилування ДНК у ссавців. Близько 60-70 % усіх CpG-динуклеотидів у ссавців метиловані. Неметильовані CpG-динуклеотиди згруповані в так звані «CpG-островки», які присутні в 5'-регуляторних областях багатьох генів. Різні захворювання, н., рак, супроводжуються початковим аномальним гіпометилуванням ДНК і наступним гіперметилуванням «CpG-островків» в промоторних областях генів, що призводить до стійкої репресії транскрипції. Репресія транскрипції в цьому випадку опосередкована білками, які здатні зв'язуватися з метильованими CpG-динуклеотидами. Ці білки, звані метилцитозин-зв'язуючими білками, притягають деацетилазу гістонів (HDAC) і інші чинники, які беруть участь в ремоделюванні хроматину. Комплекс, який сформувався, може модифікувати гістони, формуючи неактивну структуру транскрипції конденсованого гетерохроматина. Вплив метилування ДНК на структуру хроматину має велике значення для розвитку і функціонування живого організму. Зокрема, відсутність метилцитозин-зв'язуючого білка 2 (MeCP2) внаслідок, наприклад, мутації у відповідному гені, призводить до розвитку синдрому Ретта у людини; інактивація метилцитозин-зв'язуючого доменного білку 2 (Methyl-CpG binding domain protein 2-MBD2), який бере участь в репресії транскрипції гіперметильованих генів, відмічена при онкологічних захворюваннях.

Тканиннспецифічне метилування цитозинових залишків ДНК у ссавців здійснюється за допомогою чотирьох ДНК-метилтрансфераз і підтримує специфічний рисунок метилування у клітинах, які розмножуються мітозом. Після реплікації дві напівметиловані дочірні молекули ДНК розпізнаються ферментами і конвергуються в повністю метильовані. Очевидно, в клітинних поколіннях передаються без зміни не які-небудь регуляторні білки, а метильні групи у складі ДНК. Наявність або відсутність метильних груп служить сигналом для регуляторних білків, і в результаті ці білки взаємодіють із ДНК дочірніх клітин так само, як у батьківській клітині. Експерименти з активації генів у культурах клітин переконливо свідчать про наявність зв'язку між генною експресією і метилуванням ДНК (рис.5.27.).

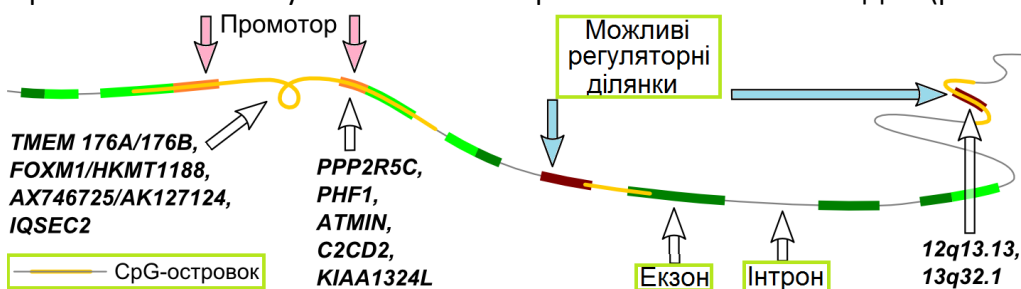


Рис. 5. 26. Метилування «CpG-островків».

Островки частіше зустрічаються в початкових ділянках промо-

торів генів хребетних. З промоторною ділянкою зв'язуються регуляторні білки, які забезпечують активну транскрипцію гена. Островки можуть бути значною мірою метильовані, що супроводжується інактивацією гена. Метилування ДНК перешкоджає взаємодії чинників транскрипції з промотором. Метилування ДНК сприяє залученню до промотору білків, що пригнічують транскрипцію. Ступінь репресії активності гена пропорційний щільності метилування цитозинів по довжині ДНК.

Метилування ДНК у людини. У людини за процес метилування ДНК відповідають три ферменти, які називають ДНК-метилтрансферазами 1, 3a і 3b (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b), відповідно. Передбачається, що DNMT3a і DNMT3b - це *de novo* метилтрансферази, які здійснюють формування патерну метилування ДНК на ранніх стадіях розвитку, а також його зміни в процесі диференціювання клітин. Існує гіпотеза про те, що метилування ДНК *de novo* викликається інтерферуючими РНК за допомогою РНК-залежного метилування ДНК - процесу, що виник в ході еволюції з метою репресії мобільних елементів генома. DNMT1 є ДНК-метилтрансферазою, яка підтримує метильований стан ДНК, приєднуючи метильні групи до одного з ланцюгів ДНК в точках, де інший комплементарний ланцюг метильований. Білок DNMT3L гомологічний іншим DNMT-білкам, але не має каталітичної активності. Замість цього, DNMT3L підтримує *de novo* метилтрансферази, сприяє зв'язуванню цих ферментів з ДНК і стимулює їх активність.

Важливими етапами в розвитку злякисних новоутворень є попереднє гіпометилування ДНК і наступна інактивація генів-супресорів пухлинного росту (Elias Daura - Oller et al, 2009). У разі, коли інактивація була обумовлена метилуванням промоторної області гена, проводилися експерименти по відновленню експресії шляхом інгібування DNMT. 5'-аза-2'-дезоксцитидин (децитабін) є нуклеозидним аналогом, DNMT метилтрансферази, яка інгібує. Механізм дії препарату заснований на ковалентному зв'язуванні ферменту в комплексі з ДНК, що робить неможливим виконання ферментом своєї функції і призводить до деградації метилтрансферази. Проте для того, щоб децитабін був активний, він повинен вбудуватися в геном клітини, але це, у свою чергу, може викликати мутації в дочірніх клітинах, якщо клітина не гине і продовжує ділення. До того ж, децитабін токсичний для кісткового мозку, що звужує сферу його терапевтичного застосування. Ці обмеження привели до інтенсивного пошуку методів терапевтичної дії, заснованих на використанні «антисенсових» РНК, які протидіють DNMT за допомогою деградації її мРНК і, отже, блокують трансляцію. Проте, залишається відкритим питання про те, чи є інгібування функції DNMT1 достатньою умовою для збільшення експресії генів-супресорів, негативна регуляція транскрипції яких здійснюється метилуванням ДНК.

Останніми роками стало зрозуміло, що механізм компактизації-декомпактизації хроматину безпосередньо пов'язаний із репресією-дерепресією локалізованих у ньому генів, і встановлений особливий клас захворювань людини, зумовлений дефектами структури і модифікації хроматину, - т.з. «хроматинові хвороби». Показано, що до метильованої ДНК приєднуються білки, котрі розпізнають метиловані основи завдяки наявності в их особливих метил-GC-зв'язуючих доменів. Відомо чотири види таких білків, що взаємодіють із гістонами.

Метилування ДНК у рослин. Останнім часом стався значний прорив в розумінні процесу метилування ДНК у рослин, особливо у *Arabidopsis thaliana*. Основними метилтрансферазами ДНК у *A. thaliana* є Met1, Cmt3 і Drm2, які на рівні амінокислотної послідовності подібні метилтрансферазам ДНК у ссавців. Drm2, імовірно, бере участь як в *de novo* метилуванні ДНК, так і в підтримці метилування на пізніших стадіях розвитку. Cmt3 і Met1, головним чином, виконують функцію підтримки метилування ДНК (Cao, Xiaofeng; Jacobsen, Steven E., 2003). Інші метилтрансферази ДНК також присутні у рослинах, але їх функція доки не з'ясована (Dodge, Jonathan E.; Bernard H. Ramsahoyeb et al, 2002).

Вважається, що специфічність метилтрансферази в процесі метилування ДНК

модулюється за допомогою РНК. Специфічні РНК-транскрипти транскрибуються з певних ділянок матриці - ДНК генома. Ці РНК-транскрипти можуть формувати молекули дволанцюгових РНК. Дволанцюгові РНК, за допомогою регуляторних сигнальних шляхів, які пов'язані або з малими інтерферуючими РНК (siRNA), або з мікроРНК (miRNA), детермінують локалізацію метилтрансфераз ДНК на ділянках специфічних нуклеотидних послідовностей в геномі (Галицкий В.А., 2008).

Встановлено, що нормальний розвиток ссавців неможливий без метилювання. Інактивація, руйнування гену, відповідального за утворення ДНК-метилтрансферази, припиняє розвиток ембріона на ранніх стадіях. У той же час наявність у ДНК 5-метилцитозину (mC) небезпечно для організму - він може спонтанно дезамінуватися і перетворюватися на тимін (T). при реплікації ДНК в результаті CG-пара перетвориться на A=T. Таким чином, відбудеться точкова мутація, можливо, шкідлива для організму. Якщо ж дезамінується неметильований цитозин, то він перетворюється на урацил (U), якого ферменти репарації усувають із ДНК і замінюють на цитозин. Мутація виникає тільки після дезамінування mC. Проте не зважаючи на небезпеку метилювання, воно зберігається в еволюції хребетних і підтримується природним добром.

Наявність імпринтингу виявляється в людини в результаті аналізу сімейних спадкових хвороб. Уявімо собі, що носії варіанта (алеля) мутантного гена, що піддається імпринтингу, гетерозиготні за мутацією. Припустимо також, що метилювання (інактивація) спостерігається для гена, успадкованого від батька. У такому разі потрапляння батьківського мутантного алеля до нащадка не буде відмічено (ген імпринтований і неактивний), оскільки необхідну функцію виконуватиме неметильований материнський ген, імпринтований на активність. Якщо ж мутантний ген буде отриманий від матері, то в гетерозиготи *Aa* хвороба проявиться, оскільки батьківський не мутантний алель нестиме батьківський імпринтинг - гіперметилюванню. Тільки генетичний аналіз дозволить виявити відмінності в генотипах особин *Aa* і *aa*, що страждають на захворювання. До хвороб людини, зумовлених мутаціями в імпринтованих генах, відносять деякі захворювання нервової системи, які супроводжуються аномальною поведінкою.

Інактивація X-хромосомами. Метилювання ДНК відіграє істотну роль в інактивації однієї X-хромосоми у жіночих клітинах у ссавців і людини. Жінки мають дві X-хромосоми, тоді як чоловіки - X і Y. Y-хромосома не включає багато генів, які працюють у соматичних клітинах, але містить гени, необхідні для утворення сім'яників та функціонуючих сперматозоїдів. У результаті співвідношення числа генів X-хромосом до аутосом у жінок удвічі вище, ніж у чоловіків. Для нормального розвитку необхідне певне співвідношення (генний баланс) числа функціонуючих генів, що знаходяться в різних хромосомах. Наприклад, дуплікація ділянки хромосоми, що приводить до непропорційного збільшення числа деяких генів можуть бути згубними для організму. Тому, можливо, щоб зрівняти співвідношення числа функціонуючих генів X-хромосом і аутосом, відбувається інактивацію однієї з X-хромосом жінок. Метилювання ДНК не є першопричиною інактивації X-хромосоми, така хімічна модифікація необхідна для завершення інактивації.

Слід відмітити, що окремі гени неактивної X-хромосоми уникають інактивації. Вибір однієї з двох X-хромосом для інактивації випадковий. Інактивація викликається ділянкою – центром інактивації, від якого вона розповсюджується в обидва боки. Інактивована X-хромосома виглядає як компактизоване тільце (тільце Барра), а хроматин знаходиться в гетерохроматинізованому стані.

Встановлено, що разом з інактивацією X-хромосоми в жінок спостерігається і батьківський імпринтинг окремих генів X-хромосоми. Недавно з'явилися повідомлення про те, що імпринтингу піддається ген людини, який визначає соціальні контакти. Порушення гена призводить до аномалії в поведінці і до зниження величини IQ (*Intelligence Quotient* -

коефіцієнт розумового розвитку). Такого висновку дійшли при дослідженні в людини синдрому Шерешевського-Тернера (каріотип 45,X0), хворі жінки мають близький до норми рівень інтелекту, вони отримують X-хромосому від одного з батьків, що встановлюється методами молекулярного аналізу. Виявилось, що пацієнти з X-хромосою, від батька, мають істотно менше аномалій у соціальній поведінці, вони менш схильні до аутизму – поринання в себе, нездатності контактувати із зовнішнім світом.

Зіставлення результатів психологічних тестів з походженням X-хромосоми у хворих на синдром Тернера дозволило дійти висновку, що в X-хромосомі людини розташований ген, який зазнає батьківського імпринтингу і визначає особливості поведінки та рівень інтелекту.

Гормональна регуляція експресії генів.

Гормональна регуляція експресії генів починається на рівні транскрипції. У відповідь на зовнішні стимули клітина «включає і виключає» певні гени. Так, стероїдні гормони клітин, що в ній синтезуються, потрапляють у цитоплазму відповідних клітин-мішеней, звідки спеціальний транспортний білок перенесе їх в ядро, де вони зможуть активувати одні гени або інактивувати інші шляхом прямої взаємодії з хроматином в певних ділянках. Кожен гормон впливає на свій набір генів.

Це забезпечує відповідність реакції клітини сигналу, який клітина сприймає через посередництво відповідного гормону. Гормони зв'язуються з білками-рецепторами, утворюючи з ними комплекс. Активованій гормоном рецептор набуває здатності впізнавати певні послідовності ДНК, у результаті ген інактивується. Н., регуляція тестостероном розвитку тканин організму за чоловічим типом відбувається за наявності специфічного білка-репресора.

Тільки наявність генів Y-хромосоми (генів сперматогенезу, чоловічого антигену, гену розвитку сім'яників), які визначають диференціювання статевих залоз за чоловічим типом і синтез гормону тестостерону, не спроможні забезпечити розвиток організму чоловічого типу. Встановлено, що для цього необхідний також ген, розташований в іншій хромосомі, який утворює білок-рецептор, що сприймає тестостерон і забезпечує проникнення гормону в клітини тканин-мішеней. Мутація цього гена порушує утворення нормального білка-ферменту, робить тканини-мішені несприйнятливими до гормону, в результаті гормон не проникає в клітину-мішень і не включається певний набір генів, який направляє розвиток за чоловічим типом. Клітини організму сприймають жіночі гормони і здійснюється розвиток організму за жіночим типом. Таке спостерігається при синдромі Моріса (синдром тестикулярної фемінізації), у людини каріотип XY, але фенотип жіночий. Такі люди не спроможні мати дітей, оскільки сім'яники недорозвинені, а їх фенотип формуються по жіночому типу (є піхва але матка недорозвинена).

Контроль на рівні трансляції і посттрансляційних процесів.

Регуляція на рівні трансляції здійснюється внаслідок того, що виключається можливість використання мРНК як матриці для синтезу білка, хоча вона і присутня в цитоплазмі. Наприклад, в овоциті морського їжака багато мРНК але помітного синтезу білка не відбувається поки не відбудеться запліднення. Після запліднення молекули мРНК модифікуються («набувають» на 5'-кінці КЕП і «хвіст» з Poly-A на 3'-кінці) і включаються в нормальний процес трансляції, який завершується синтезом поліпептиду.

Регуляція заснована на тому, що багато білків синтезується в неактивній формі й повинні ще пройти стадію модифікації. Так, у β -клітинах підшлункової залози синтезується не інсулін, а його попередник, поліпептид, який довший за інсулін і містить додаткову послідовність амінокислотних залишків. Лише після вирізання послідовності протеолітичним ферментом, утворюється функціонально активний гормон. Синтез активного гормону може регулюватися шляхом посттрансляційної регуляції активності протеолітичного ферменту.

Відповідно Спірину А.С. (2000 р.), є три основні способи регулювання трансляції.

Перший спосіб — позитивна регуляція на основі спорідненості мРНК до ініціюючої рибосоми і чинників ініціації (дискримінація мРНК). Другий спосіб - негативна регуляція за допомогою білків-репресорів, які, зв'язуючись із мРНК, блокують ініціацію (репресія трансляції). Цими двома способами регулюються індивідуальні мРНК і трансляція кожної мРНК може контролюватися незалежно від інших мРНК клітини. Третій спосіб - тотальна регуляція трансляції всіх мРНК клітини за допомогою модифікації чинників ініціації.

Дискримінація мРНК. Швидкість або частота ініціації трансляції рибосомами може сильно різнитися для різних мРНК. У прокаріотичних організмів ініціюючі ділянки і такі, які зв'язуються з рибосомою мають різну спорідненість до рибосом і, таким чином, з різною ефективністю зв'язують рибосомні субодиниці. На основі відмінності в ефективності ініціації можна виділити «сильні» і «слабкі» мРНК. На «сильних» мРНК ініціація відбувається частіше і на них утворюються полірибосоми, продукується багато молекул білка. На «слабких» мРНК ініціація трансляції відбувається рідше, що призводить до зниження продукції білків.

В еукаріотичних клітинах дискримінація мРНК зумовлена різною спорідненістю чинників ініціації, а не самих рибосом до різних 5'-проксимальних ініціаторних структур мРНК. Оскільки чинники ініціації в будь-якому випадку локалізуються на малих рибосомних субодиницях, то вони і визначають ефективність зв'язування рибосом з різними мРНК і, таким чином, дискримінують їх на сильні і слабкі.

Неоднакова сила мРНК значною мірою визначає співвідношення продукції різних білків у клітині. Так, білки, які потрібні у великій кількості (структурні білки мембран, рибосомні білки, чинники елонгації, білки оболонки вірусів та інші), кодуються сильними мРНК, а спеціалізовані ферменти і регуляторні білки – слабкими мРНК. Якщо білок має четвертинну структуру, побудовану з різних субодиниць в певному співвідношенні, то сила мРНК або її цистронів, що кодують ці субодиниці, координована з пропорцією субодиниць у структурі. Наприклад, мембранний комплекс протонної АТФази бактерій побудований із трьох типів субодиниць у співвідношенні 1a:2b:10c, і відповідно субодиниця c кодується сильним цистроном мРНК. Таким чином, дискримінацію мРНК можна розглядати як механізм конститутивного контролю фіксованого співвідношення продуктів білкового синтезу.

Трансляційне спряження в прокаріотів. Відомо, що в прокаріотів один довгий полінуклеотидний ланцюг мРНК може містити декілька кодувальних послідовностей (цистронів) для різних білків, і такі мРНК називаються *поліцистронними*. Користуючись механізмом внутрішньої ініціації, у багатьох випадках рибосоми можуть ініціювати трансляцію послідовних цистронів незалежно один від одного, і інтенсивність ініціації і, отже, продуктивність цистронів визначатимуться їх власною силою. Трансляційне спряження – це залежність ініціації трансляції внутрішнього цистрона від трансляції 5'-проксимального цитрона, без трансляції і без ініціації попереднього.

Репресія трансляції. Типовий механізм репресії трансляції полягає в тому, що білок-репресор, специфічно зв'язується з ділянкою мРНК, що перекидається з ділянкою зв'язування малою субодиницею рибосоми при ініціації трансляції. Таким чином, зв'язуваний білок-репресор заважає з'єднуватися ініціюючій субодиниці і тим самим зменшує швидкість ініціації або блокує її. Часто в місці зв'язування білка-репресора є не дуже стабільна двоспиральна структура – шпилька, яка легко розплітається ініціюючою рибосомою. Білок-репресор стабілізує шпильку, перетворює її на бар'єр, який не може подолати, ініціююча рибосома (рис.5.18).

Є дані, що репресором є сам білок, який кодується даною мРНК – мРНК репресується своїм же продуктом. Це регуляція за типом зворотного зв'язку: виробництво надмірної кількості білка на даній мРНК призводить до зв'язування цього білка з ініціаторною ділянкою своєї мРНК і до репресії власного синтезу.

В інших випадках репресором є спеціальний білок, і його здатність зв'язуватися з певними мРНК залежить від наявності низькомолекулярного компонента - ефектора. Наприклад, у клітинах тварин білок-репресор блокує ініціацію синтезу білка феритину, а залізо як ефектор позбавляє репресор його мРНК-зв'язувальних властивостей і дерепресує феритинову мРНК, забезпечуючи її трансляцію.

Механізми репресії трансляції забезпечують шляхи модуляції швидкостей ініціації трансляції в широких межах за типом зворотного зв'язку або залежно від ефекторів. Репресія трансляції використовується про- і еукаріотичними організмами для тонкої регуляції білкового синтезу.

Маскування мРНК в еукаріотів. Окрім типової репресії трансляції у еукаріот є механізм маскування мРНК (недоступність мРНК не тільки для ініціації трансляції, але і для всіх інших процесів можливих перетворень або змін: деградації нуклеазами, ферментативної модифікації 3'-кінця шляхом поліаденілювання). Маскування здійснюється білками і залежить від зовнішніх сигналів. Маскування і демаскування мРНК є особливо характерними для процесів оогенезу і сперматогенезу, раннього ембріонального розвитку, клітинного диференціювання, гормонального включення або виключення функцій. Наприклад, в оогенезі відбувається накопичення деяких материнських мРНК у маскованій формі, і частина цих мРНК демаскується у відповідь на запліднення яйцеклітини, забезпечує білковий синтез на ранніх стадіях ембріогенезу (дроблення, бластули і ранньої гастрული).

Найцікавішим моментом у маскуванні мРНК є те, що маскувальний білок зв'язується не з 5'-проксимальною ділянкою ініціації трансляції на мРНК, а з нетрансльованим хвостом мРНК - з 3'-проксимальною некодуючою ділянкою, так званою 3'-UTR або 3'-НТО. У межах 3'-НТО є спеціальний майданчик для маскуючого білка – сегмент маскування. Зв'язування маскувального білка з сегментом маскування 3'- НТО призводить не тільки до блокади подій, що розвиваються на 3'-кінці мРНК (3'-екзонуклеазна деградація, поліаденілювання), але і до блокади ініціації трансляції на 5'-кінці мРНК.

Тотальна регуляція трансляції в еукаріотів. Найбільш звичайний шлях тотальної регуляції білкового синтезу в еукаріотів – це активація спеціальної фосфокінази, яка фосфорилує чинник ініціації eIF2, що призводить до пригнічення ініціації трансляції всіх мРНК клітини. Сигналами для активації фосфокінази в клітині є тепловий шок і інші види стресових чинників, нестача ростових чинників, заліза і інших мікроелементів, амінокислот, вірусні інфекції. Сильне пригнічення синтезу білка в цих умовах є наслідком саме активації фосфокінази і фосфорилування eIF2, який каталізується нею. Ступінь пригнічення білкового синтезу визначається рівням стресу.

Вважають, що регуляція на рівні трансляції відіграє лише допоміжну роль у загальному процесі регуляції реалізації генетичної інформації у клітині. Основну роль відводили регуляції генної активності на рівні транскрипції. Контроль трансляції розглядався лише як спосіб тонкого підлаштування біосинтезу білка до умов клітинного і позаклітинного середовища. Останні дослідження відкрили масу нових фактів, що свідчать про вирішальний внесок регуляції трансляції, особливо в еукаріотів: при дії ростових чинників і гормонів, при зміні фаз клітинного циклу, у процесах розвитку і клітинного диференціювання, при старінні. Увесь розвиток і активність багатоклітинних організмів контролюються регуляторними механізмами на рівні трансляції, і без цих механізмів не може бути ні розвитку організму, ні розмноження, ні підтримки його життєвих функцій.

Генетичні взаємодії значною мірою реалізуються через регуляторні білки, їх функціональні центри, знаки управління генів і частково – через регуляторні сигнали (метаболіти, гормони, що модифікують дії). Останніми роками стрімко розвиваються дослідження функціональних сайтів керування транскрипцією: операторів, сайтів розпізнавання загальноклітинних активаторів, енхансерів, інсуляторів, тканинноспецифічних

і гормонспецифічних сайтів, сайтів «розпаковування» хроматину, сайтів відповіді на тепловий шок тощо.

Розробка комп'ютерного аналізу регуляторних зон генів дозволяє виявити такі знаки керування і замкнути зв'язки в схемах генних мереж. Сучасна концепція молекулярно-генетичних систем керування (МГСК) активно розробляються вченими різних країн.

Організація геномів неклітинних і клітинних організмів

Геноміка. Організація геномів неклітинних організмів і прокариот. Організація генома вірусів. Типи генетичного матеріалу і механізми реплікації в різних вірусів. Поняття про лізогенний і літичний цикли вірусів. Особливості генома і життєвого циклу ретровірусів. Геном бактерій. Плазмід.

Геноміка. У 1920 році Ганс Вінклер запропонував поняття геном, як систему генів локалізовану в гаплоїдному наборі хромосом. Але Джошуа Ледербергі і Алекса Т. МакКрей вважали, що Г.Вінклер був знайомий з ботанічними термінами: «ризом» «талом» та іншими, які виникли у 20-х роках ХХ століття, і суфікс «ом» в них означає об'єднання в ціле (н., «ризом» означає усю кореневу систему рослин). Таким чином, поняття «геном» можна розуміти як об'єднання усіх генів в ціле.

В сучасному розумінні «геном» - сукупність спадкового матеріалу, який знаходиться в клітині організму. Геном містить генетичну інформацію необхідну для побудови організму та його функціонування. Більшість геномів (прокариот і еукариот) побудовані з ДНК, але деякі віруси мають РНК-геноми.

Геноміка сформувалася як розділ молекулярної біології в 1980—1990-х роках разом з виникненням перших проектів по секвенуванню геномів деяких видів організмів. Першим був секвенований у 1977 році геном бактеріофага Ф-Х174 (5368 нуклеотидів). Наступним етапом було секвенування геному бактерії *Haemophilus influenzae* (1.8 Mb) (1995). Пізніше були повністю секвеновані геноми ще декількох видів, включаючи геном людини (2001 рік — чорновий варіант, 2003 рік — завершення проекту).

Розвиток геноміки відбувся завдяки вдосконаленню методів дослідження НК, а також завдяки появі могутньої обчислювальної техніки, що дозволило працювати з великим обсягом даних. На сучасному етапі розвитку молекулярної біології сформувалися нові розділи геноміки: структурна геноміка, функціональна, інформаційна, порівняльна, еволюційна, медична, фармакогеноміка та ін.

Основою молекулярної медицини, яка розробляє методи діагностики, лікування і профілактики спадкових (генних і хромосомних), інфекційних та інвазійних хвороб є геноміка людини. Для медицини особливе значення мають дослідження геноміки в медичній мікробіології, вірусології, оскільки вони розкривають природу інфекції і надають перспективи для створення специфічних ліків, для лікування різних захворювань.

Структурна геноміка вивчає нуклеотидні послідовності геномів, структурну організацію генів організмів, міжгенних ділянок, регуляторних структурних елементів (промоторів, енхансерів та ін.), на основі яких складаються генетичні, фізичні і транскрипційні карти організму.

Функціональна геноміка вивчає реалізацію генетичної інформації, записаної в геномі, від гена — до ознаки. Проводяться дослідження по ідентифікації функцій кожного гена і ділянки генома, їх взаємодію в клітинній системі.


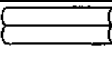

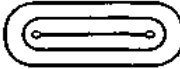
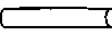


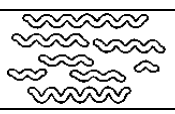

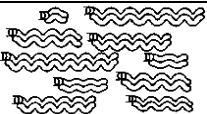
Еволюційна геноміка з'ясовує шляхи формування та еволюцію геномів, походження генетичного поліморфізму і біологічної різноманітності.

Медична геноміка вирішує прикладні питання клінічної і профілактичної медицини на основі знання геномів людини і патогенних організмів (н., діагностика спадкових хвороб, перспективи генотерапії, причини вірулентності хвороботворних мікроорганізмів).

Фармакогеноміка вивчає індивідуальну варіабельність реакції організму на дію лікарських засобів, яка обумовлена генетично, чутливість організму та відповідь на фармакопрепарати. Поліморфізм (наявність алелів, множинних алелів гена, рідкісних генів) в популяціях людини вимагає нового підходу до створення лікарських засобів. Встановлені гени, які кодують синтез білків, що впливають на процеси всмоктування, розподілу, метаболізму і виведення лікарських засобів. У зв'язку з поліморфізмом таких генів для деяких пацієнтів лікарські препарати можуть бути неефективними, або мати токсичну дію. Наприклад, в нормі у різних груп людей швидкість елімінації ліків з організму може відрізнятись в 4–40 разів, а 10–40% людей не реагують на фармакотерапію. Це змушує розробляти лікарські препарати з урахуванням індивідуальних генетичних особливостей. Виявлення генів, які детермінують реакції на фармакологічні засоби, дозволять розробити прогностичні тести. У перспективі можлива розробка тестів, які визначали б «генетичний профіль» пацієнта та тестів, за допомогою яких можна окреслити ефективність ліків для конкретної людини.

Організація генома вірусів. Віруси — це неклітинні форми життя, які мають власний геномом і здатні до відтворення тільки в клітинах про- і еукаріот. Віріон (або вірусна частка) складається з однієї або декількох молекул ДНК або РНК, вкритий білковою оболонкою (капсид), що іноді містить також ліпідні й вуглеводні компоненти.

Таблиця 6.1. Структура генома вірусів.

| Вірус (розмір в 10^3 н. або 10^3 н.п.) | ДНК-вмісні віруси | Структура генома |
|---|---|---|
| Вірус гепатиту В (3,0) |  | Часткова одноланцюгова кільцева ДНК |
| Аденовірус (36) Вірус герпеса (200) |  | Лінійний дуплекс |
| Папавіруси (5,0) |  | Суперспіральна замкнута кільцева ДНК |
| Вірус вісповакцини (200) |  | Лінійний дуплекс з ковалентно зшитими кінцями |
| Парвовірус |  | Одноланцюгова лінійна ДНК |
| Фаг: X174 (5,3) M13 (6,0) |  | Одноланцюгова кільцева ДНК |
| | РНК-вмісні віруси | |
| Ретровірус (10,0) |  | Одноланцюговий диплоїдний геном |
| Вірус грипа (16) |  | 8 різних одноланцюгових молекул |
| Поліовірус (7) ВТМ (700) |  | Одноланцюгова РНК |
| Реовірус (30) |  | 10 різних дволанцюгових молекул |

Віруси розмножуються тільки після інфікування живих клітин. Віруси здатні проникати у тваринні й рослинні клітини, а також бактерії (віруси бактерій називаються *бактеріофагами*). Віруси є внутрішньоклітинними паразитами, на генетичному рівні вони

використовують для свого розмноження білоксинтезуючий апарат клітини-хазяїна.

Геном вірусів представлений ДНК або РНК, які можуть бути одно- і дволанцюговими, кільцевими й лінійними. Молекулярна маса ДНК вірусів перебуває у межах 1×10^6 - 200×10^6 ; РНК — 1×10^6 - 15×10^6 дальтона.

За складністю будови генома віруси широко варіюють — від фага Q_φ (РНК-вмісний вірус бактерій), що має 4 гена, до вірусу віспи (ДНК-вмісний вірус), геном якого нараховує близько 250 генів. Крім того, усі гени вірусів можуть бути упаковані в одній молекулі нуклеїнової кислоти або розподілені по декільком молекулам, які разом представляють геном такого вірусу. Наприклад, у реовірусів геном представлений дволанцюговою РНК і складається з 10 молекул (або сегментів). Геноми одноланцюгових РНК-вмісних вірусів, можуть бути або суцільними (ретровірус), або сегментованими (вірус грипу). Геном РНК-вмісних вірусів тільки лінійний.

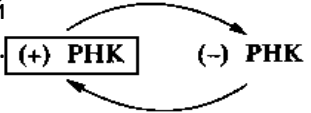
ДНК-вмісні віруси хребетних мають геном, представлений однією молекулою ДНК, лінійною або кільцевою, одно- або дволанцюговою (таб. 6.1).

У деяких вірусів, наприклад у вірусу гепатиту В, геном представлений кільцевою молекулою дволанцюгової ДНК, в обох ланцюгах якої в різних місцях виявлені одноланцюгові ділянки.

Типи генетичного матеріалу і механізми реплікації у різних вірусів.

РНК-вмісні віруси (РНК → РНК). Геноми майже всіх відомих РНК-вмісних вірусів — це лінійні молекули, їх розділяють на три групи.

Перша група — це одноланцюгові геноми, з нуклеотидною послідовністю, що відповідає мРНК. Такі геноми позначають (+) РНК. Одноланцюговий (+) РНК геном характерний для фага Q_φ, вірусів тютюнової мозаїки, поліомієліту, кліщового енцефаліту. Вірусні (+) РНК-геноми кодують кілька білків, серед яких РНК-залежна РНК-полімераза (репліказа), вона синтезує РНК без участі ДНК. За допомогою цього ферменту синтезуються спочатку (-) нитки РНК фага, а потім при наявності особливого білка, названого «хазяйським фактором», репліказа здійснює синтез (+) нитки РНК. На заключній стадії нагромаджені вірусні білки і (+) РНК формуються віріони.

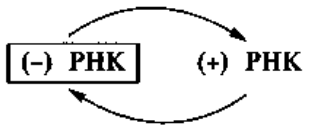


Спрощена схема цього процесу така:

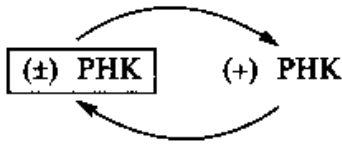
(У рамці форма НК, яка присутня у віріоні)

Друга група — це одноланцюгові геноми з негативною полярністю, тобто (-) РНК геноми. До вірусів з негативним РНК геномом відносяться віруси грипу, кору, сказу, жовтої карликовості картоплі й ін. Оскільки (-) РНК не може виконувати функції мРНК, для утворення «своїх» мРНК вірус занурює в клітину не тільки геном, але й фермент, який може знімати із цього генома комплементарні копії за схемою:

Цей вірусний фермент (РНК-залежна РНК-полімераза) синтезований в попередньому циклі розмноження) упакований у віріони в зручній для доставки в клітину формі. Інфекційний процес починається з того, що вірусний фермент копіює вірусний геном, утворюючи (+)РНК, яка виступає матрицею для синтезу вірусних білків, у тому числі РНК-залежної РНК-полімерази.



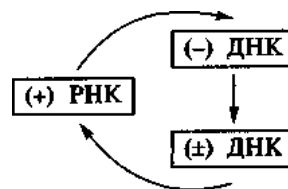
Третю групу становлять дволанцюгові геноми, (±)РНК геноми. Дволанцюгові геноми завжди сегментовані (складаються з декількох різних молекул). Сюди відносяться реовіруси, їх розмноження подібне до попереднього. Разом з вірусною РНК у клітину попадає й вірусна РНК-залежна РНК-полімераза, яка забезпечує синтез (+)РНК. (+)РНК забезпечує синтез вірусних білків на рибосомах клітини хазяїна й служить матрицею для синтезу нових (-)РНК ланцюгів вірусної РНК:



Ланцюги (+) і (-) РНК, комплементарно з'єднуються утворюючи двонитковий (±) РНК-геном, який упаковується в білкову оболонку.

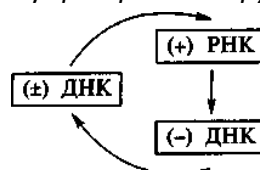
РНК-вмісні віруси (РНК → ДНК → РНК). До них відносять віруси, у яких цикл реплікації генома включає дві головні реакції: синтез РНК на матриці ДНК і синтез ДНК на матриці РНК. При цьому до складу вірусного генома може входити або РНК (ретровіруси), або ДНК (ретроїдні віруси).

У цю групу входять вірус імунodefіциту людини (ВІЛ) і деякі збудники злоякісних новоутворень. Вірусна частка містить дві молекули геномної одноланцюгової (+) РНК. У вірусному геномі закодований незвичайний фермент (зворотна транскриптаза, або ревертаза), який має властивості як РНК-залежної, так і ДНК-залежної ДНК-полімерази. Цей фермент надходить в клітину разом з вірусною РНК і забезпечує синтез її ДНК-копій, спочатку в одноланцюговій формі [(-) ДНК], а потім у дволанцюговій [(±) ДНК]:



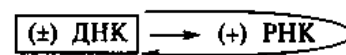
Вірусний геном у формі дуплекса ДНК (провірусна ДНК) вбудовується в хромосому клітини хазяїна. ДНК вірусу при діленні клітини реплікується разом із ДНК хазяїна. Для утворення нових ретровірусних часток провірусні гени (гени вірусу в хромосомах хазяїна) транскрибуються в ядрі клітини транскрипційним апаратом хазяїна в (+)РНК-транскрипти. Одні з них стають геномом нових ретровірусів, а інші зазнають процесінгу й утворюють мРНК, які використовуються для трансляції білків вірусних часток. До цієї групи відносять онкогенні ретровіруси: вірус саркоми Рауса (птахів), вірус лейкозу мишей і т.д. Розвиток пухлини визначає один ген ретровірусу — онкоген.

ДНК-вмісні віруси. Перша група — віруси із дволанцюговою ДНК, реплікація яких здійснюється за схемою: ДНК → РНК → ДНК. Вони одержали назву *ретроїдні віруси*. Представниками цієї групи вірусів є вірус гепатиту В і вірус мозаїки цвітної капусти. Реплікація ДНК-генома цих вірусів здійснюється за допомогою проміжних молекул РНК:



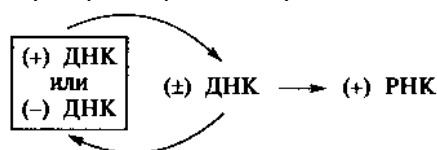
Молекули РНК утворюються в результаті транскрипції вірусних ДНК у клітинному ядрі хазяїнським ферментом ДНК-залежною РНК-полімеразою. Транскрибується тільки одна з ниток вірусної ДНК. Синтез ДНК на РНК-матриці каталізується зворотною транскриптазою; спочатку синтезується (-)нитка ДНК, а потім на ній синтезується тим же ферментом (+)нитка ДНК. У цілому загальна схема реплікації генома ретроїдних вірусів разюче схожа на схему реплікації генома ретровірусів. Очевидно, дана подібність має під собою й еволюційну основу, тому що первинна структура зворотних транскриптаз цих вірусів виявляє певну подібність між собою.

Друга група — віруси із дволанцюговою ДНК, реплікація яких здійснюється за схемою ДНК→ДНК. У зараженій клітині ДНК-залежна РНК-полімераза транскрибує з генома цих вірусів молекули мРНК (тобто (+) РНК), які приймають участь у синтезі вірусних білків, а розмноження вірусного генома здійснює фермент ДНК-залежна ДНК-полімераза:



В одних випадках синтез як мРНК, так і ДНК забезпечують клітинні ферменти; в інших випадках віруси використовують власні ферменти. У деяких процес реплікації й транскрипції обслуговують обидві ферментні системи (н., у вірусів герпеса, віспи й ін.).

Третя група — віруси з одноланцюговою ДНК, з негативною або з позитивною полярністю. Потрапивши в клітину, вірусний геном спочатку перетворюється у дволанцюгову форму і це забезпечує клітинна ДНК-залежна ДНК-полімераза:



Транскрипція й реплікація на наступних етапах відбувається так само, як і для вірусів з (±) ДНК-геномом.

Типи взаємодії вірусу із клітиною хазяїном.

Відомі такі типи взаємодій «вірус-клітина»: продуктивний (утворення дочірньої популяції), інтегративний (вірогенія), абортивний (припинення формування дочірньої популяції) і інтерференція вірусів (інфікування чутливої клітини різними вірусами).

Продуктивна взаємодія «вірус-клітина» частіше носить літичний характер, тобто закінчується загибеллю і лізисом інфікованої клітини, що відбувається після завершення утворення дочірньої популяції. Загибель клітини викликають: раннє пригнічення синтезу клітинних білків, накопичення токсичних продуктів і ушкодження клітини вірусними компонентами, пошкодження лізосом і вивільнення їх ферментів в цитоплазму.

Інтегративна взаємодія, або вірогенія, не призводить до загибелі клітини. НК вірусу вбудовується в геном клітини-господаря і в подальшому функціонує як його складова частина. Найбільш яскраві приклади подібної взаємодії – *лізогенія* при ураженні фагами бактерій і вірусна трансформація клітин.

Абортивна взаємодія не призводить до появи дочірньої популяції і відбувається при взаємодії вірусу з клітиною на стадії клітинного циклу G_0 або при інфікуванні клітини вірусом з дефектними властивостями. Слід розрізняти дефектні віруси і дефектні віріони. Перші існують як самостійні види і функціонально неповноцінні, оскільки для їх реплікації необхідний «вірус-помічник» (н., для реплікації аденоасоційованого вірусу необхідна присутність аденовірусів). Другі, що відносяться до дефектної групи, утворюються з великих дочірніх популяцій (н., можуть утворюватися порожні капсиди або безоболонкові нуклеокапсиди). Особлива форма дефектних віріонів - псевдовіріони, які включають в капсид нуклеїнову кислоту клітини-хазяїна.

Інтерференція вірусів відбувається при інфікуванні клітини двома або більшою кількістю вірусів. Розрізняють гомологічну (при інфекції клітини родинними вірусами) і гетерогомологічну (при інфекції неспорідненими видами) інтерференцію. Інтерференція виникає тільки при деяких комбінаціях вірусів, іноді два різних віруси можуть репродукуватися одночасно (наприклад, віруси кору та поліомієліту). Інтерференція реалізується за рахунок: індукції одним вірусом клітинних інгібіторів (н., ІФН), пригнічення репродукції іншого, або за рахунок пошкодження рецепторного апарату чи метаболізму клітини першим вірусом, що виключає можливість репродукції другого.

Взаємодія вірусу з клітиною хазяїна (життєві цикли, Борисов Л.Б., 2005).

Взаємодія вірусу з клітиною хазяїна - це складний багатоступеневий процес, який починається з адсорбції вірусних часток на рецепторах клітини хазяїна і триває після їх проникнення всередину клітини. У результаті такої взаємодії розвивається *продуктивна, абортивна, чи інтеграційна (лізогенна)* форми клітинної інфекції.

Продуктивна інфекція. Репродукція вірусів. Репродукція, вірусів відбувається шляхом реплікації їх нуклеїнової кислоти, біосинтезу білків і подальшим самозбиранням віріону. Процес відбувається в ядрі або цитоплазмі, внаслідок чого отримав назву *диз'юнктивного* (роз'єданого) розмноження.

Вірусна репродукція - унікальна форма експресії вірусної інформації в клітинах про- і еукаріот, яка полягає в підпорядкуванні молекулярно-генетичних механізмів і процесів клітин-хазяїв інформації записаної в вірусних ДНК або РНК.

1-а стадія - адсорбція - прикріплення віріону до клітинних рецепторів (глікопротеїнів клітинної мембрани, яка містить нейрамінову кислоту). Для орто- і параміксовірусів специфічними рецепторами є гліколіпіди (гангліозиди), що містять сіалову кислоту, для інших - білки або ліпіди клітинної мембрани. Такі рецептори є в різних клітинах, зокрема еритроцитах, на яких адсорбується багато вірусів. Вірусні рецептори – білки прикріплення, розташовані в капсидах простих і суперкапсидах складних віріонів. Вони мають форму ниток (фібри аденовірусів) або шипів (глікопротеїни зовнішньої оболонки орто-, параміксо-, рабдо-,

адено- і бунявірусів).

Адсорбції визначаються неспецифічними силами міжмолекулярного тяжіння, а також - структурною гомологією (комплементарністю) рецепторів чутливих клітин і вірусів.

2-а стадія - проникнення вірусу в клітину хазяїна - відбувається декількома шляхами: рецепторно-опосередкованим ендцитозом (утворенням у місці взаємодії віріона з клітинним рецептором облямованих міхурців, у формуванні яких беруть участь білки-клатрини; шляхом віропексису (злитті мембран - вірусного суперкапсиду з клітинною або ядерною мембранами) в клітину проникають складно влаштовані віруси. Процес відбувається за участю спеціального білка злиття (F-білка), який знаходиться в суперкапсиді. У результаті капсид опиняється в клітині хазяїна, а суперкапсид разом із білком вбудовуються в плазматичну мембрану - клітина набуває здатності зливатися з іншими клітинами та передавати віруси цим клітинам; шляхом фагоцитозу вірус проникає у фагоцитуючі клітини, що спричиняє незавершений фагоцитоз.

3-а стадія - транспорт вірусу у середині клітини. Відбувається за участю цитоплазматичних мембранних міхурців, з яких вірус переноситься до рибосом, ЕПС, в ядро.

4-а стадія — «роздягання» віріонів — відбувається їх депротейнізація і звільнення від суперкапсиду і капсиду, які перешкоджають реплікації вірусної НК. Процес починається відразу після його прикріплення до клітинних рецепторів і триває в ендцитарній вакуолі за участю протеолітичних ферментів лізосом, а при злитті з ядерною мембраною - в ядерних порах і навколяядерному просторі.

5-а стадія - екліпс-фаза, яка характеризується зникненням віріона (не виявляється при електронній мікроскопії). На цій стадії починається *репродукція* віріона (синтез його компонентів). *Репродукція* відбувається в різних компартментах клітини: білки на рибосомах, нуклеїнові кислоти в ядрі або цитоплазмі (бактерій). Для цього використовується генетичний апарат клітини і пригнічуються матричні реакції в ній самій.

Вірусний геномом транскрибується і реплікується. Транскрипція генома двониткових ДНК-вмісних вірусів відбувається, так само як і клітинного генома. Відмінності стосуються ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази, необхідної для даного процесу. У вірусів, геном яких транскрибується в цитоплазмі клітини хазяїна (н., вірус віспи), є власна вірусспецифічна РНК-полімераза. Віруси, що транскрибуються в ядрі (папова- і аденовіруси, віруси герпесу), використовують ядерну РНК-полімеразу II або III.

Кількість генів у вірусному геномі досить обмежена. Тому для збільшення кількості вірусної інформації існує своєрідний механізм трансляції, що функціонує через мРНК, який передає значно більше інформації, ніж записано у вірусній нуклеїновій кислоті. Це досягається різними шляхами, н., при транскрипції інформації з ділянок ДНК, що зчитуються, на мРНК шляхом *сплайсингу*, а також при зчитуванні антикодонами тРНК однієї і тієї ж молекули мРНК із різних нуклеотидів.

Регуляція транскрипції здійснюється клітинними і вірусспецифічними механізмами. Вона полягає в послідовному зчитуванні інформації з так званих «ранніх» і «пізніх» генів. В перших закодована інформація для утворення вірусспецифічних ферментів транскрипції і реплікації, в других – про синтез капсидних білків. Трансляція вірусної інформації відбувається на рибосомах клітин хазяїна, які звільняються від клітинних білків і збираються у полісоми. Реплікація вірусних геномів приводить до утворення багатьох копій ДНК або РНК, які накопичуються і використовуються при збиранні віріонів.

Реплікація вірусної ДНК відбувається на обох нитках за участю клітинної ДНК-полімерази. В одноститкових вірусів спочатку утворюється друга нитка (реплікативна форма). Реплікація вірусних РНК відбувається за участю того ж вірусспецифічного ферменту, який каталізує транскрипцію вірусного генома.

У плюс-ниткових вірусів реплікація РНК практично не відрізняється від їх транскрипції.

У мінус-ниткових вірусів реплікація різниться від транскрипції довжиною дочірніх молекул РНК, що утворилися. При реплікації вони повністю відповідають довжині материнському ланцюгу, а при транскрипції утворюються вкорочені молекули мРНК.

У ретровірусів реплікація, як і транскрипція ДНК, відбувається у складі клітинного генома за участю клітинної ДНК-полімерази.

6-а стадія - збирання віріону - утворення нуклеокапсидів. Синтез вірусних НК і білків у клітині відбувається в різних її структурах, і необхідно транспортування складових частин віріону в одне місце збирання. При цьому вірусні білки і нуклеїнові кислоти володіють здатністю з'єднуватися один з одним. В основі самозбирання простих віріонів лежить здатність вірусних поліпептидів з'єднуватися в капсомери, які утворюють симетричний багатогранник. В інших випадках поліпептиди у вигляді спіралі оточують вірусну нуклеїнову кислоту. Більшість простих віріонів збираються на реплікативних комплексах - мембранах ендоплазматичного ретикулула (ЕПР). У складних віріонів збирання нуклеокапсиду починається на реплікативних комплексах, продовжується на плазматичній мембрані, із зовнішнього боку якої розташовуються суперкапсидні глікопротеїди. Нуклеокапсидні ділянки випинаються через клітинну мембрану, утворюючи пупок (орто- і параміксовіруси, рабдовіруси). Після відокремлення пупка, що містить нуклеокапсид і суперкапсидні білки, утворюються вільні віріони. Вони або через клітинну плазматичну мембрану проходять у позаклітинний простір, або через мембрану ЕПР проникають у вакуолу. При цьому мембранні ліпіди обволікають пупок, витісняючи з нього білки.

Багато ДНК-вмісних вірусів, наприклад вірус герпесу, збираються в ядерній мембрані, де утворюються нуклеокапсиди, вони відпупковуються в перінуклеарний простір, набуваючи зовнішньої оболонки. Подальше формування віріону відбувається в мембранах ЕПР і в комплексі Гольджі, звідки вірус транспортується на поверхню клітини.

7-а стадія - вихід вірусних часток з клітини - відбувається двома шляхами. Прості віруси, позбавлені суперкапсиду (н., пікорнавіруси, аденовіруси та ін.) викликають деструкцію клітини і потрапляють у позаклітинний простір. Віруси, що мають ліпопротеїдну зовнішню оболонку (н., вірус грипу), виходять із клітини шляхом пупкування, внаслідок чого клітина зберігає свою життєздатність.

Інтеграційна інфекція. Інтеграція (вбудовування) вірусної нуклеїнової кислоти в клітинний геном. Даний шлях взаємодії між вірусом і клітиною хазяїна не однаковий для ДНК- і РНК-вмісних вірусів. У першому випадку вірусна ДНК у кільцевій формі інтегрує в клітинний геном. При цьому місце інтеграції визначається гомологічними нуклеотидними послідовностями, наявними в певних ділянках – ДНК-сайтах за участю низки ферментів: рестриктаз, ендонуклеаз, лігаз. Вірус, інтегрований у клітинний геном, називають *провірусом*.

Провірус може реплікуватися у складі клітинного генома пропорційно поділу клітини. При цьому кожна дочірня клітина отримує копію провірусного генома. В іншому випадку ампліфікація провірусної ДНК із збільшенням числа копій провірусом без його вищеплення з клітинного генома може призвести до вбудовування провірусом в іншу хромосому. Вищеплення провірусом з клітинного генома і його проникнення в нову клітину може викликати продуктивну інфекцію.

У разі РНК-вмісних вірусів включення РНК у клітинний геном відбувається шляхом зворотної транскрипції при обов'язковій участі зворотної транскриптази. Синтезований одностанцюговий транскрипт є матрицею для утворення другої нитки. Потім утворений двостанцюговий ДНК-транскрипт замикається в кільце і вбудовується в клітинний геном. Даний процес об'єднання вірусної НК з хромосомою клітини-хазяїна називається *вірогенією*. В інтегрованому стані вірусна ДНК може транскрибуватися в складі клітинного генома за участю клітинних РНК-полімераз.

Біологічний сенс інтеграційного типу взаємодії між вірусом і клітиною хазяїна полягає,

перш за все, у збереженні вірусної інформації в складі клітинного генома і її передачі потомству. Разом з тим це певною мірою відбивається і на еволюції деяких вірусів (н., бактеріофагів), які при вищепленні з клітинної хромосоми можуть захоплювати окремі її гени. З іншого боку, подібний тип взаємодії може позначитися на долі клітин хазяїна залежно від розташування локусу в якому відбувається інтеграція вірусного генома аж до розладу регуляції синтезу білка і неконтрольованого поділу клітини. Це може призвести до онкогенної трансформації клітин хазяїна і розвитку різноманітних пухлин.

Розглянемо два типи взаємодії вірусу і клітини, де головна відмінність — ступінь автономії вірусу від клітини-хазяїна на прикладі бактеріофага λ.

Коли бактеріофаг λ заражає клітину кишкової палички, він негайно реплікується й утворює кілька сотень дочірніх фагових часток, які виходять назовні в момент лізису клітини. Лізис клітинної стінки здійснює фермент лізоцим, який кодується фагом. Це так званий *літичний* шлях інфекції — він закінчується загибеллю клітини-хазяїна. У цьому випадку вірус не підкорюється клітинному контролю.

Альтернативним є *лізогенний* шлях інфекції, при якому лінійні молекули ДНК фага λ замикаються в кільце й включаються (інтегрують) у кільцеву хромосому клітини-хазяїна. Ця інтеграція здійснюється шляхом сайтспецифічної генетичної рекомбінації, що каталізується особливим білком фага λ, так званою *інтегразою*. Клітина, що містить ДНК фага λ у своїй хромосомі, називається *лізогенною* клітиною, а вбудована ДНК фага λ — *профагом*.

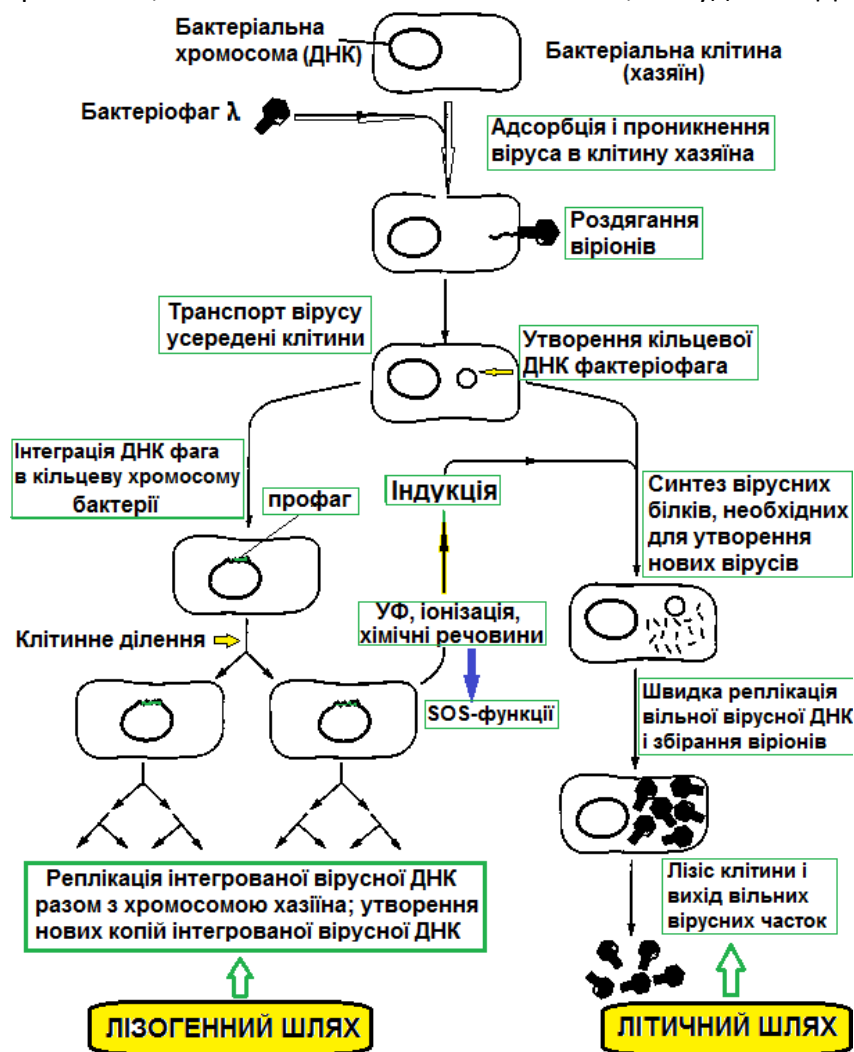


Рис. 6.1. Життєвий цикл бактеріофага λ 122.

У тваринних клітинах, як і в бактерій, ДНК-віруси можуть розмножуватися літичним шляхом, ведучим до загибелі клітини. Такі тваринні клітини називають *пермісивними*.

Клітини і їх хромосоми діляться, а разом із хромосомами в кожен дочірню клітину попадають і фагові гени. При певних обставинах, а саме при впливі будь-якого шкідливого зовнішнього фактора (ультрафіолетових променів, іонізуючого випромінювання, хімічних реагентів), активуються так звані «SOS»-функції, призначені для усунення порушень. У лізогенній клітині це призводить до вищеплення (ексцизії) профага із клітинної ДНК і початку звичайного, властивого фагу циклу розмноження. Профаг вступає в літичний цикл реплікації. Інтегрований профаг не гине разом з ушкодженою клітиною хазяїна, він може потрапити в сусідню неушкоджену клітину кишкової палички (рис. 6.1).

Клітини, у яких розмноження вірусів блокується, називаються *непермісивними*; вірусна хромосома в таких випадках або включається в геном клітини хазяїна й потім розмножується разом з ним, або утворює плазмиду — кільцеву молекулу ДНК, реплікація якої регулюється й не веде до загибелі клітини. Іноді це викликає в непермісивних клітинах певну генетичну зміну, у результаті якої починається неконтрольований ріст, тобто нормальні клітини перетворюються в ракові. Відповідний ДНК-вірус називають у таких випадках пухлинним ДНК-вірусом (до них відносяться найбільш вивчені представники паповавірусів - SV40 і вірус полііоми).

У ретровірусах (РНК-вмісні віруси: вірус саркоми Рауса, вірус СНІДу та ін.) ревертаза перетворює їх РНК у форму ДНК, яка вбудовується в клітинну хромосому. У результаті транскрипції інтегрованої вірусної ДНК клітинною ДНК-залежною РНК-полімеразою утворюється велика кількість молекул вірусної РНК, ідентичних вихідному інфікуючому геному. Завершується процес трансляцією цих молекул РНК із утворенням капсидних і мембранних білків, а також зворотньої транскриптази; нарешті, відбувається складання нових вірусних часток, які включають вірусний РНК-геном і зворотну транскриптазу. Вірусні частки залишають клітину, не вбиваючи її. Виникає особлива форма хронічної інфекції, при якій працюючий вірусний геном, включений до складу клітинної хромосоми, передається дочірнім клітинам. Таке співіснування впливає на клітину. Властивості її під впливом вірусних білків, що перебувають у ній, можуть змінюватися, і в деяких випадках заражена клітина стає раковою.

Дослідження ретровірусів дали ще один важливий результат — створення на їх основі рекомбінантних векторів. Ці вектори виявилися особливо важливими для одержання трансгенних тварин.

Характеристика деяких вірусів

Фаг λ . ДНК фага λ упакована в гексагональну голівку, утворену декількома білками (рис. 6.2. А). До голівки прикріплений хвостовий відросток, побудований з інших білків. Білки голівки й хвостового відростка кодуються геномом фага λ і синтезуються в клітинах бактерій, інфікованих фагом. Фаг прикріплюється до клітинної стінки й вводить ДНК у бактеріальну клітину подібно шприцу.

ДНК фага λ — лінійна дволанцюгова молекула, що містить 48 502 н.п. Здійснене картування практично кожного з його 61 гена, повністю визначена нуклеотидна послідовність його генома.

Молекула ДНК фага λ містить область початку реплікації (*ori*), гени структурних вірусних білків (голівки й хвостового відростка) і ферментів, що приймають участь у реплікації ДНК, лізисі інфікованих клітин і встановленні лізогенії (рис. 6.2. В).

Приблизно 1/3 генома, представлена безперервним внутрішнім сегментом, що перебуває на карті між 20-ю і 38-ю тис. н.п., необхідна для встановлення лізогенного стану. У всіх векторів, сконструйованих на основі ДНК фага λ , багато або навіть усі гени, що необхідні для встановлення лізогенного стану, віддаляються, і в цих випадках інфікування фагом λ кишкової палички супроводжується їхнім лізисом.

Під час свого життєвого циклу А-геном може перебувати в різних формах. У середині фагової частки ДНК перебуває в лінійній формі: 5'-кінець кожного її ланцюга це одноланцюгова послідовність із 12 нуклеотидів. Ці послідовності називаються «*липкими кінцями*», тому що вони взаємно комплементарні й можуть спаровуватися один з одним. В клітини *E.coli* геном фага λ замикається в кільце й зшивається за допомогою бактеріальної ДНК-лігази (рис. 6.2. Б). Місця спарювання липких кінців одержали назву *sos*-сайтів. Кільцева форма обов'язкова для здійснення реплікації фагової ДНК, вона також служить попередником при лізогенній інтеграції ДНК фага в геном хазяїна. Після інтеграції геном фага λ знову стає лінійним, однак завдяки віддаленості сайту інтеграції на фаговій ДНК (*attP*) від

cos-сайту, інтегрована лінійна ДНК профага виявляється зміненою.

На основі фага λ сконструйовано безліч різних λ -векторів, які включають вставки різних розмірів; максимальний — близько 24 000 н.п.

Фаг ϕ X174. Геном цього фага представлений кільцевою одноланцюговою ДНК, що містить 5386 нуклеотидів. Нуклеотидна послідовність ДНК цього дрібного фага була встановлена в 1977 р. Ф.Сангером і його колегами з Кембриджу (Англія). Це досягнення знаменувало собою початок нової ери в молекулярній біології й принесло Сенгеру другу Нобелівську премію. Важливим результатом роботи було виявлення в геномі фага ϕ X174 генів, що перекриваються, і «генів усередині генів», проведено ретельне порівняння нуклеотидної послідовності ДНК із амінокислотною послідовністю білків, які вони кодують. ДНК фага ϕ X174 містить дев'ять генів, позначених за абеткою А-І. Білки, що кодуються цією ДНК, містять більшу кількість амінокислотних залишків ніж знайдених нуклеотидів (5 386 н.) в ДНК фага (рис. 6.3).

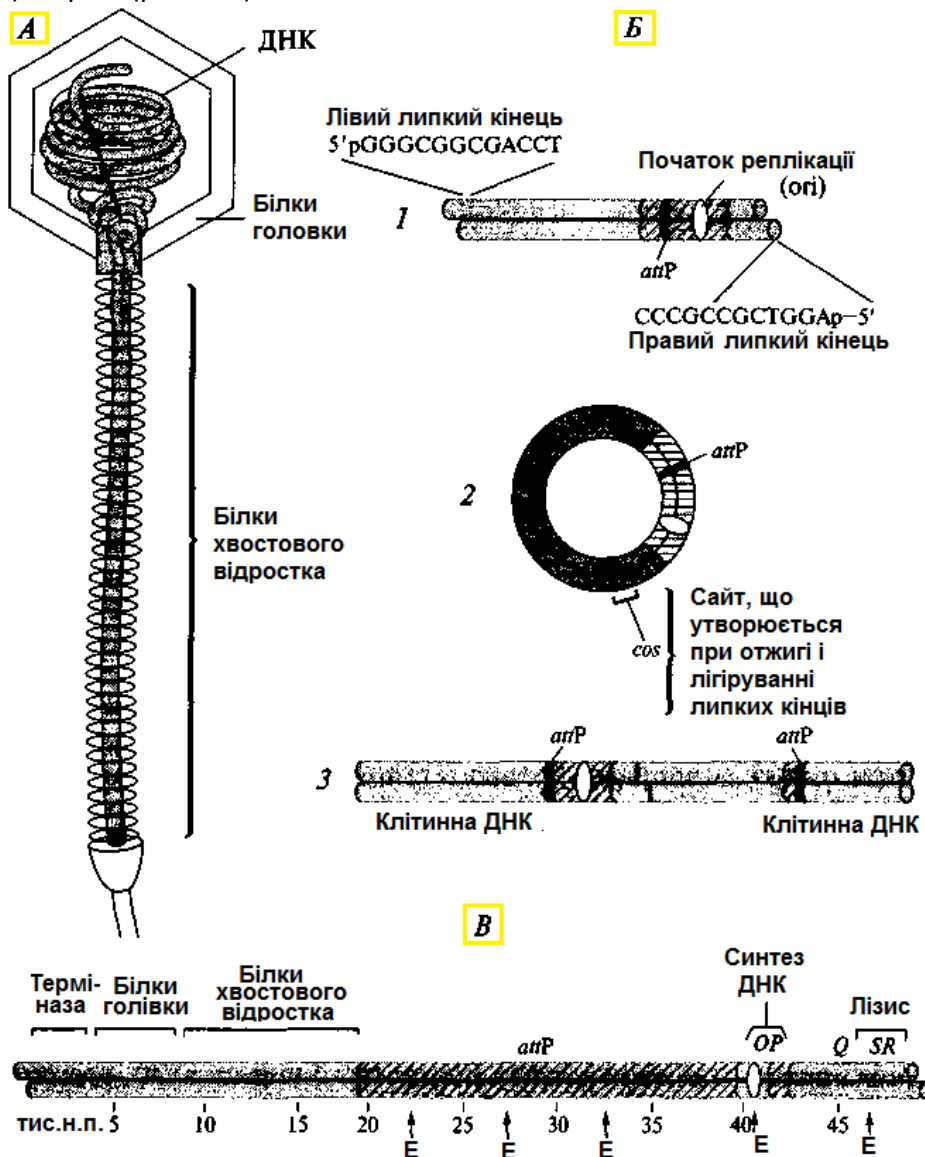


Рис. 6.2. Бактеріофаг λ (М.Сингер, П.Берг, 1998):

А – будова;
Б – форми генома:
1-лінійна;
2-кільцева;
3-інтегрована;
attP-сайт інтеграції;
В – структура генома:
заштриховані гени,
необов'язкові для літичної
інфекції; світлий
овал – область початку
реплікації;
Е – EcoRI-сайти (сайти
розщеплення ДНК
рестриктазою EcoRI).

Виявилося, що ген В розташований усередині гена А, аналогічно ген Е - знаходиться усередині гена D. У п'яти випадках стартовий кодон одного гена перекриває термінальний кодон іншого, при цьому сигнали використовують різні рамки зчитування. Довжина послідовностей, що

перекриваються, і внутрішніх генів повністю компенсує нестачу нуклеотидів у ДНК цього фага. Існувало припущення, що перекривні гени («гени усередині генів») існують тільки в геномах малих вірусів. Фіксовані розміри вірусного капсида обумовлюють ощадливе використання обмеженої кількості ДНК для кодування білків, необхідних для утворення вірусних часток і підтримки її здатності до інфікування і реплікації. Подібна картина перекривання генів була зафіксована для фага λ і для пухлинного вірусу SV40, що

розмножується в клітинах еукаріот.

Вірус SV40. SV40 — це еукаріотний ДНК-вмісний онкогенний вірус. Його геном представлений однією замкненою дволанцюговою молекулою ДНК. ДНК у складі вірусної частки перебуває в комплексі із чотирма клітинними гістонами й утворює кільцеву міні хромосому з нуклеосомами, яка укладена в компактну структуру й оточена зовнішньою білковою оболонкою (капсидом). Природним хазяїном SV40 є макака-резус.

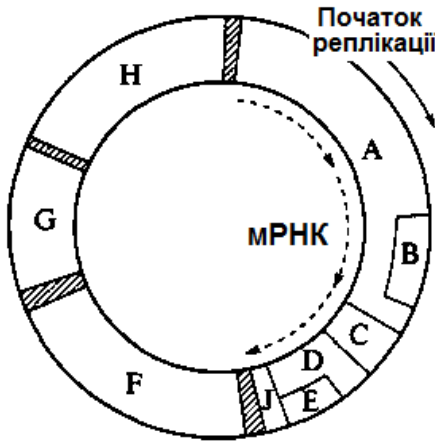
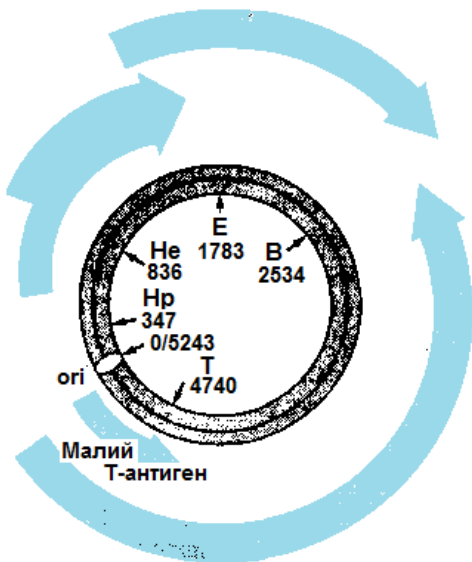


Рис. 6.3. Генетична карта фага фХ174. Літерами позначені гени. Ген В розташований усередині гена А, а ген Е усередині гена D. Заштриховані - ділянки, які не транскрибуються.

Розшифрована нуклеотидна послідовність усього генома SV40 (5243 н.п.), і встановлені ділянки, що кодують п'ять вірусних білків: малий і великий Т-антигени (*tumour* — пухлина), VP1, VP2 і VP3 (рис. 6.4).

Вірус SV40, проникнувши в клітину, направляється до ядра. Тут відбувається його «роздягання», а потім у чіткій тимчасовій послідовності — експресія генів. Першими транскрибуються гени двох білків — малого й великого Т-антигенів у напрямку проти годинникової стрілки. Ця ділянка в геномі називається «ранньою областю». При синтезі мРНК для Т-антигенів відбувається вирізання вставної послідовності з первинного транскрипта з використанням апарата сплайсинга клітинного ядра. Ранні білки не входять до складу зрілих вірусних часток, але великий Т-антиген відіграє важливу роль у реплікації вірусної ДНК, виконуючи функцію хелікази. Реплікація починається в крапці *ori*, іде в обох напрямках і закінчується в місці зустрічі реплікативних вилок; потім відбувається зшивання дочірніх дволанцюгових молекул ДНК з утворенням замкнених кільцевих структур. Після ініціації реплікації ДНК уповільнюється синтез «ранніх» білків і активізується транскрипція «пізніх» генів, яка починається поблизу *ori* і протікає за годинниковою стрілкою. Три мРНК, мабуть, утворюються в результаті різних реакцій сплайсинга й транслюються у відповідні білки — VP1, VP2 і VP3.



Нагромадження дочірніх молекул ДНК, віріонних білків, завершується складанням нових вірусних часток, їх вивільненням із клітини й загибеллю останньої. Вірус SV40 не реплікується в клітинах гризунів, його геном вбудовується в клітинну ДНК, викликаючи злоякісне переродження клітини-хазяїна. Для підтримки трансформованого стану необхідні обидва вірусні антигени (експресія «ранньої» області генома вірусу), «пізня» область не бере участь у цьому процесі.

Рис. 6.4. Геном вірусу SV40. Із внутрішньої сторони карти зазначене число пар основ; Hp, T, E, B, He — унікальні рестриктазні сайти. Ділянки, що кодують п'ять вірусних білків, винесені за межі карти. Великий Т-антиген кодується двома окремими групами генів.

Таким чином, обмежена кількість генетичної інформації у вірусу SV40 використовується з максимальним ефектом (перекривання генів, сплайсинг); крім того, новосинтезована ДНК зв'язується з гістонами клітини-хазяїна й утворює надспіралізований комплекс, який потім упаковується в капсулу за допомогою вірусних білків (VP1, VP2 і VP3).

На основі вірусу SV40 конструюють різні типи векторів: трансдукуючі, плазмідні, пасивні трансформуючі SV40 вектори.

Фаг M13. Входить у групу ниткових бактеріофагів E.coli. Його геном представлений одноланцюговою кільцевою молекулою ДНК, що містить 6 400 нуклеотидів. Він упакований в капсид, що нагадує пробірку, побудовану із трьох різних фагових білків. Фаг M13 інфікує клітини E.coli у тому випадку, якщо останні мають тонкі структури, які нагадують волоски (F-пілі), які необхідні для прикріплення фага до клітини. У процесі реплікації фага M13 у клітинах E.coli одноланцюгова ДНК перетворюється у дволанцюгову кільцеву форму, тобто синтезується комплементарний ланцюг ДНК. Дволанцюгова ДНК детермінує синтез приблизно 300 своїх копій, які потім використовуються як матриці при утворенні одноланцюгових фагових ДНК, що впаковуються у фагові частки. Одночасно транскрибуються й транслуються фагові гени, а на внутрішній мембрані клітини E.coli концентрується основний капсидний білок. Зрілі одноланцюгові молекули фагової ДНК проходять через мембрану, захоплюючи при цьому капсидний білок, у результаті чого утворюється велика кількість зрілих фагових часток. Інфіковані клітини не гинуть, але ріст їх уповільнюється.

Більша частина генома M13 містить гени білків оболонки, а також гени білків, що приймають участь в реплікації й складанні фагової частки (рис. 6.5.). Область початку реплікації включає приблизно 150 нуклеотидів, які перебувають усередині сегмента і не кодуються. У цей сегмент може бути вставлена чужорідна ДНК без порушення здатності M13 до реплікації.

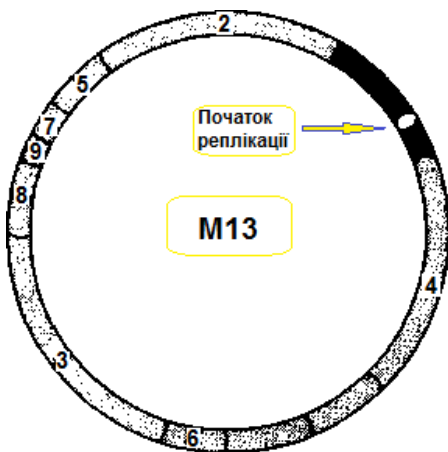


Рис. 6.5. Структура генома фага M13. Гени позначені цифрами: гени 2 і 5 відповідальні за реплікацію, інші детермінують утворення капсида й складання вірусної частки. Світлий овал — область початку реплікації; Щ — некодуюча ділянка.

Дволанцюгову реплікативну форму ДНК можна виділити з інфікованих клітин і використовувати потім як вектор в генно-інженерних роботах. Одноланцюгова ДНК, що міститься в декількох сотнях фагових часток культурального середовища, є зручним об'єктом для одержання одноланцюгових рекомбінантних молекул і проведення на основі детального аналізу нуклеотидних послідовностей, а також синтезу специфічних радіоактивно мічених ДНК-зондів.

Ретровіруси — це велика група вірусів, представники якої різняться як біологічними властивостями (н., по здатності викликати злоякісні пухлини), так і за морфологією (є помітні варіації структури їх геномів). Загальні риси цих геномів наступні:

1. вірусна РНК — одноланцюгова молекула довжиною до десяти тисяч нуклеотидів, являє собою (+) нитку, молекули РНК копійовані на 5'-кінці й поліаденіловані на 3'-кінці;

2. у молекулах РНК є прямий кінцевий повтор (R) довжиною кілька десятків нуклеотидів (на 3'-кінці він передуює полі(А)-послідовності);

3. у вірусній РНК записана інформація для синтезу трьох груп вірусспецифічних білків: структурних білків серцевини віріона (Gag-білків), ферментативних білків, що беруть участь у зворотній транскрипції вірусного генома і в інтеграції вірусної ДНК у клітинну хромосому (продуктів гена pol) і білків, що входять до складу зовнішньої ліпопротеїнової оболонки віріона (Env-білків). У деяких ретровірусів є додаткові гени;

4. вірусна частка містить дві молекули геномної РНК; таким чином, особливістю ретровірусів є диплоїдність їх генома.

Фундаментальні дослідження ретровірусів, що викликають пухлини у птахів і ссавців, спрямували на вирішення клінічних проблем, пов'язаних з раковими захворюваннями

людини й синдромом набутого імунного дефіциту — СНІДу. СНІД викликає один з ретровірусів ВІЛ (вірус імунодефіциту людини), який інфікує макрофаги й один з типів Т-лімфоцитів, виводячи з ладу імунну систему хворого. Інші лімфотропні ретровіруси також інфікують Т-клітини людини і викликають лейкози.

Структура вірусу імунодефіциту людини представлена на рис. 6.6. Вірусна частка має сферичну форму, її діаметр близько 100 нм. Оболонка частки утворена подвійним шаром ліпідів, пронизаних глікопротеїнами.

Таблиця 6.2. Білки, які закодовані в геномі ВІЛ-1.

| Ген | Білок | Функція |
|--------------------------|--------------|--|
| Білки віріона | | |
| | MA(p17) | Матричний білок; зв'язування з мембраною, складання вірусу |
| <i>gag</i> | CA (p24) | Білок капсида; складання вірусу |
| | NC (p9) | Білок нуклеокапсида; РНК-зв'язування; складання вірусу |
| | PR(pII) | Протеаза; дозрівання вірусу |
| <i>pol</i> | RT (p66/p51) | Зворотна транскриптаза; реплікація вірусу |
| | IN (p32) | Інтеграза; реплікація вірусу |
| <i>env</i> | SU (gp120) | Вірусний білок оболонки; зв'язування CD 4p рецептора, інфекційність вірусу |
| | TM (gp41) | Трансмембранний глікопротеїн оболонки; інфекційність вірусу |
| Допоміжні білки | | |
| <i>upr</i> | Vpr | Вірусний білок R; переміщення передінтеграційного комплексу в ядро |
| <i>vif</i> | vif | Фактор вірусної інфекційності; предінфекційні події |
| <i>vpr</i> | Vpr | Вірусний білок U; дозрівання вірусної оболонки й вихід вірусу |
| Регуляторні білки | | |
| <i>tat</i> | Tat | Трансактиватор; стимулює елонгацію транскрипції |
| <i>rev</i> | Rev | Регулятор експресії пізніх генів |
| <i>nef</i> | Nef | Негативні регуляції CD4; регулює сигнальні шляхи Т-клітин |

Ліпідна мембрана походить із зовнішньої мембрани клітини-хазяїна. У кожній глікопротеїнової молекулі є дві субодиниці: gp41 пронизує мембрану, gp120 перебуває зовні. У середині оболонки міститься серцевина вірусу, утворена білками p17 і p24. У серцевині вірусної частки знаходиться вірусна РНК і молекули зворотної транскриптази. Структура генома ВІЛ-1 розшифрована (табл. 6.1).

Геном ВІЛ містить 9 генів, але процесинг (клітинними й вірусними ферментами) генерує 14 білкових продуктів. Ген *gag* кодує внутрішні білки віріона; вони синтезуються у вигляді поліпротеїну, з якого потім протеаза вирізає конкретні білки. Наступна кодуюча ділянка, *pol*, детермінує синтез зворотної транскриптази. Фермент поліфункціональний: він здатний синтезувати ДНК, використовуючи матрицю РНК, або ДНК; крім того, він поводить подібно РНКазі Н (руйнує ланцюг РНК, що входить до складу РНК/ДНК дуплекса) і має ендонуклеазну активність. Ген *pol* ще кодує інтегразу, яка здійснює включення ДНК вірусу в геном зараженої клітини. Ген *env* кодує компоненти вірусної оболонки, яка захоплює частину клітинної цитоплазматичної мембрани. У геномі ВІЛ представлені також гени допоміжних і регуляторних білків. Так, білки Tat і Rev спільно забезпечують значне збільшення синтезу вірусних білків при переході провірусу з латентної в активну форму.

Реплікативний цикл ВІЛ. Після взаємодії вірусної частки із чутливою клітиною (Т-лімфоцитом) серцевина віріона звільняється від ліпопротеїнової оболонки і виявляється в цитоплазмі Т-лімфоцита. Тут зворотна транскриптаза перетворює вірусну РНК у лінійну дволанцюгову молекулу ДНК. Молекула вірусної ДНК, яка утворюється, довше молекули

вірусної РНК, що була матрицею для її синтезу. До 5'-кінця вірусної ДНК додається послідовність U3, а до 3'-кінця цього ланцюга — послідовність U5. У результаті на кінцях молекули вірусної ДНК з'являється довгий кінцевий повтор (ДКП), що має структуру U3RU5. На наступному етапі лінійна молекула ДНК проникає в ядро, де перетворюється в кільцеву молекулу (рис. 6.6.) за рахунок взаємодії між її «тупими» кінцями. При цьому одна форма кільцевої ДНК містить одну копію ДКП, інша — дві тандемні копії ДКП. Одна або декілька копій ДНК інтегрують у геном лімфоцита.

Інтеграція ДНК ВІЛ у геном зараженої клітини є ключовою стадією реплікативного циклу цього ретровірусу. Вона здійснюється вірусним ферментом інтегразою. Інтеграза визначає тільки певні нуклеотидні послідовності, локалізовані в U3 і U5 ДКП вірусної ДНК, зв'язується з ними й каталізує реакцію 3'-кінцевого процесинга.

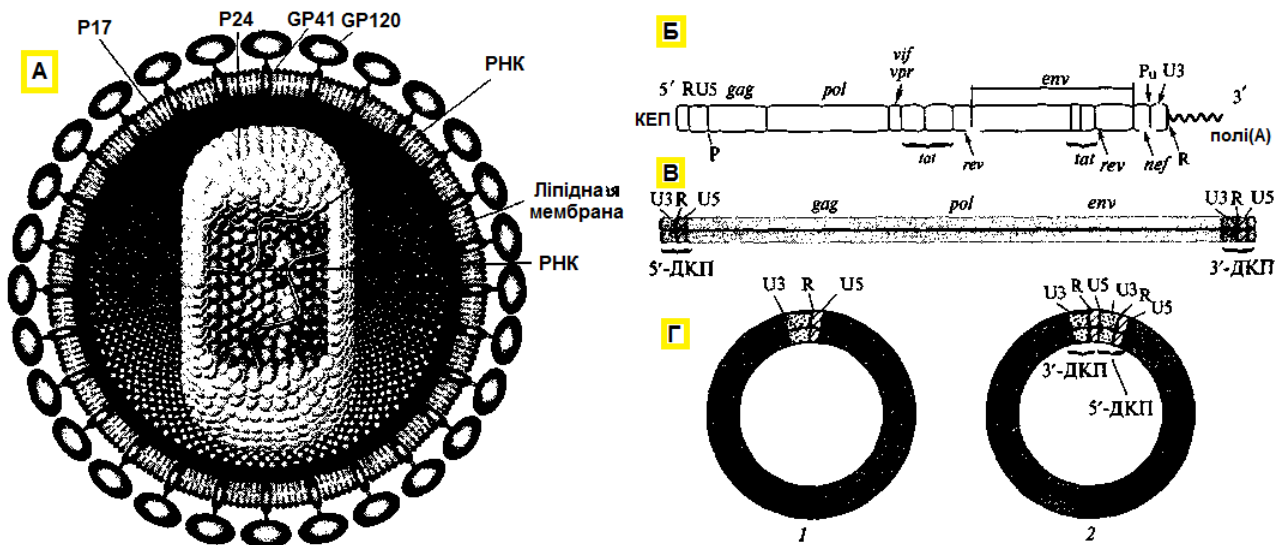
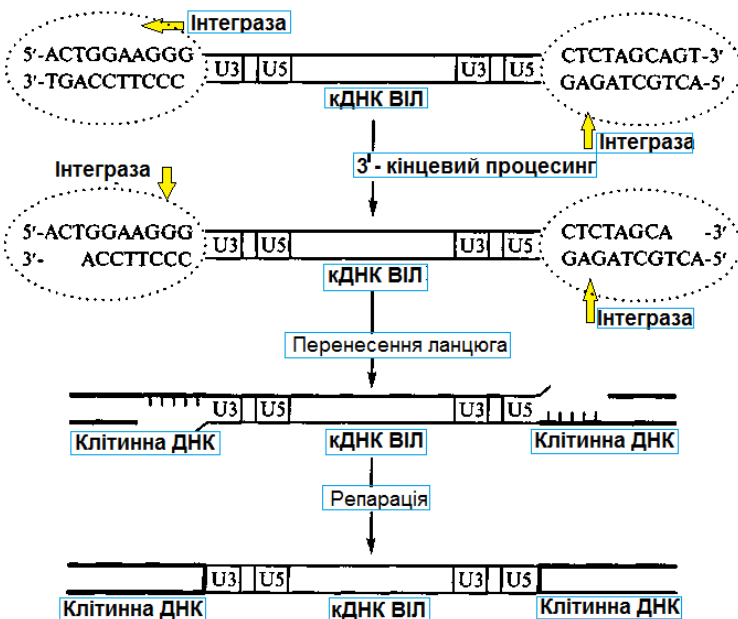


Рис. 6.6. Вірус імунодефіциту людини: А — структура вірусу: GP — глікопротеїни; P — білки серцевини вірусу; • — зворотна транскриптаза; Б — структура РНК-генома ретровірусу; В і Г — продукти, що утворюються в результаті зворотної транскрипції РНК вірусу: В — лінійний дуплекс ДНК із послідовністю U3RU5 (довгі кінцеві повтори — ДКП); Г — два кільцевих дуплекса, похідні форми В: 1 — з одним ДКП, 2 — із двома ДКП.

Ця реакція являє собою ендонуклеазне розщеплення вірусної ДНК, у результаті якого із 3'-кінця кожного ланцюга віддаляється динуклеотид GT (рис. 6.7). Потім інтеграза здійснює реакцію трансетерифікації, яка включає нуклеофільну атаку 3'-гідроксильної групи утворених ланцюгів ДНК на міжнуклеотидний фосфат клітинної ДНК із утворенням ковалентного продукту. Важливо відзначити, що вбудовування вірусної ДНК може здійснюватися в будь-яке місце клітинної ДНК, тобто процес перенесення ланцюга не залежить від нуклеотидної послідовності.



реакцію трансетерифікації, яка включає нуклеофільну атаку 3'-гідроксильної групи утворених ланцюгів ДНК на міжнуклеотидний фосфат клітинної ДНК із утворенням ковалентного продукту. Важливо відзначити, що вбудовування вірусної ДНК може здійснюватися в будь-яке місце клітинної ДНК, тобто процес перенесення ланцюга не залежить від нуклеотидної послідовності.

Рис. 6.7. Механізм інтеграції ДНК вірусу імунодефіциту в клітинну ДНК.

Звичайно реакції трансетерифікації зазнають міжник-

леотидні зв'язки, розташовані в різних ланцюгах ДНК на відстані 5 н.п. одна від іншої. При завершенні інтеграції відбуваються процесинг 5'-кінців вірусної ДНК, полімеразне добудування п'яти відсутніх нуклеотидів і лігірування здійснюване клітинними білками.

Синтез РНК ретровірусів іде тоді, коли геном вірусу у вигляді провірусної ДНК є інтегральною частиною клітинної хромосоми, і здійснюється в ядрі клітинним транскрипційним апаратом; як основний фермент використовується РНК-полімераза II. Провірус довше РНК, тому транскрипція починається і закінчується усередині послідовностей ДКП: промотор розташований у районі U3, термінатор — між послідовностями R і U5.

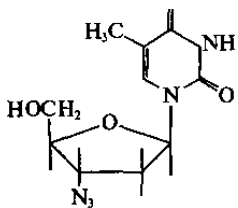


Рис. 6.8. Азотимідин.

Первинні транскрипти провіруса зазнають звичайних посттранскрипційних модифікацій: копіюванню 5'-кінця, поліаденілування 3'-кінця (в ділянці R є сигнал поліаденілування) і сплайсингу. Остання модифікація охоплює не всі РНК вірусу. Молекули РНК, що зберегли всю послідовність нуклеотидів, включаються у віріон, а ті, що піддаються сплайсингу РНК використовуються для трансляції білків, необхідних при складанні вірусних часток, тим самим завершується цикл реплікації транскрипції генома ВІЛ.

Для збудника СНІДу характерна висока генетична мінливість: вона на порядок вища, ніж у вірусу грипу А. У зв'язку із цим важко створити універсальну вакцину проти вірусу імунодефіциту людини.

Розробляється стратегія терапевтичного лікування СНІДу. Н., препарат азотимідин інгібує зворотну транскриптазу. Для цього він повинен перетворитися в трифосфат, що є аналогом дТТР. Азотимідин (рис. 6.8.) завершує елонгацію ланцюга ДНК через відсутність 3'-ОН групи. Клітинна ДНК-полімераза гальмується цим препаратом у набагато меншому ступені. Використовуються також різні класи інгібіторів інтеграції ДНК ВІЛ: флавоїди, ариламідні, тетрацикліни, сульфоні й сульфони, а також модифіковані олігонуклеотиди, що здійснюють екранування сайтів зв'язування інтегрази в складі ДНК і взаємодіють з інтегразою, що приводить до придушення її ферментативної активності.

Походження вірусів і їх роль в еволюції.

Віруси не здатні здійснювати біосинтетичні процеси самостійно — вони залежать від клітин-хазяїв. Таким чином, клітини повинні були з'явитися в процесі еволюції раніше вірусів. Попередниками вірусів, імовірно, були невеликі фрагменти нуклеїнових кислот, які набули здатності розмножуватися незалежно від хромосом їх клітин-хазяїв. Такими елементами, що незалежно розмножуються, є плазмідні. Вони зустрічаються в ДНК- і РНК- формі. Плазмідні не мають білкової оболонки й не можуть вільно переходити із клітини в клітину. Можливо, що перші РНК-плазмідні нагадували собою віроїди, які зустрічаються в деяких рослинних клітинах. Ці невеликі кільцеві молекули РНК (300—400 нуклеотидів) розмножуються, хоча не кодують білків. Віроїди проявляють властивості інфекційних патогенів рослин. Вони переходять від рослини до рослини тільки в тому випадку, коли і донорна клітина, і клітина-реципієнт виявляються ушкодженими, тобто між ними не існує мембранного бар'єра, який віроїд не здатний подолати. Під тиском природного добору такі елементи могли включити ті нуклеотидні послідовності клітини-хазяїна, які полегшували їхнє самостійне розмноження, а також деякі послідовності, що кодують білки.

Перший вірус виявився коли у плазмідах з'явився ген, що кодує білок капсида. Число генів, яке може містити в собі вірус, лімітується розмірами капсида. Так, дрібні віруси (фаг ФХ174) набули в ході еволюції гени, що перекриваються. В інших вірусів у процесі еволюції виникли більші капсиди, що могли дати їм можливість набувати нові корисні гени.

Володіючи унікальною здатністю до переносу ДНК через видові бар'єри, віруси відігравали важливу роль в еволюції тих організмів, які вони інфікують (горизонтальне

перенесення генетичної інформації). Багато вірусів часто вступають у рекомбінацію як один з одним, так і хромосомами клітин-хазяїв; при цьому вони захоплюють випадкові фрагменти хромосом і переносять їх в інші клітини або інші організми. Крім того, щоб інтегруватися в геном хазяїна копії вірусної ДНК (провіруси) стають постійними компонентами генома у великої кількості організмів. Інтегрована вірусна ДНК часто видозмінюється так, що втрачає здатність утворювати повноцінний вірус, але зберігає здатність кодувати білки, частина з яких виявляється корисними для клітини. Таким чином, віруси, як і статевий процес, створюють можливості для прискорення еволюції, відкриваючи для неї такий шлях, як змішування генофондів різних організмів.

Геном прокариот.

Прокариоти не мають в клітинах ядра. Геном прокариот побудований компактно, кількість некодуючих послідовностей нуклеотидів мінімальна. Простота генома прокариот пояснюється їх спрощеним життєвим циклом.

Структура бактеріальної хромосоми. П'ятдесят років тому усі хромосоми прокариот вважалися лінійними. В 1956 р. Ф.Жакоб і Е.Вільман запропонували кільцеву модель бактеріальної хромосоми. Ця модель вважалася загальноприйнятою до появи методу прямого аналізу фізичної структури хромосом. У 1989 р. уперше цим методом була ідентифікована лінійна бактеріальна хромосома у збудника кліщового спірохетозу *Borrelia burgdorferi*. Незабаром встановили, що лінійна і кільцева хромосоми співіснують одночасно у *Agrobacterium tumefaciens*, а у грампозитивних бактерій роду *Streptomyces*, що мають один з найбільших бактерійних геномів (≈ 8000 тис. н.п.), є одна лінійна хромосома. Лінійні хромосоми у бактерій часто співіснують з лінійними плазмідами і широко розповсюджені в природі (табл. 6.3.).

Розмір генома у різних бактерій коливається від 580 тис. н.п. у *Mycoplasma genitalium* до 9 500 тис. н.п. у *Mycobacterium xanthus*. Для кишкової палички *E.coli* розмір генома складає 4600 тис. н. п. (мол. маса близько 3×10^9 Да, довжина ДНК $\approx 1,5$ мм). У бактеріальних клітинах хромосома сильно компактизована. Так, кільцева молекула ДНК *E.coli* довжиною - 1,5мм знаходиться в клітині у формі палички, що має діаметр 1 мкм і завдовжки 2 мкм.

Таблиця 6.3. Склад складних геномів бактерій.

| Бактерії | Геном |
|--------------------------------------|---|
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 | 1 лінійна хромосома; 1 кільцева хромосома; 2 плазміди |
| <i>Bacillus cereus</i> F0836 76 | 1 кільцева хромосома; 1 мегаплазміда |
| <i>Brucella melitensis</i> | 2 кільцеві хромосоми |
| <i>Leptospira interrogans</i> | 1 кільцева хромосома; 1 мегаплазміда |
| <i>Rhizobium meliloti</i> | 1 кільцева хромосома; 2 мегаплазмід |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | 2 кільцеві хромосоми |
| <i>Rhodococcus facians</i> | 1 лінійна хромосома; лінійна плазміда |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> | 1 лінійна хромосома |

В останні роки спостерігається прогрес в дослідженні первинної структури бактеріальних хромосом. На кінець 2011 р. була визначена повна нуклеотидна послідовність 200 прокариотичних геномів.

Структури, пов'язані з реплікацією. Розшифровка нуклеотидної послідовності бактеріальної хромосоми дозволяє визначити структури генома, пов'язані з процесами реплікації, транскрипції, трансляції, регуляції і так далі.

Реплікація бактеріальної хромосоми починається в точці *ori C* (*origine*) і триває в обох напрямках до ділянки термінації реплікації *ter C* (*terminus*). У більшості бактерій ділянки *ori C* і *ter C* ділять кільцеву хромосому на два майже рівні реплікона. Область початку реплікації в багатьох бактеріальних геномах має консервативну структуру. Подібні структури знайдені

майже в усіх секвенованих бактеріальних геномах. Для лінійних хромосом точка *ori* C визначається рівно посередині її. Напрямок транскрипції більшості генів бактерій з високою швидкістю зростання співпадає з напрямом реплікації. Структура області ініціації реплікації ДНК архебактерій невідома. Відсутність асиметрії GC в геномі архей вказує на наявність множинних ділянок ініціації реплікації.

Відкриті рамки зчитування і визначення функцій білку. Відкрита рамка зчитування (англ. open reading frame, ORF) складається з ряду триплетів, що кодують амінокислоти; не містить термінальних кодонів, що потенційно може транслюватися в білок. У встановленій нуклеотидній послідовності генома прокаріот за допомогою комп'ютерних програм виявлені відкриті рамки зчитування. Середній розмір їх в прокаріотичних геномах відповідає приблизно 300 амінокислотним залишкам. Співставлення складу ORF по функціям (за допомогою комп'ютерних програм) дозволяє ідентифікувати компоненти генома, загальні для всіх організмів, загальні для цієї групи видів і унікальні, специфічні тільки для цього організму. Функціональна класифікація генів і генних продуктів є основою для порівняння геномів і виявлення схожості і відмінності їх метаболізму. Як модельний об'єкт використаний геном *E.coli*. Усі білки і гени, що кодують їх, класифіковані на три функціональні групи: енергообмін, інформація, комунікація (зсередини- і зовні-клітинна). Розподіл функцій генів *E.coli*, виявлених по повній нуклеотидній послідовності генома, представлений на рис. 6.9. Серед 4 288 ORF *E. coli* не виявлені функції у 40 % ORF. Приблизно така ж частина генів з невідомою функцією відмічена і в інших прокаріотичних геномах.

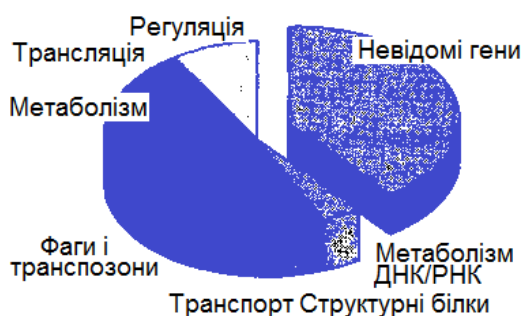


Рис. 6.9. Функціональна характеристика генів *E.coli*, які виявлені за повною нуклеотидною послідовністю її генома.

Мінімальний розмір генома прокаріот. На підставі аналізу первинної структури прокаріотичних геномів був складений перелік генів, абсолютно необхідних для існування живих клітин. Цей перелік генів дістав назву мінімальний набір генів.

Таблиця 6.4. Функції білків, відповідних мінімальному набору з 256 генів.

| Функція | Число білків |
|---|--------------|
| Перетворення енергії | 28 |
| Транспорт і метаболізм амінокислот | 11 |
| Транспорт і метаболізм нуклеотидів | 20 |
| Транспорт і метаболізм вуглеводів | 5 |
| Метаболізм кофакторів | 8 |
| Метаболізм ліпідів | 6 |
| Трансляція і біогенез рибосом | 94 |
| Реплікація, транскрипція, рекомбінація, репарація | 35 |
| Структурна функція (білки зовнішньої мембрани) | 7 |
| Секреція і адгезія | 5 |
| Шаперони | 13 |
| Транспорт неорганічних іонів | 4 |
| Передбачена гіпотетична функція | 15 |
| Функція невідома | 4 |

Він кодує 256 білків і включає наступні життєво важливі генетичні системи мікроорганізмів: набір генів системи реплікації; гени рудиментарної системи репарації і рекомбінації; гени апарату транскрипції, в якому майже відсутні гени регуляції транскрипції; набір генів, що кодують білки, гомологічні шаперонам; гени, контролюючі анаеробний метаболізм (гени гліколізу і фосфорилування субстратів); гени біосинтезу ліпідів; гени системи транспорту білків;

гени ферментів, що використовують складні кофактори; набір генів, що забезпечує транспорт метаболітів; повний набір генів утилізації нуклеотидів *de novo* і гени їх біосинтезу (табл. 6.4).

Якщо ж з генома прокариотичного організму вилучити консервативний мінімальний набір генів для мікроорганізмів то можна отримати ті гени, які визначають специфічні фенотипічні характеристики, що становлять унікальність організму.

Екологічна специфічність на рівні генома. Адаптація до певних умов існування проявляється як в зміні загальних характеристик генома (ГЦ-склад, супер-спіралізує ДНК), так і в наявності генів, продукти яких забезпечують пристосування мікроорганізму до тих або інших умов. Показовий в цьому відношенні геном хелікобактерії, що мешкає в шлунку людини і викликає виразкову хворобу. Хелікобактерії здатні до життя у кислому середовищі, оскільки встановлюють позитивний внутрішньомембранний потенціал при низьких рН і модифікують мікросередовище за допомогою уреаз. Білки *H.pylori* містять удвічі більше основних амінокислотних залишків аргініну і лізину, чим білки *E.coli*. З паразитизмом пов'язана наявність у *H.pylori* не менше п'яти різних систем адгезії для прикріплення до епітеліальних клітин шлунку. Несподіваною є наявність в геномі *H. pylori* 14 генів (більше 1 % генома), що відносяться до системи рестрикції - модифікації типу II. Ймовірно, ця система, окрім розщеплення сторонньої ДНК, має іншу, невідому доки біологічну функцію.

Відсутність певних генів також вказує на особливості метаболізму, пов'язані з умовами життя мікроба. Якщо організм забезпечений ресурсами за рахунок їх адсорбції, то механізми синтезу (а значить, і гени) можуть зникнути.

Бактерійні плазмід.

Окрім хромосоми у більшості бактерій існують структури здатні до автономної реплікації - плазмід. Це дволанцюгові кільцеві ДНК розміром від 0,1 до 5% розміру хромосоми, які мають гени, не обов'язкові для клітини-хазяїна, або гени, необхідні лише в певному середовищі. Плазмід містять гени, які надають клітинам спадкову стійкість до одного або декількох антибіотиків. Вони дістали назву чинників резистентності, або R-факторів. Інші плазмід визначають хвороботворність патогенних бактерій, н., патогенних штамів *E.coli*, збудників чуми і правця. Треті - визначають здатність ґрунтових бактерій використовувати незвичайні джерела вуглецю, н., вуглеводи нафти.

Класифікація плазмід ґрунтується на наявності в плазмідах певних модульних сегментів ДНК або властивостях плазмід (табл.6.5.). Для своєї реплікації плазмід використовують реплікативний апарат клітини-хазяїна, проте реплікація плазмід відбувається незалежно від хромосоми. Кожна плазмід є самостійним репліконом, сама контролює власну реплікацію. Для цього вона повинна мати один або декілька реплікативних модулів (область ініціації реплікації), які і дозволяють їй автономно реплікуватися. У одному з класів плазмід (F-плазмід) реплікація і сегрегація регулюються погоджено з реплікацією бактеріального генома, і в кожній клітині знаходиться одна або дві копії плазмід (реплікація із суворим контролем). Другий тип реплікативного модуля, що призводить до існування в клітині 10-30 копій плазмід називають реплікацію з послабленим контролем.

Таблиця 6.5. Класифікація плазмід за властивостями.

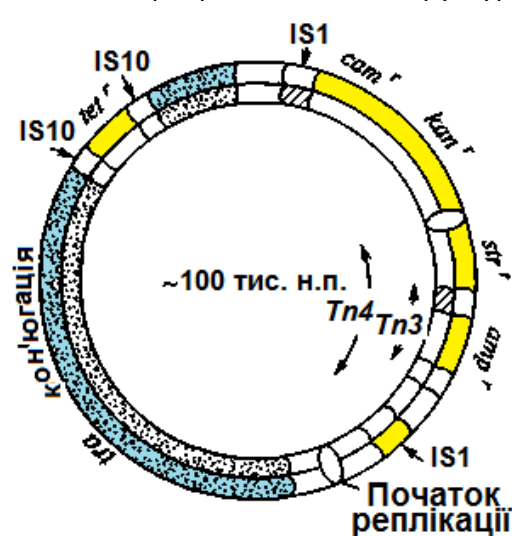
| Властивості | Класи плазмід |
|--|-------------------------|
| Донорні функції | F-плазмід |
| Стійкість до лікарських препаратів | R-плазмід |
| Синтез колицинів | Col-плазмід |
| Синтез ентеротоксинів | Ent-плазмід |
| Синтез гемолізинів | Hly-плазмід |
| Руйнування різних органічних і неорганічних сполук, зокрема, що містять важкі метали | Біодеградативні плазмід |
| Не відомі | Криптичні плазмід |

Наявність інших модулів, не пов'язаних з реплікацією, не є обов'язковим для кожної плазмід. Статеві чинники, тобто кон'югативні плазмід, подібно до F-фактору мають модулі,

що містять гени і регуляторні області (гени *tra*), необхідні для перенесення плазміди з однієї клітини в іншу. Трансмисивні плазміди кодують спеціальні ворсинки, статеві пілі, які з'являються на поверхні клітин, які містять плазміди, і здатні специфічно зв'язуватися з поверхнею безплазмідних клітин. Скорочення піля притягує клітини один до одного, і між ними утворюється місток, через який плазмідна ДНК може передаватися в нову клітину. Здатність передаватися в нові клітини - корисна властивість для плазмід, але лише великі плазміди можуть кодувати складну систему поверхневих змін клітини, що забезпечують кон'югацію. Некон'югативні плазміди (втратили модуль) не здатні до самотрансмисивності, але здатні до передачі у присутності трансмісивних плазмід, використовуючи їх апарат кон'югації. Такі плазміди називають мобілізуючими.

Модулі іншого типу містять гени, білкові продукти яких (н., β -лактамаза) інактивують антибіотики. Плазміди, які мають такі модулі, часто називають R-плазмідами (resistance - стійкість). Одна плазміда забезпечує стійкість до декількох антибіотиків, при цьому усі або декілька генів резистентності різного типу можуть бути згруповані в одному модулі.

Є ще один тип модулів, що зустрічається в плазмідах, *Col-модулі*. Вони кодують один з декількох білків-колицинів (антибактеріальних речовин, що продукуються бактеріями). Колицини розрізняються по структурі і способу дії. Плазміди, кодуючи певний колицин, часто



містять гени, які забезпечують імунність до цього колицину, страхуючи клітину-продуцент від пошкоджень, що викликаються її власним способом захисту. Деякі плазміди містять також модулі, що кодують системи рестрикції-модифікації. Прикладом такого модуля є система *Eco RI*.

Рис. 6.10. Структура типової кон'югативної R-плазміди. Світлий овал - область початку реплікації (*ori*). Гени резистентності до антибіотиків: тетрацикліну - *tet^r*, хлорамфеніколу - *cam^r*, канаміцину - *kan^r*, стрептоміцину - *str^r*, ампіциліну - *amp^r*. Точками виділені сегменти, необхідні для кон'югації (*tra*), штрихуванням - мобільні елементи.

Типова плазміда. Модульна будова типових R-плазмід схематично представлена на рис. 6.10.

Близько 50 % послідовностей з приблизно 100 тис. н. п. цих плазмід гомологічні одній з ділянок F-плазміди. Ця область включає гени, необхідні для кон'югації (*tra*) і реплікації із суворим контролем. В F-подібній області знаходиться додатковий модуль, що містить гени, які контролюють стійкість до тетрацикліну. Друга половина R-плазміди не споріднена F і містить модулі, відповідальні за резистентність до антибіотиків (стрептоміцину, сульфаніламідів, хлорамфеніколу і канаміцину).

Плазміди, виділені в різних частинах світу, часто містять близькоспоріднені модулі (н., гени резистентності до антибіотиків). На підставі цих даних виникло уявлення про те, що між геномами відбувається обмін деякими генетичними модулями у вигляді інтактних сегментів ДНК. Швидке поширення генів резистентності до антибіотиків пояснюється саме обміном модулями між плазмідами. Дані, отримані при вивченні генетики бактерій, привели до ідентифікації рухливих елементів, названих інерційними послідовностями (IS) і транспозонами, які здатні переміщатися між плазмідами, між плазмідними і клітинними геномами, а також в межах самого бактерійного генома. Ці послідовності завжди вбудовуються в інші молекули ДНК і ніколи не знаходяться у вільному стані, вони не можуть ініціювати власну реплікацію, а реплікуються разом з молекулою ДНК, в яку вони інтегровані.

У бактерій є *криптичні плазміди*, функції яких ще не встановлені. Виявлені плазміди, що контролюють різні чинники патогенності бактерій (чинники адгезії, інвазії і т.п.). На

теперішній час описано понад два десятки плазмід, які відрізняються властивостями і модульними сегментами.

Плазміди розповсюджуються між бактеріями по вертикалі - шляхом передачі від батьківської клітини дочірнім клітинам у процесі клітинного поділу або шляхом горизонтального перенесення між клітинами в популяціях бактерій незалежно від поділу. Генетичні механізми перенесення плазмід між бактеріальними клітинами наступні: шляхом трансформації; за допомогою трансдукції (фагами); шляхом мобілізації та перенесення за допомогою кон'югативних плазмід.

IS -елементи і транспозони бактерій.

IS-елементи (insertion sequences - послідовності-вставки) - це сегменти ДНК, які здатні цілими переміщатися з однієї ділянки локалізації в іншу (рис. 6.11.).

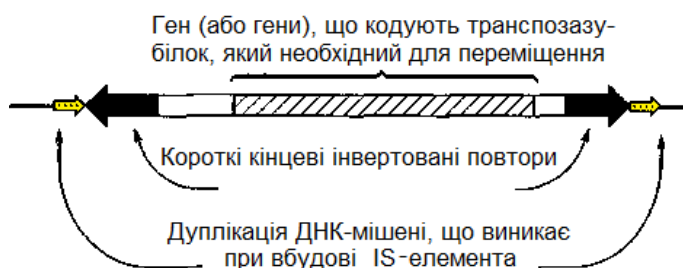


Рис. 6.11. IS-елемент *E.coli*.

IS-елементи містять лише ті гени, які потрібні для їх власного переміщення, - транспозиції. Крім того, IS-елементи мають особливу послідовність на кінцях, як правило, інвертовані повтори. При

вбудовуванні в нову послідовність ДНК IS-елементи викликають невелику дуплікацію: подвоєна ділянка з двох сторін фланкірує IS-елемент, який вбудувався. Характеристика типових IS-елементів *E.coli* представлена в табл. 6.6.

Таблиця 6.6. Типові IS-елементи *E.coli*.

| IS | Сумарна довжина, н.п. | Довжина кінцевих інвертованих повторів, н. п. | Довжина дуплікованої мішені, н. п. | Звичайне місце знаходження |
|------|-----------------------|---|------------------------------------|--|
| IS1 | 768 | 23 | 9 | Хромосома <i>E. coli</i> , 19 копій; плазміда R6, дві копії; <i>Shigella dysenteria</i> , > 40 копій |
| IS2 | 1327 | 41 | 5 | Хромосома <i>E. coli</i> , 0-12 копій; R6, одна копія; F -плазміда, одна копія |
| IS4 | 1426 | 18 | 11 | Хромосома <i>E. coli</i> , 1-2 копії |
| IS10 | 1329 | 23 | 9 | R -плазміди |

Транспозони (Tp-елементи) - сегменти ДНК, які мають такі ж властивості, що і IS елементи, ці гени не мають безпосереднього відношення до транспозиції (гени стійкості до антибіотиків, гени токсинів або гени додаткових ферментів клітинного метаболізму). Загалом, до транспозонів відносять ті гени, які є в плазмідах. Нерідко присутність у складі плазміди того або іншого гена обумовлена наявністю в послідовності плазмідної ДНК відповідного транспозона. Він може бути побудований так само, як IS-елемент, але з додатковим геном. Проте важливо відмітити, що часто два IS-елемента, що виявилися поблизу один від одного, здатні переміщатися разом, одночасно переносючи розташований між ними сегмент ДНК. Таким чином, транспозон можуть утворювати два розміщених поруч IS -елемента. Транспозони різної структури показані на конкретних прикладах на рис. 6.12.

Транспозони і IS-елементи відповідальні за цілий ряд генетических явищ у бактерій. Вбудовування мобільного елемента в будь-який ген може привести до його інактивації. Крім того, деякі IS-елементи і транспозони викликають генетичну нестабільність поблизу від місця своєї локалізації: в околицях елемента помітно підвищується частота делецій і інверсій, причому одна з меж перебудови завжди співпадає з одним із кінців IS-елемента, автономного або у складі транспозона. Мобільні елементи також викликають транслокації.

Механізми переміщення мобільних елементів бактерій. Існує два типи транспозицій

з одного генома в іншій. В ході транспозиції першого типу коінтеграційний, донорний генетичний елемент, який несе IS-елемент або транспозон, зливається з реципієнтною молекулою ДНК. Реплікація за рахунок клітинного реплікативного апарату призводить до подвоєння мобільного елемента. Утворюється проміжний коінтеграційний елемент з дуплікацією мобільного елемента. Щоб стався розподіл коінтеграційного елемента на початкові реплікони (один з яких придбав би нову копію мобільного елемента), потрібна дія продукту гена *tnpR* – резольвази (resolution - дозвіл), яка розрізає коінтеграційний елемент на початкові реплікатори (рис. 6.13.).

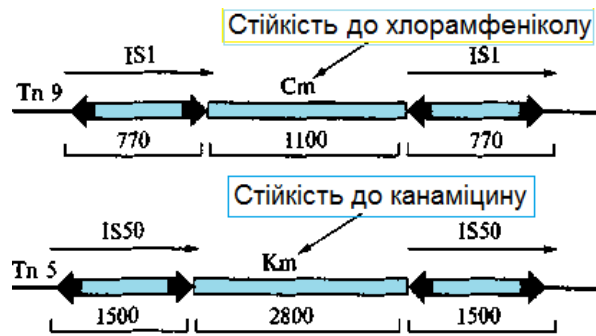
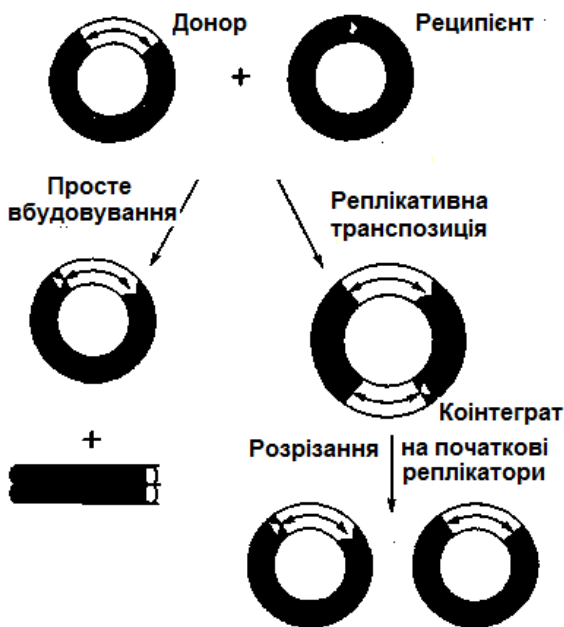


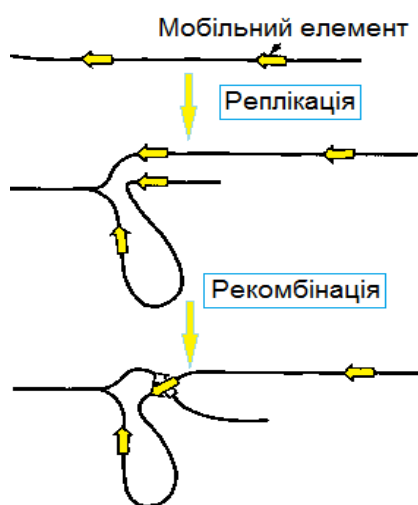
Рис. 6.12. Деякі бактерійні транспозони.



Транспозиція другого типу називається простим вбудовуванням. Мобільний елемент переміщується в новий локус генома, при цьому ніяких інших перебудов, окрім дуплікації сайту-мішені, не відбувається. Цей вид транспозиції іноді називають консервативним (нереплікативним). Для завершення процесу буде потрібно лише обмежений репаративний синтез ДНК.

Генетична мінливість бактерій. Мобільні елементи викликають генетичну нестабільність поблизу від ділянки своєї локалізації, особливо в процесі реплікативного механізму транспозиції. Залежно від того, як внесені розриви в ДНК-мішень, вийде або делеція, або інверсія генетичного матеріалу між місцем розташування транспозона і мішенню його переміщення. У зв'язку з цим цікаво відмітити, що хромосоми споріднених видів бактерій відрізняються одна від одної багаточисельними перебудовами такого типу.

Рис. 6.13. Типи вбудовування мобільного елемента в новий генетичний елемент.



Мобільні елементи відіграли істотну роль у дивергенції і видоутворенні бактерій. Вбудовування IS-елементів поблизу гена, що «мовчить», може призводити до його активації за рахунок транскрипції з промотора IS-елемента, що змінює регуляцію бактеріального гена. Дуже важливо, що мобільні елементи служать рухливими ділянками гомології, рекомбінація між якими може призводити до дуплікації генів (рис. 6.14). Вважається, що дуплікація – один з основних шляхів еволюційного виникнення нових функцій. "Зайва" копія гена виходить з під тиску природного добору і має можливість накопичувати зміни. Найчастіше це приводить до втрати певної функції, але іноді може з'явитися ген з новими функціями.

Рис. 6.14. Механізм утворення дуплікацій за рахунок гомологічної рекомбінації по мобільних елементах (нерівний кросингвер).

Не можна забувати і той факт, що клітина може отримати селективну перевагу за рахунок придбання у складі транспозона гена, який сам по собі здатний виявитися вигідним для бактерії в певних умовах. Дійсно, на транспозонах "мандрують" гени стійкості до різних бактеріальних отрут, у тому числі до важких металів і антибіотиків, гени додаткових метаболічних шляхів, що дозволяють використовувати незвичайне джерело вуглецю, нарешті, гени деяких токсинів, бактерій, що робить їх патогенними і дозволяє тим самим істотно змінити спосіб життя. Сказане в рівній мірі відноситься і до плазмід, оскільки більшість корисних для клітини-хазяїна плазмідних генів знаходиться у складі транспозонів.

Медичне і загально-біологічне значення плазмід.

Плазміді контролюють синтез різних чинників патогенності багатьох видів бактерій (у збудників чуми, сибірської виразки, ієрсиніозів, дизентерії та ін).

Виникнення діареєгенних кишкових паличок (ентеротоксигенних, ентеропатогенних, ентероінвазивних та ін.) є наслідком набуття ними плазмід, які наділяють їх чинниками адгезії, інвазії і здатністю синтезувати термолабільні і термостабільні ентеротоксини. Наявність у природі таких плазмід з широким колом хазяїнів є реальною причиною утворення нових варіантів патогенних бактерій.

Важливу роль відіграють R-плазміді. В умовах широкого застосування антибіотиків і інших препаратів відбувається утворення патогенних штамів бактерій резистентних до них. Відомо, що створені антибіотики втрачають свою ефективність за рік і необхідно створювати нові, щоб подолати інфекцію. Формуються нові епідемічні клони патогенних бактерій. На теперішній час вони відіграють провідну роль в епідеміології інфекційних хвороб, від їх розповсюдження залежить ефективність лікування і здоров'я людей.

У бактерій виявлено три типи генів, що здійснюють контроль синтезу чинників патогенності: гени власної хромосоми; гени, привнесені плазмідами; гени, привнесені помірними конвертуючими фагами. Наприклад, синтез холерогена у *Vibrio cholerae* здійснюється генами тох-оперона власної хромосоми. Синтез екзотоксинів і чинників адгезії в ентеротоксигенних штамів *Escherichia coli* здійснюється генами, привнесеними Ent-плазмідами. Синтез ексфоліативного токсину типу А у стафілококів контролюється хромосомним геном, а типу В - плазмідним геном; синтез екзотоксину в *Corynebacterium diphtheriae* - привнесеними тох-генами коринефага.

Наявність у мікроорганізмів додаткових джерел генів патогенності, носіями яких є віруси і плазміді, безсумнівно, стало одним із чинників виникнення бактерій патогенних для людини і тварин.

З розвитком молекулярно-біологічних і генетичних методів у класифікації і систематизації мікроорганізмів на теперішній час необхідно частіше використовувати генотаксономію, засновану на молекулярно-генетичних ознаках, які встановлюються досліджуючи трансформацію, трансдукцію і кон'югацію, а також аналізі плазмід, транспозонів і фагів. Доведено, що встановлення родової і видової приналежності прокариотів повинно проводитися за аналізом нуклеотидних послідовностей досліджуваних бактерій, такі дослідження є найбільш об'єктивними.

Організація генома еукаріотів

Сучасні уявлення про геном людини. Унікальна, помірно- та багатоповторювальна ДНК. Гени, які кодують поліпептиди, РНК. Мультигенні родини. Суперродини генів та їх продукти. Псевдогени. Транспозони. Розсіяні та тандемні повтори. Міні- та мікросателітна ДНК. Позаядерна спадковість. Мітохондріальний геном.

Організація генома еукаріотів.

Клітини еукаріот мають оформлене ядро. Інформаційною макромолекулою їх генома є ДНК, яка нерівномірно розподілена по хромосомах у вигляді комплексів з численними

білками (ДНП). Генетичну інформацію (ДНК) в клітинах містять не лише хромосоми ядра, життєво важлива генетична інформація знаходиться в позахромосомних молекулах ДНК: ДНК мітохондрій, хлоропластів і інших пластид.

Під геномом еукаріотичного організму розуміють сумарну ДНК гаплоїдного набору хромосом і позахромосомних генетичних елементів, які містяться в окремій клітині зародкової лінії багатоклітинного організму. Сумарну кількість ДНК в гаплоїдному геномі прийнято позначати латинським символом *C*. Вона вимірюється в пікограмах (пг), нуклеотидних парах (н.п.) або дальтонах ($1 \text{ пг} = 0,965 \cdot 10^9 \text{ н.п.} = 6,1 \cdot 10^9 \text{ Da}$). Розмір генома еукаріот в середньому на 2-3 порядки вище, ніж у прокаріот (табл. 7.1).

Таблиця 7.1. Середній розмір гаплоїдного генома у деяких організмів

| Організм | Середній розмір генома (н.п.) |
|---------------------|--------------------------------------|
| Дрібні віруси | $1,0 \times 10^4$ |
| Мікоплазми | $1,6 \times 10^6$ |
| Бактерії | $2,0 \times 10^6$ |
| Гриби | $4,7 \times 10^7$ |
| Комахи | $2,3 \times 10^8$ |
| Молюски | $1,6 \times 10^9$ |
| Хребетні: | |
| Кісткові риби | $1,4 \times 10^*$ |
| Безхвості амфібії | 2,7 - 10 ⁹ |
| Хвостаті амфібії | 3,6 - 10 ⁹ |
| Рептилії | 1,5 - 10 ⁹ |
| Птахи | 1,2 - 10 ⁹ |
| Ссавці | 2,6 - 10 ⁹ |
| Людина | 3,2 - 10 ⁹ |
| Рослини: | |
| Голонасінні | 1,6 - 10 ⁹ |
| Покритонасінні | 2,7 - 10 ⁹ |
| Лілія <i>Lilium</i> | 1,8 - 10 ⁹ |

Геном еукаріот істотно відрізняється від геному прокаріот за рядом ознак, серед яких необхідно відмітити його надлишковість. Еукаріотична клітина містить у багато разів більше генів, ніж прокаріотична. Підвищений вміст ДНК в геномі еукаріот не можна пояснити лише збільшенням потреби цих організмів в додатковій генетичній інформації у зв'язку з ускладненням організації, оскільки велика частина їх ДНК генома, як правило, представлена такими, що не кодують послідовності нуклеотидів. Феномен значної надмірності генома еукаріот відносно некодуючих послідовностей нуклеотидів відомий під назвою «парадоксу *C*».

Сучасні уявлення про геном людини.

Для всебічного дослідження генома людини в 1990 р. була розроблена і нині втілюється в життя міжнародна програма «Геном людини» («Human Genome Project») - це один з найвідважніших, дорогих і потенційно

важливих проектів в історії цивілізації.

У ядрі кожної соматичної клітини людини знаходиться 23 пари хромосом: на кожному хромосому припадає по одній молекулі ДНК. Довжина усіх 46 молекул ДНК в одній клітині людини дорівнює майже 2 м, кількість нуклеотидних пар складає 6,4 млрд.

Основним завданням програми була побудова досконалих генетичних карт високого ступеню розрізнюваності кожної з 24 груп зчеплення людини, яке повинне завершитися визначенням повної первинної структури ДНК усіх хромосом. Для вирішення цього завдання виник Міжнародний консорціум по вивченню генома людини, що об'єднав 20 лабораторій і сотні вчених у всьому світі. Успішне завершення програми дало людству перспективи для розуміння механізмів функціонування кожного з генів, принципів розвитку організму, встановлення генетичних причин багатьох спадкових хвороб і механізмів старіння.

Вирішення основної задачі програми «Геном людини» включало наступні етапи:

- На першому етапі необхідно було завершити складання детальної генетичної карти і

відмітити гени, віддалені один від одного на відстані, яка не перевищує в середньому 2 млн основ (1 млн. основ дорівнює 1 мегабайз - 1 Мб, від англ. base - основа).

- Другий етап припускав складання фізичних карт низького ступеню розрізнюваності зображення кожної хромосоми (дозвіл 0,1 Мб).
- На третьому етапі слід було отримати фізичну карту високого ступеню розрізнюваності усього генома у вигляді охарактеризованих окремих клонів (клон містить 5 Кб).
- Четвертий етап - секвенування усієї ДНК генома людини (з дозволом в 1 основу).
- На п'ятому, завершальному, етапі необхідно було в знайдених послідовностях нуклеотидів локалізувати усі гени організму та визначити їх функціональне значення.

Генетичні карти зчеплення. Генетичні карти зчеплення визначають хромосомну належність і взаємне розташування генетичних маркерів один відносно другого. Картування у вузькому сенсі - визначення положення гена або мутації в хромосомі, ділянці ДНК з невизначеною функцією, точку розщеплення ДНК рестриктазами. Таким чином, маркер - це будь-яка успадкована ознака, доступна ідентифікації. Встановлення локалізації якого-небудь маркера дозволяє використовувати його для визначення положення іншого маркера.

Маркери, які вибрані для картування, мають бути поліморфними, тобто повинні існувати альтернативні форми ознаки, які можна було б легко відрізнити і описати у членів сім'ї. У послідовності ДНК варіює в середньому один з 300-500 нуклеотидів. Мутації в екзонах можуть призводити до помітних змін - відмінності в кольорі волосся і очей, групі крові, особливостях будови тіла, діяльності фізіологічних систем, схильності до хвороб. Мутації в інтронах мають мінімальний ефект або не мають його взагалі. В той же час ці зміни легко визначаються на рівні ДНК і можуть використовуватися як маркери. Серед маркерів такого типу - поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) - зміна послідовності ДНК у сайтах рестрикції; відмінності в числі тандемних повторів, що призводить до відмінностей за довжиною ДНК, яку можна легко визначити. Можливість побудови генетичних карт зчеплення обумовлена двома фундаментальними характеристиками генома: лінійним характером локалізації генів в хромосомі і відносно стабільним розташуванням облігатних елементів генома в межах виду.

Генетичні ознаки, локалізовані в різних хромосомах, не зчеплені один з одним, тобто передаються від батьків дітям незалежно. Гени, локалізовані в одній хромосомі, рекомбінують за рахунок кросинговера, обміну ділянками гомологічних хромосом в процесі їх спаровування при мейозі. Вірогідність кросинговера між генами залежить від відстані між ними. Чим ближче гени розташовані, тим сильніше вони зчеплені (1% кросинговеру = сантиморганіда (сМ)). Генетична відстань в 1 сМ приблизно дорівнює фізичній протяжності в 1 млн н.п. = 1 Мб. Загальна довжина генома людини в цих одиницях складає близько 3 300 сМ. Генетичні карти зчеплення правильно відображають порядок розташування генетичних маркерів на хромосомах, але значення відстаней між ними приблизні і не відповідають реальним фізичним відстаням. Це визначається тим, що ефективність рекомбінації на окремих ділянках хромосом може сильно розрізнятися. Існують так звані «гарячі» точки рекомбінації і області генома, де рекомбінація пригнічена (центромерні, теломерні і гетерохроматинові ділянки хромосом). Крім того, частота рекомбінації у чоловіків менша, ніж у жінок, так що загальна довжина чоловічого генома, виміряна в одиницях рекомбінації, є меншою. Таким чином, генетичні карти зчеплення є найменш точними. Проте на практиці саме вони і тільки вони дозволяють локалізувати складні генетичні маркери (н., асоційовані з симптомами захворювання).

До початку 70-х років ХХ ст. побудова генетичних карт людини просувалася дуже повільними темпами (н., ген кольорової сліпоти був картований на Х-хромосомі в 1911 р.), а перший аутосомний ген - в 1968 р. До 1994 р. на хромосомах людини було картовано 5 тис. структурних генів і понад 60 000 маркерних ДНК-послідовностей. Такий стрімкий прогрес в

картуванні генів людини пов'язаний з появою нових технологій в цитогенетиці, в клітинних культурах і особливо в молекулярній генетиці.

Гібридизація соматичних клітин. Одним з найбільш популярних методів віднесення генетичного маркера (функціонально активного гена) до конкретної групи зчеплення є гібридизація соматичних клітин різних біологічних видів організмів, один з яких - досліджуваний. Гібридні клони отримують шляхом штучного злиття клітин людини і різних гризунів: китайського хом'яка, миші, пацюка. Культивування таких соматичних гібридів, як виявилось, супроводжується втратою хромосом людини. Втрата хромосом має випадковий характер, і клони клітин, які утворюються, містять хромосоми, що залишилися, в різних поєднаннях. Так отримують панелі гібридних клітинних клонів, які містять одну або декілька хромосом людини і повний набір хромосом іншого виду. Знаходження людських білків, специфічних мРНК або послідовностей ДНК в таких клонах дозволяє однозначно визначити хромосому належність відповідних генів.

Гібридизація in situ. Цей метод дає можливість локалізувати певні послідовності нуклеотидів на хромосомах. Вони виступають зондами. Препарати фіксованих хромосом гібридизують з досліджуваними послідовностями, які мітяться радіоактивною або флуоресцентною міткою. Мічені молекули асоційовані з ділянками хромосом, які містять послідовності, комплементарні міченому зонду. Отримані гібриди аналізують за допомогою мікроскопа. Найбільш популярною виявилася група методів, які дістали назву флуоресцентної гібридизації in situ - метод FISH (fluorescence in situ hybridization).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) дозволила швидко і ефективно ампліфікувати майже будь-яку ділянку генома людини, а отримані продукти ПЛР використовувати як зонди для картування відповідних ділянок на хромосомах шляхом гібридизації in situ.

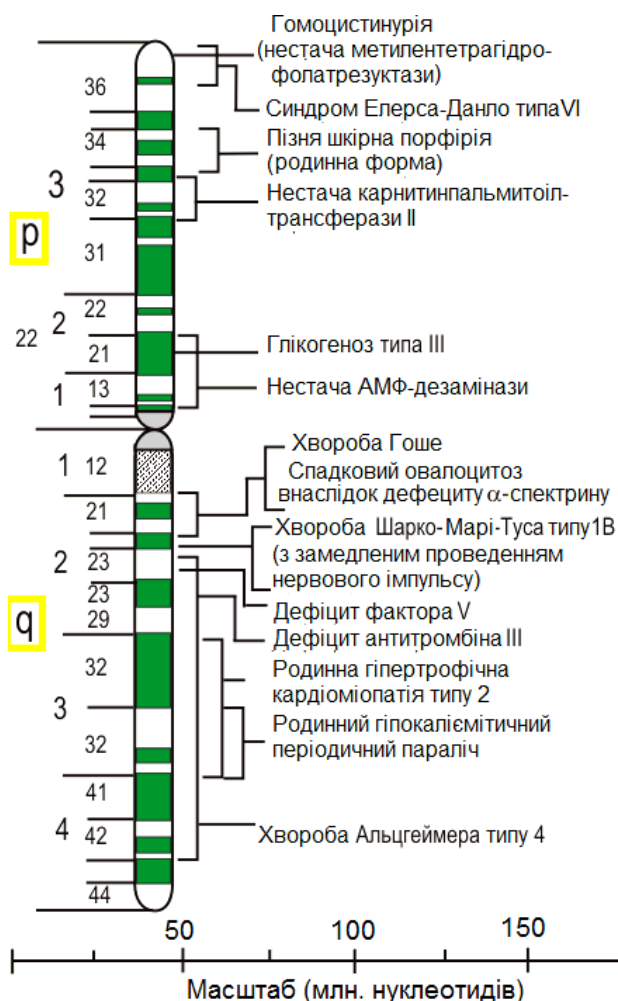
Усі фрагменти ДНК, яка використовується для побудови генетичних і фізичних карт, можна ідентифікувати за допомогою послідовності нуклеотидів завдовжки в 200-500 н.п. (вона є унікальною для цього фрагмента). Ці сайти ампліфікують за допомогою ПЛР і застосовують як зонди. Для отримання маркерів часто застосовують праймери з повторювальними послідовностями, серед яких першими стали використовувати Alu - послідовності, характерні для генома людини. В геномі людини більше 90 % послідовностей, що помірно повторюються, представлені родиними Alu і Kpn I, вони і використовуються для отримання відповідних зондів в ПЛР-реакції.

Фізичні карти низького дозволу. Фізичні карти генома відображають реальну відстань між маркерами, яка виражається в парах нуклеотидів (н.п.). Фізичну карту низького ступеню розрізняваності зображення часто називають цитогенетичною картою генома.

На початку 70-х років ХХ ст. з'явилася реальна можливість точної ідентифікації не лише усіх хромосом в каріотипі людини, але і їх окремих сегментів. Це було пов'язано з появою методу диференціального фарбування препаратів метафазних хромосом. На хромосомах виявляються характерні диски (бенди), розташування яких специфічне для кожної хромосоми. Величина невеликих дисків на прометафазних хромосомах відповідає приблизно 1 млн н. п. на фізичних картах. Кожна хромосома після диференційного забарвлення може бути розділена на сегменти, нумерація яких починається від центромерної ділянки вгору (коротке плече р) або вниз. Смуги в кожному сегменті пронумеровані в аналогічному порядку. Запис положення гена на карті включає номер хромосоми, плече, номер сегменту, бенда і його субдиниці. Запис 7q21.1 означає, що ген локалізований в субдиниці 1-го бенда 2-го сегменту довгого плеча хромосоми 7. Подібний запис зручний для цитогенетичного картування методу гібридизації in situ, що дозволяє локалізувати ген з точністю до одного бенда і навіть його субдиниці.

Хромосомні карти генома людини отримують також виявленням локалізації генетичних маркерів методом FISH (для метафазних хромосом роздільна здатність

знаходиться в межах 2-5 млн н.п.; для інтерфазних - 100 тис. н.п. Для цього рівня картування характерні карти кДНК. Вони відображають положення екзонів відносно відомих цитогенетичних маркерів (бендів) на метафазних хромосомах. Такі карти дають уявлення про локалізацію ділянок генома, які транскрибуються. Вони використовуються для пошуку нових генів, особливо для генів, мутації яких викликають захворювання людини (рис.7.1).



Гомоцистинурія (нестача метилентетрагідрофолатредуктази)
Синдром Елерса-Данло типа VI
Пізня шкірна порфірія (родинна форма)
Нестача карнітинпальмітоїл-трансферази II
Глікогеноз типа III
Нестача АМФ-дезамінази

Рис.7.1. Генетична карта 1-ої хромосоми людини (патологічна анатомія хромосоми 1).

Кількість генів – 3000. Кількість основ – 240 млн., з яких понад 90% - визначені. Відомо 890 генетичних захворювань, пов'язаних з хромосомою 1. Розташування основних генів, порушення діяльності яких викликає захворювання зображено на рисунку.

Список деяких захворювань, які асоційовані з генами хромосоми 1: пізня шкірна порфірія (ген UROD); хвороба Гоше (GBA); рак простати (HPC1); хвороба Альцгеймера (PS2); глаукома (GLC1A); синдром Елерса-Данло; галактоземія; гемохроматоз; гомоцистинурія; дефіцит 3-гідрокси-3-метилглутарил-СоА ліази; хвороба сечі кленового сиропу; дефіцит середньоланцюгової ацил коензим А дегідрогенази.

Фізичні карти високого розрізнення.

Для побудови фізичних карт високого розрізнення експериментально реалізується два альтернативні підходи: картування зверху вниз і картування з низу до верху (рис.7.2). Для картування зверху вниз препарат ДНК індивідуальної хромосоми людини розрізають рестриктазами (н., Not I) на довгі фрагменти, які після розподілу методом електрофорезу в пульсуючому полі піддаються подальшій обробці іншими рестриктазами.

Методом електрофорезу під дією односпрямованого постійного поля в агарозному або поліакриламідному гелях вдається розділити фрагменти ДНК розміром не більше 30-50 тис. н.п. Просування великих фрагментів ДНК в гелі при пульсуючій зміні напрямку електричного поля відбувається за рахунок конформаційних змін, обумовлених скручуванням і розкручуванням молекул ДНК у момент перемикавання напрямлення поля. У цьому випадку вдається розділити молекули ДНК розміром від 50 тис.н.п. до 10 млн н.п.).

В результаті отримують макрорестракційну карту. Метод електрофорезу був з успіхом використаний для картування малих геномів.

Для картування генома людини з низу до верху на основі препарату сумарної ДНК генома або індивідуальної хромосоми отримують серію випадкових клонів довжиною 10-1 000 тис.н.п. ДНК., частина з яких перекривається один з одним. Як вектор для клонування в цьому випадку використовують штучні мініхромосоми дріжджів (YAC). Визначення послідовного набору клонів з певної області генома, що містять фрагменти ДНК, які частково перекриваються і доповнюють один одного, називають ковзаючим зондуванням, або «прогулянкою по хромосомі». Кожного разу відібраний фрагмент використовується в якості ДНК-зонду для наступного пошуку.

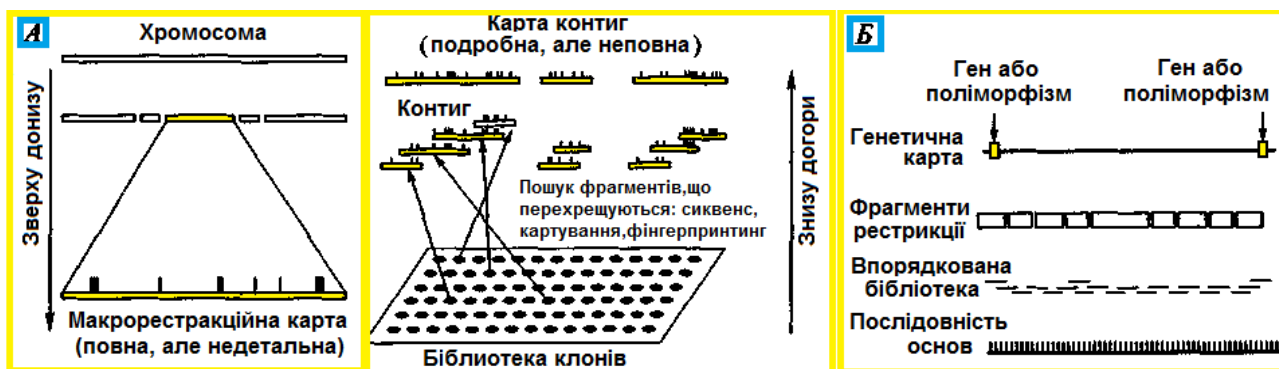


Рис. 7.2. Стратегія фізичного картування генома (А) і типи карт генома (В).

В результаті отримують набір клонуваних фрагментів ДНК ("контиг"), які повністю перекриваються в ділянці генома, що досліджується. Ця стратегія уперше була успішно застосована для вивчення 3-ої хромосоми дрозофіли. З її допомогою рідко вдається пройти більше 200-300 тис. н.п. в одному напрямі із-за наявності в геномі послідовностей ДНК, які повторюються і важко клонуються. Для подолання таких обмежень і прискорення процесу пошуку генних послідовностей Ф.Коллінз запропонував метод "стрибків" по хромосомі, який дозволяє ізолювати фрагменти ДНК, віддалені в геномі один від одного на сотні тисяч пар нуклеотидів (довжина стрибка), не виділяючи усі проміжні послідовності ДНК. Правильність отриманих контигів підтверджує гібридизація *in situ* (FISH) з одночасною прив'язкою до певних ділянок досліджуваних хромосом.

Визначення нуклеотидної послідовності генома людини. Вичерпна фізична карта генома людини має бути повною послідовністю нуклеотидів ДНК усіх його хромосом. До рішення такої грандіозної за об'ємом задачі залучено багато добре фінансованих лабораторій в різних країнах світу, які оснащені автоматичними секвенаторами.

Секвенування починається з субклонування невеликих рестрикційних фрагментів ДНК, що утворюються в результаті рестрикції заздалегідь клонуваних великих фрагментів, і первинна структура коротких фрагментів визначається методом полімеразного копіювання з використанням аналогів (Ф.Сангер), що термінують. Швидкість секвенування до кінця 1998 р. складала 90 Мб. Зараз аналізу частіше піддають продукти ПЛР, а не клоновані фрагменти ДНК. Вже розроблені і впроваджені гігантські автоматичні фабрики по секвенуванню генома - геномотрони (секвенатори-роботи), які виробляють до 105 полімеразних ланцюгових реакцій в годину і секвенують декілька мільйонів нуклеотидів в тиждень. Очікується, що впровадження технологій третього покоління, серед яких флуоресцентне детектування окремих мічених основ в проточних цитофотометрах, пряме читання основ в послідовностях ДНК з використанням скануючих тунельних мікроскопів, прямий маспектрометричний аналіз послідовностей ДНК, гібридизація високомолекулярних фрагментів ДНК з панелями (ДНК-чіпами) коротких фрагментів ДНК, дозволить секвенувати по 500 Мб на рік. Необхідно мати на увазі, що довжина ДНК найменшої Y-хромосоми людини складає 50 Мб, хромосома 1-300 Мб. Це наочно демонструє масштаби завдань, які вирішуються.

Після визначення первинної структури генома людини потрібні будуть довгі роки для її обробки. Один тільки запис усієї послідовності нуклеотидів генома людини звичайним шрифтом потребуватиме близько 200 томів книг по 1000 сторінок кожна. Зберігання і аналіз такого об'єму інформації визначає необхідність створення унікальних алгоритмів обробки інформації за допомогою обчислювальної техніки.

Найбільшою базою даних по структурі генома людини в наш час є GDB (Genome Data Base), створена в університеті Дж.Гопкінса (Балтімор, США). Окрім відомих послідовностей нуклеотидів генома людини в ній зберігається вся отримана інформація про генетичні маркери, зонди і контиги, що асоціюються з генетичними захворюваннями.

Чотири інші бази даних зберігають усі відомі послідовності нуклеотидів, включаючи послідовності нуклеотидів генома людини: GenBank і Genome Sequence Data Base (GSDB) в США; European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Nucleotide Sequence Database у Великобританії; DNA Data Bank of Japan (DDBJ) в Японії і в Росії (Інститутом молекулярної біології ім. В.А. Енгельгардта підтримується база даних Eugene).

На листопад 2011 р. в базі даних знаходилося 2 696 повністю розшифрованих геномів прокариот і 168 геномів еукаріот (<http://www.ebi.ac.uk/GenomeReviews/stats/cellular/>; <http://www.ebi.ac.uk/genomes/>; <http://www.genomesonline.org/>). Безліч геномів про- і еукаріот досліджуються.

Опис і інтерпретація інформації, яка зашифрована в геномі, називається анотацією генома. Цією проблемою займається біоінформатика. Анотація - це процес зв'язування послідовностей з біологічною інформацією, яка в них закладена. Методи анотації швидко розвиваються, але вони ще далеко не спроможні витягнути повну інформацію з генома. Анотація генома включає як експериментальні, так і комп'ютерні аналізи, це складний процес, який покликаний отримати повну інформацію: про нуклеотидні послідовності, які мають функціональне значення; про білок або РНК, які кодуються геномом; про ті процеси, в які залучені різні ділянки генома і кодовані ними продукти.

Структура генома людини (за даними секвенування).

Щоб встановити послідовність генома людини, знадобилося об'єднати зусилля безлічі груп вчених з різних країн. Починаючи з 1998 р. роботи по секвенуванню генома людини проводять паралельно Міжнародний консорціум і приватна комерційна компанія Celera Genomics (президент Крейг Вентор). В лютому 2001 р. були опубліковані дві попередні версії структури генома людини. Опис генома людини поки що не відрізняється високою точністю, але вже зараз можна зробити ряд важливих заключень. Велике значення набуває порівняння генома людини з секвенованими геномами інших еукаріотичних організмів.

На основі комп'ютерних алгоритмів, побудованих на сучасних уявленнях про структуру гена і про білкові домени, була розрахована кількість генів в геномі людини, які кодують білки. Міжнародний консорціум визначив 31 780 білоккодуєчих генів, а фірма Целера Геномікс виявила 39 114 генів. Ці величини є попередніми, і вони набагато менші від раніше постульованого числа білок-кодуєчих генів (≈ 100000). Відзначається нижча щільність білок-кодуєчих генів в геномі людини. Найзагальніші характеристики генома людини приведені в табл. 7.2.

В порівнянні з геномами інших еукаріотів у людини більш поширені гени, які беруть участь в забезпеченні імунного захисту; у розвитку нервової системи (нейротрофічні чинники, чинники зростання нервів), сигнальних молекул, мієлінових білків, потенціал-керуючих іонних каналів і синаптичних рецепторних білків; у побудові цитоскелета і русі везикул, забезпеченні внутрішньо- та міжклітинної сигналізації, підтримці гомеостазу. У людини значно більша кількість генів бере участь в транскрипції і трансляції. Із 2000 таких генів 900 відносяться до родини білків, які містять «цинкові пальці».

У геномі людини число генів, які кодують білки, всього в 2 рази більше числа генів в геномі черв'яка, мушки, рослини. Це обумовлено виникненням у людини великої кількості нових білків. Існує припущення, що *H. sapiens* не «винайшов» нові гени, а використовував існуючі структурні домени, збираючи з них нові білки з новими функціями. Геном людини кодує більше паралогів і багатодомених білків з великою різноманітністю функцій і архітектурою доменів в порівнянні з геномами інших еукаріот. В цілому на долю генів, які кодують білки, доводиться 2% генома; на ділянки, які кодують РНК, - $\approx 20\%$ генома, повторювані послідовності займають більше 50 % генома, причому значна частина цієї ДНК виникла за рахунок зворотної транскрипції РНК.

Таблиця 7.2. Загальні структурні характеристики генома і протеома людини (Ventor et al., 2001).

| Геном | | Протеом % | |
|--|-------------------|--|------|
| Довжина | 2,91 Мб | Ферменти | 10,2 |
| G+C | 38% | Трансдукція сигналу | 12,2 |
| Повтори | 35-50 % | Чинники зв'язування нуклеїнових кислот | 13,5 |
| Анотовані гени (декілька методів, ідентифікації співпадають) | 26 383 | Клітинна адгезія | 1,9 |
| Доля анотованих генів з повністю невідомою функцією | 42% | Цитоскелетні структурні білки | 2,8 |
| Число генів (анотованих і гіпотетичних) | 39 114 | Позаклітинний матрикс | 1,4 |
| Доля анотованих і гіпотетичних генів з невідомою функцією | 59% | Імуноглобуліни | 0,9 |
| Середній розмір гена | 27 000 | Іонні канали | 1,3 |
| Найбільш багата генами хромосома | 19 (23гена/Мб) | Протоонкогени | 2,9 |
| Найменш багаті генами хромосоми | 13, Y (5генів/Мб) | Внутрішньоклітинний транспорт | 1,1 |
| Частина генома, зайнята генами | 25,5-37,8 % | Чинники транскрипції | 6 |
| Частина генома, зайнята екзонами | 1,1-1,4% | Регуляторні молекули | 3,2 |
| Частина генома, зайнята інтронами | 24,4-36,4 % | Транспортери | 1,7 |
| Частина генома в міжгенному просторі | 74,5-63,6 % | Рецептори | 5 |
| Щільність мононуклеотидного (SNP) поліморфізму | 1/1 250 н. п. | Функція невідома | 41,7 |

До 10 % генома людини складають елементи, які повторюються та за своєю будовою нагадують інтегровану форму інфекційних ретровірусів птахів і ссавців. Число виявлених родин ендегенних ретровірусів в геномі людини більше 30, їх біологічна роль в геномі невідома. Цікаво, що у мавп ендегенних вірусів набагато менше або немає взагалі. Виходить, що за сторонніми елементами геноми людини і мавпи розрізняються набагато сильніше, ніж по самих геномах. Це дало основу одному з відомих дослідників генома академікові Е.Д.Свердлову висловити думку про те, що віруси могли зіграти важливу роль в «олюдненні» мавпи. У зв'язку з цим проблема походження людини отримала нове звучання.

Ідентифіковані гени практично усіх спадкових захворювань, які часто зустрічаються (≈ 320) і порівняно рідкісних (≈ 170), 30 рецесивних і більше 100 доміантних онкогенів. Проте на сьогодні не можна виключити вірогідність того, що додаткові гени розташовуються у ділянках генома, які досі не секвеновані. Міжнародний консорціум 14 квітня 2003 р. повідомив, що розшифровано 99,99 % геному людини. Отримали завершену послідовність генома, яка має мінімальне число помилок (≤ 1 на 10 000 ланок ДНК), вона максимально повна - пропуски залишаються тільки там, де послідовність не може бути встановлена сучасними технологіями. Зроблені узагальнення по структурі генома людини.

1. Геном вражає різноманітністю розподілу різних елементів: генів, псевдогенів, мобільних елементів, змісту G+C, острівців CpG і швидкостей рекомбінації. Цей розподіл відрізняється від миші і навіть від мавпи.

2. 20000-30000 генів, які кодують білки, ніяк не пояснюють відмінностей в складності людини і черв'яка або дрозофіли.

3. Сотні генів людини, можливо, є результатом їх горизонтального перенесення від бактерій. Більшість інших є продуктами транспозонів.

4. Геном, особливо в періцентроммерних і прителоммерних областях, наповнений дуплікаціями довгих сегментів, які є поліморфними в людській популяції і, можливо,

відіграли істотну роль в еволюції. Сегментні дуплікації у людини значно більше поширені, чим у дріжджів, мухи або черв'яка.

5. Швидкості рекомбінацій, як правило, вище в кінцевих ділянках хромосом, на коротких плечах і на менших хромосомах, забезпечуючи, принаймні, один кросинговер на мейоз на кожне плече хромосом.

6. Геном надзвичайно варіабельний, різні індивідууми відрізняються величезною кількістю нуклеотидних замін, положенням транспозонів і навіть довгими сегментними повторами.

7. Геном насичений різними елементами, які повторюються, деякі з них здатні переміщатися в геномі, створюючи нові гени і нові регуляторні елементи.

Дослідження структури генома ряду прокариот і еукаріот, і людини зокрема, сприяло створенню науки – геноміки, яка вивчає геноми на молекулярному, хромосомному, біохімічному і фенотиповому рівнях. Початок ХХІ ст., як вважають сучасні дослідники, які працюють в області геноміки, буде ерою функціональної геноміки і біоінформатики.

Послідовності нуклеотидів еукаріотичного геному.

Отримати сумарну характеристику міри різноманітності послідовностей ДНК, які утворює геном, можна, досліджуючи кінетику реасоціації денатурованої ДНК.

Водневі зв'язки і міжплощинні взаємодії, які стабілізують подвійну спіраль, досить слабкі і при підвищенні температури (до 100°C) відбувається розподіл ланцюгів. Такі процеси називають плавленням подвійної спіралі, або її денатурацією. Оскільки для руйнування двох водневих зв'язків АТ-пар необхідно менше енергії, чим для розриву трьох водневих зв'язків GC-пар, значення температури, при якій відбувається денатурація, залежать від нуклеотидного складу ДНК.

Денатурація - процес зворотний. Наступне відновлення дволацюгової структури ДНК може відбуватися навіть при повній розбіжності ланцюгів. Процес возз'єднання - ренатурація, реасоціація відбувається при зниженні температури за рахунок взаємодії комплементарних основ.

У молекулярній біології широко використовується здатність денатурованих ДНК ренатуроватися з відновленням двоспіральної структури. Вона лежить в основі методу молекулярної гібридизації нуклеїнових кислот. Деякі характеристики еукаріотичного генома можуть бути встановлені за допомогою цього методу.

Дослідження кінетики реасоціації одниткових денатурованих фрагментів ДНК дозволяє отримати характеристику різноманітності послідовностей ДНК, які утворює геном. Дослідження процесу реасоціації, розробка математичного опису реакції, створення обчислювальних програм для розрахунку кінетичних даних (Бритен і співавтр., 1966-1968) виявили надзвичайну інформативність кінетичних параметрів реакції реасоціації ДНК для розуміння складності генома, особливо генома еукаріот.

Результати привели до висновків: значна частина генома еукаріотів складається з послідовностей ДНК, які повторюються різною мірою. Розрізняють послідовності ДНК еукаріот, відповідні трьом фракціям, які виявляються при ренатурації: високоповторювальні, помірноповторювальні і унікальні. Для ДНК кожного виду швидкість реасоціації пропорційна величині генома. Зіставляючи значення швидкості реасоціації ДНК різних видів і ДНК виду з відомою величиною генома, можна визначити розмір генома цих видів. При вивченні реасоціації генома еукаріот уперше були виявлені повторювальні послідовності, які вбудовуються в інші послідовності ДНК.

Унікальна, помірно- та багатоповторювальна ДНК.

У сучасній класифікації повторів прийнято розрізняти послідовності, що багаторазово повторюються, число яких перевищує 10^5 на гаплоїдний геном, і ті, що помірно повторюються, представлені 10^4 копіями.

Багатоповторювальні послідовності включають функціонально і структурно відособлену частину генома, *ДНК satelites* (satДНК). ДНК сателітів складається з коротких тандемних повторів завдовжки 1-20 н.п., організованих у довгі блоки.

Для сателітів характерний ряд властивостей, серед яких найбільш важливі: а) швидка і точна реасоціація в процесі ренатурації ДНК; б) безліч копій; в) проста первинна структура; г) гомогенний склад (протяжні кластери одних і тих же блоків послідовностей, які повторюються); д) пурин-піримідинова асиметрія в розподілі нуклеотидів по ланцюгах ДНК; е) концентрація в прицентромерному гетерохроматині; ж) обмежена реплікація (недореплікація) при політенізації хромосом; з) знаходження у складі хромосом тандемно (один за одним) розташованих кластерів. Вміст ДНК сателіта в геномі еукаріот може досягати 5-50 % від сумарної кількості ДНК. У складі одного генома можна виявити декілька різних сателітних ДНК.

Визначення нуклеотидних послідовностей ДНК сателітів показало наявність в їх складі тандемних повторів з декількох нуклеотидів. Головна одиниця ДНК (базова послідовність) сателітів, яка повторюється, н. у *D.melanogaster*, може бути досить простою і складатися з п'яти або семи нуклеотидів: (AATAT) $_n$, (AATAG) $_n$, (AATAC) $_n$, (AATAAAC) $_n$ і (AATAGAC) $_n$. Зустрічаються і складніші одиниці, що повторюються, (359 н.п.). Базова послідовність ДНК сателіта повторюється багатократно – 10 тис. н.п. і більше. Таким чином, сателітні ДНК утворюють протяжні блоки геномів.

Мічена ДНК сателітів може гібридизувати з хромосомними препаратами *in situ*, а після гібридизації виявляти їх локалізацію. У хромосомах самих різних еукаріот (дрозофіла, ссавці) ДНК сателітів переважно виявляється в центромерних і теломерних ділянках хромосом. Це так звані гетерохроматичні ділянки, в яких матеріал хромосом зберігається в процесі клітинного циклу в значно компактнішому стані на відміну від основної (еухроматичної) частини хромосом.

Ототожнення ДНК сателіта з гетерохроматином означає, що ДНК, яка багаторазово повторюється, не експресується з утворенням поліпептидів або РНК. Локалізація ДНК сателіта в області центромери говорить про те, що вона виконує деяку структурну функцію в хромосомі при мітозі і мейозі. Можливо, функція ДНК сателіта може бути пов'язана з процесами розходження хромосом.

До послідовностей, що помірно повторюються, відносяться послідовності, представлені в геномі десятками або сотнями копій. Серед них можна виділити фракції геномів, які структурно і функціонально розрізняються. Існують родини генів, побудовані із згрупованих тандемних повторювальних копій. Вони беруть участь в здійсненні життєво важливих загальноклітинних функцій. Це гени гістонів, тРНК і рРНК – «гени домашнього господарства», в геномі знаходяться в численних або абсолютно ідентичних копіях.

Велику різномірну групу складають рухливі (мобільні) генетичні елементи різної природи. На їх частку приходиться значна частина генома (10-20 %). На відміну від генів першої групи, окремі родини яких згруповані в одній або декількох ділянках, рухливі елементи розсіяні по усьому геному. У геномі виявляються також розсіяні або кластери генів, що кодують гомологічні білки із схожими функціями. Це гени різних видів актину, тубуліну, глобіну, імуноглобуліну, гени теплового шоку та ін. Вони виконують як загальноклітинні, так і спеціалізовані функції.

Унікальні послідовності. Унікальні (неповторювальні) послідовності – найбільш складний компонент генома еукаріот. Вміст їх варіює у різних організмів в межах 15- 98 % від усієї ДНК. Відсотковий вміст унікальних послідовностей у нижчих еукаріот помітно більший, ніж у вищих. Найменше унікальної ДНК у рослин. У фракцію унікальних послідовностей потрапляють багато структурних генів, які кодують білки. Велика частина унікальних послідовностей є такою, що не кодує і зазвичай не містить в собі генетичної інформації в

загальноприйнятому значенні цього терміну, тобто не кодує функціонально значущі поліпептидні ланцюги або РНК. Добре відомим прикладом таких унікальних послідовностей є інтрони, загальний розмір яких перевищує сумарний розмір екзонів генів. Сюди слід віднести і послідовності, розташовані між генами.

Незважаючи на широку поширеність послідовностей, які повторюються, в геномі еукаріот, біологічне значення цих і інших некодуючих елементів генома залишається незрозумілим. Викликає сумнів правильність активно обговорюваної протягом двох десятиліть гіпотези про непотрібність надлишкової ДНК генома.

За сучасними уявленнями, саме надлишкові послідовності ДНК чинять стабілізуючий вплив на генетичну інформацію, яка знаходиться в геномі багатоклітинних організмів. Вони розбавляють кодуєчі послідовності некодуючими таким чином, що останні виступають в ролі пасток мутагенів будь-якого виду. Це розбавлення могло статися в результаті еволюційних перетворень генома-попередника шляхом включення в нього некодуючих надлишкових послідовностей за участю різних молекулярних механізмів. Організми, у яких життєво важливі гени максимально захищені від дії мутагенів, повинні мати еволюційну перевагу і в першу чергу зберігатися природним добром. Надлишкові послідовності поводяться цілком «альтруїстично», приймаючи удар мутагенів на себе і специфічно захищаючи життєво важливі ділянки ДНК від мутацій.

Варіантна повторюваність властива таким генам, як глобінові, актинові, імуноглобулінові, хоріонні та ін. Число генів в цих мультигенних родин, як правило, невелике, а міра гомології окремих його членів варіює в широких межах. Члени мультигенних родин, мабуть, утворилися від однієї загальної послідовності шляхом дуплікації і наступної дивергенції.

Гени, що кодують поліпептиди і різні РНК.

Структурних генів, що кодують поліпептиди приблизно 20 тис., з них транскрибуються мРНК, які забезпечують трансляцію на рибосомах і утворення поліпептидів. Гени рибосомальних РНК (рРНК) визначають синтез і структуру РНК. Гени транспортних РНК (більше 80-100 різновидів) визначають утворення тРНК. Сателітна ДНК представлена різноманітними групами нуклеотидів, які повторюються у різних ділянках ДНК, і не транскрибується. Спейсерна ДНК розділяє гени і також не транскрибується. Значення сателітної і спейсерної ДНК до кінця не з'ясовано.

Гени, що кодують білки, як правило, мають екзон-інтронну організацію, проте деякі гени (н., гістотові або кодуєчі інтерферони) не мають інтронів. Число послідовностей сильно варіює від гена до гена, а кількість ДНК, що припадає на інтрони, у багато разів перевищує кількість ДНК в екзонах. Положення інтронів, як правило, фіксоване, а по довжині і складу вони варіюють. Гени, що кодують білки, транскрибуються РНК-полімеразою II і тому часто мають схожі промотори і сигнали поліаденілування. Але багато структурних генів пов'язані з більш специфічними регуляторними послідовностями, які опосередковують дію гормональних та інших чинників.

Структурні гени представлені в геномі в однині, але часто містять сегменти, гомологічні даному специфічному гену в іншій ділянці генома. Такий однокопійний ген може входити до складу родини близькоспоріднених послідовностей (н., у родину генів гормону росту). Члени такої родини можуть кодувати білки, які дещо різняться (н., ізозими). Вони можуть мати різні регуляторні сигнали, відповідальні за експресію генів у різних тканинах або на різних стадіях розвитку (як у разі генів гормону росту або плацентарного лактогену). Однаково членами родини можуть бути і псевдогени. Вважають два алельні гени ідентичними, якщо вони кодують фактично однакові білки і знаходяться під загальним контролем. Близькоспоріднені гени вважаються членами однієї мультигенної родини, навіть якщо вони неідентичні.

Одноколіїні гени можуть також належати великій родині віддалено споріднених послідовностей. Не зважаючи на структурну схожість, гени такої надродини кодують абсолютно різні білки (н., гени пролактину і гормону росту). Розподіл окремих генів по надродинам не завжди вдається провести цілком чітко. Часто схожість нуклеотидних послідовностей членів варіює від 95%, звичайно – до 50% і менше.

Різні структурні гени мають особливості організації. Н., повторювані гени - один і той же ген багато разів повторюється (багато сотень разів), не відділяючись один від одного, утворюють тандеми (н., гени рРНК). Кластери генів - це групи різних структурних генів на певній ділянці хромосоми, поєднані загальними функціями.

Н., кластери п'яти різних гістонів повторюються до 20 разів. Деякі гени серед сателітної ДНК мають регуляторну або підсилювальну дію на структурні гени, н., енхансери.

У вищих еукаріотів гени, найчастіше, представлені не одиничними копіями, а родинами декількох, схожих між собою генів, які кодують споріднені білки. Є різні родини генів: тандемні гени (повторювальні), всі гени родини однакові за структурою і кодують одні і ті ж продукти (гени рРНК, гени гістонів та ін.); мультигенні родини генів (гени знаходяться близько один від одного в одній ділянці генома, але не утворюють гомогенних одиниць, які повторюються, н., актинові і тубулінові гени). Декілька мультигенних родин можуть утворювати суперродину, н., гени глобінів і інтерферонів; гени, що диспергують. Це родини генів, які не утворюють скупчень, а розкидані по геному. Сюди, н., відносяться представники родини актинових генів у дрозозфілі.

Гени, що кодують рРНК. У більшості еукаріотичних геномів рибосомні гени наявні у вигляді протяжних тандемних повторів. Встановлено, що рДНК локалізується у визначеному місці хромосоми - ядерцевому організаторі. Тут відбуваються транскрипція рДНК і процесинг попередників рРНК.

На відміну від генів рРНК, які в більшості еукаріотів наявні у вигляді сотень копій, гени рибосомних білків мають мало копій. Так, у геномах дрозозфілі, миші і людини міститься від 1 до 10 функціонально активних генів для кожного рибосомного білка; виявлені також і процесовані псевдогени.

Рибосомні РНК в еукаріотів кодують чотири гени – 18S; 5,8S; 28S і 5S. Гени перших трьох рРНК утворюють групу зчеплення і їх кодувальні ділянки, згруповані у вказаному порядку в одну одиницю транскрипції. Всі три РНК у результаті процесингу, що включає розщеплювання РНК ендонуклеазами, метилування нуклеотидів та її 2'-гідроксильних груп, утворюються з довгого транскрипта-попередника. Повна одиниця транскрипції містить декілька внутрішніх і зовнішніх спейсерів, для яких притаманна видова різноманітність.

У більшості випадків копії рДНК у хромосомі організовані у вигляді тандемного повтору, що створює протяжний кластер. Ці кластери часто локалізовані в декількох хромосомах. У геномі людини рДНК виявлена в п'яти локусах хромосом: 13, 14, 15, 21 і 22 (по 150-200 копій), при цьому кожен з них містить різне число копій рДНК, а крім того, число копій відрізняється індивідуально. У деяких людей навіть соматичні клітини можуть сильно різнитися за числом копій генів рРНК. Таким чином, для генів рРНК характерне збільшення і зменшення числа копій, як і для інших довгих тандемних повторів.

Гени 5S-рРНК, як правило, зчеплені з генами 18S-, 5,8S- і 28S-рРНК (є винятки серед грибів і найпростіших). Оскільки гени 5S-рРНК транскрибує РНК-полімераза III, частина їх внутрішніх кодувальних послідовностей функціонує як регуляторний елемент. Гени 5S-рРНК, довжина яких складає 120 нуклеотидів, інтронів не мають.

Як і кластери генів інших рРНК, гени 5S-рРНК у багатьох еукаріотів багаторазово повторюються і утворюють родини довгих тандемних повторів. Особливість генів рРНК деяких найпростіших і грибів (*S. Cerevisiae*), полягає в тому, що всі рибосомні гени зчеплені і знаходяться в одній повторюваній одиниці, але гени 5S-рРНК транскрибуються з іншого

ланцюга комплементарного тому, з якого синтезується попередник 18S-; 5,8S - і 28S-rРНК.

Гени, що кодують тРНК. Структура генів тРНК.

Гени тРНК, як і гени 5S-rРНК, транскрибуються РНК-полімеразою III, при цьому промотор теж розташовується всередині кодувальної послідовності. Одні гени тРНК містять інтрони, інші не мають. І переривисті, і безперервні гени можуть бути навіть в одного і того ж виду (н. у дрозофіли), інтрони генів тРНК короткі (не більше 45 п.н.), і завжди знаходяться з 3'-кінця від антикодонової послідовності.

Гени тРНК в еукаріотичних геномах наявні у великій кількості копій, але гени тРНК не впорядковані і розташовані безладно. Копії генів однієї тРНК можуть знаходитися в одному кластері або в різних. Н., у хромосомах дрозофіли знайдено близько 50 різних локусів, в яких групуються ці гени. Такі локуси можуть містити гени різних тРНК. У людини на гаплоїдний геном нараховується близько 1300 копій, по 10-20 копій кожної тРНК, які мають різну організацію.

Гени мікроРНК в еукаріотичних клітинах визначають безліч коротких стабільних молекул РНК, більшість яких є у складі нуклеосом, які наявні в ядрі, або в цитоплазмі. Деякі мікроРНК відіграють ключову роль у процесингу первинних транскриптів з утворенням зрілих мРНК і рРНК, інші – зв'язуються з мРНК-мішенями, пригнічують їх трансляцію або викликають руйнування (деградацію).

У людини є родина послідовностей мікроРНК-генів, яка містить ≈ 30 копій, організованих у тандемні повтори, що знаходиться на короткому плечі 1-ої хромосоми. Кожен функціональний ген у повторі входить до складу одиниці, що повторюється, завдовжки не менше 44 тис. п.н. Псевдогени розташовуються в різних локусах генома і зустрічаються в 10 разів частіше, ніж відповідні гени.

Гени гістонів. ДНК у клітинах утворює комплекс із гістоновими і негістоновими білками – *хроматин* (в хроматині сперми замість гістонів наявні білки протаміни, які з'являються на стадії сперматид).

Гістони – основні білки, що формують нуклеосоми хроматину. Їх п'ять видів: H1, H2a, H2b, H3 і H4) і кожен кодується відповідним геном. Гістонові гени позбавлені інтронів і згруповані в єдиний кластер завдовжки ≈ 6900 н.п.. Такі кластери повторюються в геномі людини ≈ 35 разів, а в морського їжака – 300-1000 разів, що прискорює швидкість синтезу гістонів у S-фазі клітинного циклу. У хромосомі кластери знаходяться тандемно один за одним, а гени в кластерах розташовуються в одній і тій же послідовності і розділені між собою спейсерами, на які приходиться близько 70 % всієї довжини кластеру.

У людини і більшості інших еукаріотів у всіх п'яти гістонових генах виступає один і той же кодуючий ланцюг ДНК, кластер гістонових генів транскрибується як єдине ціле - у вигляді однієї довгої про-мРНК, яка визначає всі п'ять гістонових білків (за винятком дрозофіли – гени гістонів транскрибуються окремо і в різних напрямках), але при дозріванні про-мРНК вона розрізається на п'ять окремих гістонових мРНК.

Таким чином, організація різних генів РНК і гістонів дає нам уявлення про розташування генів, продукти яких повинні синтезуватися у великих кількостях за короткій проміжок часу.

Мультигенні родини відрізняються мірою складності організації. Найбільш прості мультигенні родини утворюють гени, що кодують рРНК. Складніше влаштовані гени для гістонів і тРНК. Найбільш складна організація характерна для регульованих мультигенних родин, контролюючих ключові стадії розвитку організмів.

Тандемні повтори. Тандемно організовані послідовності ДНК різних типів широко представлені в еукаріотичних геномах. Вони варіюють по довжині кластера і розміру повторювальної ланки. У разі генів рРНК або гістонових генів тандемно повторюються групи однакових генів. У тандеми організовані споріднені гени, але такі що відрізняються, н., члени

мультигенних родин глобінових і овальбулінових генів. Тандемні повтори зустрічаються в кодуючих і некодуючих ділянках, між генами і в інтронах.



Тандемні повтори, де б вони не знаходилися, як правило, зв'язані з міжвидовим поліморфізмом. Спейсери між генами рРНК і між одиницями транскрипцій рРНК містять безліч внутрішніх тандемних повторів, які відповідальні за поліморфізм довжини спейсерів. Причиною походження подібної варіабельності може стати нерівномірний кросинговер (рис. 7.3).

Рис. 7.3. Нерівний кросинговер.

Якщо алелі зміщуються одна відносно іншої на декілька повторювальних ланок, то результатом кросинговера буде делеція в одному алелі і збільшення кількості повторів в іншому. Найчастіше зміни числа повторів коротких послідовностей зв'язують з явищем «проковзування» нитки ДНК в процесі реплікації або репарації ДНК (рис. 7.4).

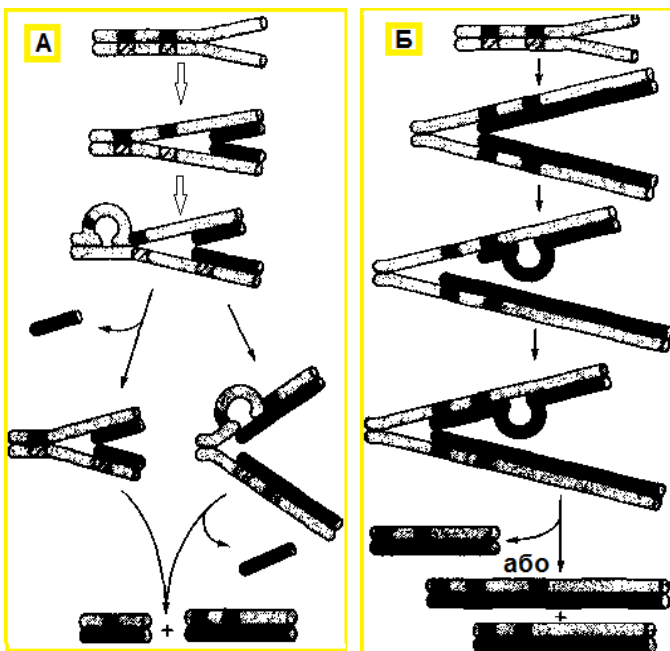


Рис. 7.4. Делеції і ампліфікація, що виникає при реплікації або репарації.

А – «проковзування» матричного ланцюга, вирізання петлі або реплікація з наступною репарацією, що призводить до делеції; Б – «проковзування» ланцюга, який синтезується, і наступна репарація, які призводять до ампліфікації.

За наявності тандемних повторів коротких послідовностей може відбуватися утворення петель декількох одиниць відстаючого ланцюга, який повторюється, у вилиці реплікації і утворення дуплексу з матричною ниткою із зміщенням на відповідну кількість тандемних повторів. Найбільш поліморфною серед тандемно організованих послідовностей, які

повторяються, є мінісателіти і мікросателіти ДНК, мінливість яких проявляється, зокрема, алельними варіаціями кількості ланок, які повторюються.

Суперродина генів і їх продукти.

У геномі всіх хребетних міститься безліч генів і псевдогенів α - і β -ланцюгів, які утворюють суперродину. Вона включає кодувальні послідовності генів глобінів безхребетних, міоглобіну хребетних і леггемоглобіну рослин. Всі ці білки містять гем і зв'язуються з киснем. Глобінові мРНК і відповідні гени були серед перших об'єктів, які досліджувалися методами рекомбінантних ДНК. На частку гемоглобіну припадає більше 90% всіх розчинних білків еритроцитів, а на частку глобінової мРНК – більша частина мРНК ретикулоцитів і ядерних еритроцитів. У жодних інших клітинах глобінові гени в помітній кількості не транскрибуються. Можливість отримання відносно чистої глобінової мРНК, наявність величезного числа вже відомих мутацій у генах глобіну людини, а також дані про властивості глобінових білків послужили стимулом до молекулярних досліджень цих генів. Вдалося отримати перші дані про інтрони в клітинних генах і про властивості промоторів для РНК-полімерази II. Встановлена нуклеотидна послідовність різних алелей глобінових генів у людини й інших видів, що послужило основою для створення численних теорій еволюції глобінів.

Як правило, у ссавців є багато глобінових генів і псевдогенів. У людини β -глобінові

гени об'єднані в кластер завдовжки 65 тис. н.п., розташований у хромосомі 11, а α -глобінові гени утворюють кластер завдовжки 25 тис. н.п. у хромосомі 16. Кластер β -глобінових генів містить п'ять генів, α -глобіновий – три. Обидва кластери включають по декілька псевдогенів. Усередині генів містяться протяжні інтрони: у гені β їх два з довжиною 120 і 555 н.п.

У людини й інших ссавців різноманітні глобінові гени експресуються на різних стадіях розвитку організму. Так, кожен із 5 β -глобінових генів кодує певний β -ланцюг характерний для раннього ембріогенезу, для розвитку плода, для дитячого і дорослого віку. У багатьох видів, у тому числі й у людини, розташування генів в α - і β -кластерах відповідає тому порядку, в якому вони експресуються під час розвитку організму.

Рухливі генетичні елементи еукаріот.

10-30 % генома еукаріот складають повторювальні послідовності, які мають певну структурну організацію і здатні переміщатися в геномі як в межах однієї хромосоми, так і між хромосомами - це рухливі генетичні елементи (РГЕ). РГЕ включають до свого складу від тисячі до десятків тисяч н.п. Переміщення рухливих елементів здійснюється або шляхом вирізування елемента з одного місця і вбудовування його в інше, або шляхом утворення копії рухливого елемента, які вбудовуються в нове місце, тоді як батьківська копія залишається на своєму місці, збільшує їх число в геномі. Відкриття рухливих елементів показало, що послідовність нуклеотидів ДНК по довжині хромосоми змінюється завдяки переміщенню цих елементів. Вбудовуючись в гени або в сусідні з генами ділянки, вони або викликають мутації, або підвищують рівень активності сусідніх генів. Усе це дозволило поглянути по-новому на природу мутаційних процесів і молекулярних механізмів еволюції генома.

Рухливі елементи еукаріот представлені окремими родинами, схожими по своїй структурі і поведінці. Усередині родини розрізняються підродина ідентичних або дуже схожих рухливих елементів, число яких коливається від декількох копій до декількох тисяч копій на геном. Найбільша кількість рухливих елементів виявлена в геномі рослин (до 50 %). Рухливі генетичні елементи зазвичай розсіяні у геномі, але можуть концентруватися в окремих ділянках хромосом.

Розрізняють два основних класи РГЕ: транспозони і ретротранспозони. Така класифікація заснована на молекулярних механізмах, за допомогою яких переміщуються ці елементи.

Псевдогени містять нуклеотидні послідовності, схожі з послідовностями функціонально-активних генів, але не можуть експресуватися з утворенням функціонально-активного білка. Деякі псевдогени мають у цілому таку ж структуру, як і функціонально-активні гени, із звичайним розташуванням послідовностей відповідних екзонів і інтронів.

Вони втрачають активність у результаті мутацій, що порушують експресію гена. Ці зміни можуть проявлятися порушеннями ініціації транскрипції, перешкоджати здійсненню сплайсингу на межах екзон-інтрон або призводити до передчасного термінування трансляції. Зазвичай псевдоген має декілька мутацій, тому що ген, що втрачає активність, стає об'єктом для подальшого накопичення мутацій. Такі псевдогени виявлені в багатьох системах генів, включаючи гени глобінів, імуноглобінів, антигенів гістосумісності тощо. Н., псевдоген кролика зі звичайною організацією екзонів і інтронів за будовою близький до функціонально-активного гена, але в 20-му кодоні псевдогена є делеція однієї пари нуклеотидів, що викликає порушення рамки читування, через це трансляція термінується незабаром після її початку. У результаті точкових мутацій виявилися зміненими декілька розташованих правіше кодонів, що кодують амінокислоти, наявні у всіх глобінах, але один із двох інтронів псевдогена не зберіг межових послідовностей, що узгоджуються з правилом. Тому інтрони не можуть бути видалені при процесингу, навіть якщо б ген і транскрибувався.

Виходячи зі структури таких псевдогенів вони мають незалежний характер еволюціонування певного кластеру генів кожного виду організмів. Виникнення нових генів,

закріплення в геномі як функціональних копій, їх зміна, що призводить до утворення нових функціонально-активних генів або інактивації з утворенням псевдогенів – процеси, які відбуваються в кластері постійно.

Псевдогени є членами більшої частини родин генів. Псевдогени складають дуже невелику частину від загального числа генів, але рибосомальний білок миші кодується одним активним геном і має близько 15 схожих із ним псевдогенів. Механізми, відповідальні за дуплікації, делеції і перебудови генів, впливають на всі послідовності, що відносяться до членів кластеру, незалежно від їх функціональної активності. Ділянка, що включає псевдогени, – це повторювальна послідовність, яка оточує початок активного гена (від -73 до +101 н.п.). Дивовижна особливість кластеру полягає в тому, що він повинен містити однакове число генів і псевдогенів. Псевдогени - це побічний ефект перебудов функціонально-активних генів.

Н., промотор транскрипції псевдогена 5S РНК цілком розташований усередині гена, цей псевдоген відрізняється від гена ділянкою з 9-ю точковими мутаціями. Чи достатні такі зміни для того, щоб псевдоген втратив здатність до транскрипції з утворенням РНК-продукту *in vivo*? У клітині могли проходити РНК залежні транспозиції, що призводять до утворення псевдогенів. Деякі псевдогени проявляють ознаки, які свідчать про можливість їх походження з РНК. Початок псевдогена відповідає точці еквівалентній до 5'-кінця РНК, і саме це свідчить про походження його ДНК з РНК. Декілька псевдогенів складається із з'єднаних послідовностей екзонів, що доводить посередництво РНК при утворенні псевдогена. Псевдоген може закінчуватися короткою ділянкою з А-Т пар основ, а з обох його боків є короткі прямі повтори.

Транспозони – рухливі генетичні елементи, обмежені інвертованими повторами (послідовностями, спрямованими один назустріч одному). Прикладом їх можуть служити Р-елемент дрозофіли і Ас-елемент кукурудзи. У геномах цих організмів налічується по 30-50 копій таких елементів. Повні копії (частина копій дефектна, мають внутрішні делеції) містять відкриті рамки зчитування, які кодують транспозазу (рис. 7.5).

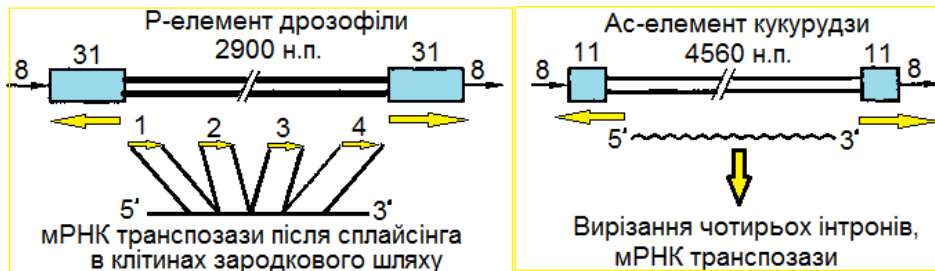
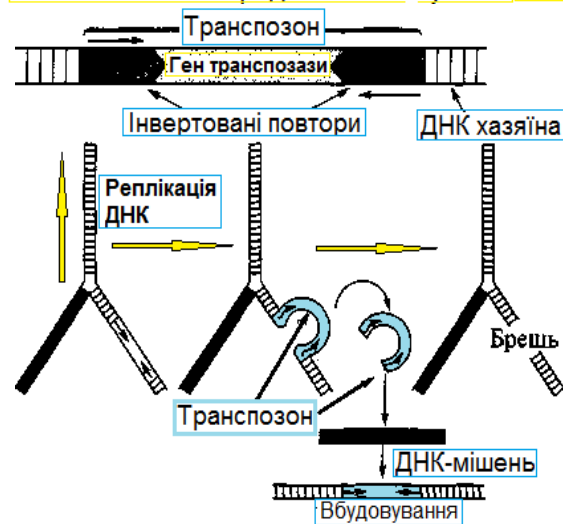


Рис. 7.5. Транспозони еукариот.

Схема переміщення транспозона показана на рис. 7.6. Інвертовані повтори потрібні для



переміщення елемента, яке здійснюється завдяки їх зближенню один з одним і пізнаванню транспозонами.

Рис. 7.6 Переміщення транспозона.

Інвертовані повтори зближуються і точно відрізаються від сусідніх ділянок ДНК хазяїна. Вірваний транспозон вбудовується в ділянку транспозазою, яка має розрив, в молекулі-мішені і зшивається з ДНК хазяїна в новому місці. Розрив і зшивання здійснюються транспозазою і допоміжними білками. Транспозаза може кодуватися як самим рухливим елементом, який переміщується, так і іншою копією елемента,

локалізованою в тому ж геномі. Р-елементи зазвичай вбудовуються в певні сайти, які мають послідовність: 5'-GGCCAGAC. При вбудовуванні Р-елемента цей сайт-мішень дуплікується. Р-елемент міститься тільки в деяких лініях *D. melanogaster*. Схрещування самок без Р-елемента з самцями, що несуть Р-елементи, приводить у гібридів до транспозицій Р-елемента, які спостерігаються тільки в клітинах зародкового шляху. Сукупність таких ефектів називають гібридним дисгенезом. Дисгенні мухи зазвичай стерильні, а якщо вони фертильні, то у їх нащадків виявляється безліч мутацій і ці ознаки передаються наступним поколінням. Тому лінії з Р-елементом і без нього виглядають як репродуктивно ізольовані, принаймні частково.

Ізоляція ліній викликана активацією транспозицій Р-елемента, присутнього в одній з них. Причина, чому транспозиції Р-елемента обмежені зародковими клітинами, пояснюється тим, що тільки в клітинах-попередниках гамет відбувається такий тип сплайсингу, який призводить до утворення безперервної відкритої рамки трансляції, що кодується транспозазою (рис. 7.5). Обмеження транспозиції зародковими клітинами має певний сенс, оскільки забезпечує виживання особин, що несуть гамети, в яких сталися перебудови геномів внаслідок транспозиції Р-елемента. Подібний «шок генома», що супроводжується високою частотою мутагенезу, може забезпечити значну мінливість генома, що підпадає під тиск добору в процесі еволюції.

Переміщення Ас-елемента відбуваються і в соматичних клітинах кукурудзи. За ними можна стежити по розподілу ділянок мутантів тканини, н., позбавлених пігменту внаслідок інактивації гена, що визначає пігментацію. Потомство клітини, що містить тільки інактивовані гени, також буде позбавлено пігменту. Вирізання мобільного елемента призводить до реактивації гена. У зв'язку з цим був зроблений висновок про регуляторну функцію елементів, які переміщуються, і вони були названі контролюючими (Б.Мак-Клінток).

Розрив в ДНК після вирізання транспозона може закладатися або за допомогою гомологічного відрізка ДНК, або за рахунок зшивання розірваних кінців (це особливо характерно для транспозонів рослин).

В цілому рухливі елементи еукаріот представляють надзвичайно різномірну популяцію. Існує думка про те, що вони не впливають на фенотип організму і розмножуються в геномі лише завдяки особливостям своєї структури, внаслідок чого поступово заселяють геном. Передбачається, що вони складають частину так званої егоїстичної ДНК, розмноження якої обмежується природним добром. Відбір усуває ті випадки, коли впровадження егоїстичної ДНК супроводжується шкідливими наслідками. На певних стадіях еволюції ці елементи можуть надалі забезпечити селективні переваги організму.

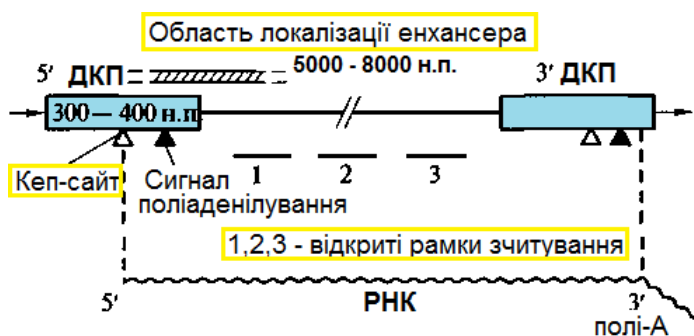


Рис. 7.7. Ретротранспозони з довгими кінцевими повторами.

Великим класом рухливих елементів є ретротранспозони, схожі за своєю структурою з проретровірусами, які вбудовуються в геном, використовуючи механізми зворотної транскрипції. Ці елементи містять «тіло» розміром 5-8 тис.н.п., обмежене прямими довгими кінцевими повторами (ДКП, або LTR - від англ. long terminal repeats), що містять по 300-400 п.н. (рис. 7.7). Число копій цих елементів, що належать до однієї родини, досить постійне для виду, але варіює від декількох до сотень тисяч копій залежно від типу ретротранспозона. Ретротранспозони, що відносяться до різних родин, не мають довгих гомологічних нуклеотидних послідовностей ні в ДКП, ні в тілі. У складі «тіла» елемента виявляються відкриті рамки зчитування для зворотної транскриптази і нуклеази (інтегрази). Різні копії однієї родини можуть мати вставки і делеції як в ДКП, так і в

самому елементі. По флангах ДКП знаходяться короткі прямі повтори. Ретротранспозони широко поширені у еукаріот.

Один із способів переміщення ретротранспозонів припускає його транскрипцію за допомогою РНК-полімерази II. У складі ДКП є сайти ініціації транскрипції і сигнали поліаденілування. ДКП можуть служити активними промоторами. Транскрипція починається в одному ДКП (умовно лівому, 5'-ДКП), а закінчується в іншому (правому, 3'-ДКП). Молекула РНК, що синтезується, транслюється з утворенням ферментів, необхідних для синтезу ДНК і вбудовування її в геном. Ця схема повністю повторює схему утворення і інтеграції провіруса

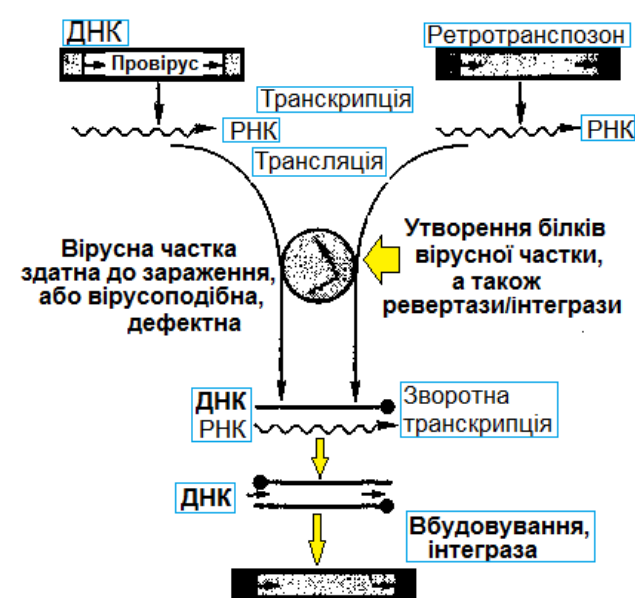


Рис. 7.8. Переміщення транспозонів з довгими кінцевими повторами. ДНК (→) забезпечують початок і кінець транскрипції, а також реплікацію.

неінфекційними, здатними лише до самовідтворення і «підзаряження» генома, в якому він знаходиться.

Занурення ретротранспозона всередину гена або біля гена викликає різні ефекти. У багатьох випадках відбувається інактивация гена (рис.7.9).

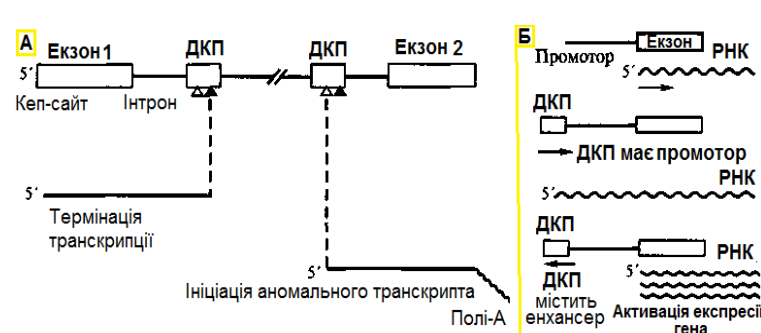


Рис. 7.9. Ефекти впровадження ретротранспозона всередину гена або біля гена: А - порушення транскрипції при зануренні в інтрон; Б - посилення експресії гена при зануренні в 5'-ділянку гена.

При інтеграції в район промотора на 5'-кінці гена ретротранспозон може різко активувати експресію гена, забезпечуючи транскрипцію з власного промотора. Якщо рухливий елемент виявився біля протоонкогена, то результатом може бути надпродукція білку і злякисне переродження клітини. Це ж можливо при дії енхансерів, що привносяться мобільним елементом. Особливі можливості для перенесення і придбання регуляторних сигналів виникають тоді, коли ретротранспозон віддаляється за рахунок гомологічної комбінації між ДКП з ідентичними повторами (рис.7.9). В результаті зберігається лише один ДКП на місці впровадження ретротранспозона. Самотні ДКП істотно впливають на мінливість регуляторних систем клітини. Такий промотор може перепрограмувати роботу гена залежну як від зовнішніх сигналів, так і від внутрішньоклітинних регуляторних систем.

Представлені випадки супроводжуються мутаціями з різними фенотиповими проявами, обумовленими пригніченням утворення або, навпаки, гіперпродукцією білка. Переміщення елементів по геному сприяє поширенню регуляторних сигналів (сайтів ініціації транскрипції, сигналів поліаденілування, або енхансерів), що робить важливою роль

мобільних елементів в еволюції систем регуляції.

**Ретротранспозон без ДКП
(впізнання ділянки вбудовування
і зворотна транскрипція)**



Рис. 7.10. Переміщення ретротранспозона без ДКП.

Існує інший великий клас ретротранспозонів, які не несуть довгих кінцевих повторів. Механізм занурення їх трохи інший, хоча він також здійснюється за допомогою зворотної транскрипції. До них відносяться представники родини L1, що є в геномі людини. Реплікація елемента без ДКП зв'язана безпосередньо з районом майбутнього занурення ретротранспозона (рис. 7.10). РНК, яка утворюється при транскрипції елемента, рухається до випадкового місця розриву ДНК-мішені та часто зшивається з однією з ниток ДНК. Сюди спрямовуються і необхідні для інтеграції білки – зворотна транскриптаза і інтеграза. Друга нитка комплементарної ДНК служить приманкою для копіювання РНК-копії елемента за участю зворотної транскриптази. Фермент копіює спочатку невелику ділянку ДНК-мішені, а потім змінює матрицю і копіює

РНК, після чого РНК віддаляється і утворюється друга нитка комплементарної ДНК. Ретротранспозони (без ДКП) беруть участь в збереженні кінців хромосом у ряді клітинних поколінь.

Подібну функцію у багатьох організмів виконує теломераза. У деяких комах, н., у дрозофіли, відсутня теломеразна активність. Кінці ДНК у них подовжуються за рахунок переміщення ретротранспозонів і в цьому випадку виступають як компоненти генома, що рятують хромосому від вкорочення. Ретротранспозони рухаються, утворюючи структуру, що повторюється, в якій елементи сполучені собою за типом «голова до хвіста». Спочатку на РНК-транскрипті як на матриці за допомогою зворотної транскрипції будується нитка комплементарної ДНК, а потім після видалення РНК-матриці добувається інша. Таким чином, геном хазяїна пристосував ці елементи для збереження кінцевих ділянок хромосом і для порятунку хромосоми від втрати генів.

У геномі ссавців, птахів, амфібій і комах знайдені ретропозони - ДНК-копії, синтезовані на різних типах клітинних РНК, як на матрицях. Структура ретропозонів вказує на участь зворотної транскрипції в процесі їх утворення. Таким чином, разом з перенесенням інформації від ДНК до РНК існує і зворотний процес - повернення їх в геном у вигляді ретропозонів. У ссавців ретропозони складають більше 10 % ДНК, отже, потужність зустрічного потоку інформації від РНК до ДНК може бути істотною, принаймні при оцінці його в часовому еволюційному масштабі. Розрізняють різні типи ретропозонів, серед них псевдогени. Це копії генів, позбавлені інтронів і мають послідовність полі-ДА-полі-дТ на 3'-кінці. Матрицею при їх копіюванні стала «процесована» поліаденоїлована мРНК. Рамки трансляції таких «генів» часто «зіпсовані» стоп-кодонами і делеціями. Вони, як і проретровіруси, обмежені короткими прямими повторами, які є дуплікованими послідовностями генома, що є в ділянці сайту впровадження ДНК-копії, утвореній на мРНК.

Велика кількість повторювальних елементів хребетних - ДНК-копії клітинних РНК, які кодують невідомі білки, а також аномально процесовані клітинні транскрипти тРНК, 7S РНК і УРНК. Вони є довгими і короткими повторами. Родини повторювальних послідовностей, одержують свої назви за рестриктазами, які їх розщеплюють (н., короткі Alu-повтори або довгі Kpn-повтори в геномі людини).

Кожен вид ссавців має власні головні родини довгих повторів, що відрізняють його від

інших видів. Припускають, що різні родини довгих повторів виникли порівняно недавно, вже після еволюційної дивергенції видів ссавців.

Короткі повтори, н. повтори Alu -родини у людини, складають 3×10^5 , що відповідає 5-6% маси ДНК клітини. Їх нуклеотидна послідовність гомологічна послідовності окремих ділянок 7S РНК. Такі повтори розсіяні по геному, їх виявляють в інтронах, на 5'-кінцях генів, у складі 3'- ділянок гена, які не транскрибуються.

Між особинами одного виду іноді спостерігаються відмінності (поліморфізм) в структурі генів і їх найближчого оточення, обумовлені вбудовуванням коротких або довгих повторів. У геномі існує безліч неактивних дефектних копій цих елементів, вони не здатні кодувати транспозазу або зворотну транскриптазу. З іншого боку, вони зберігають здатність до переміщень, якщо у транспозонів є інвертовані повтори, які впізнаються транспозазою, а у ретротранспозонів збережені промотор і можливість транскрипції елементу. Безліч таких дефектних копій почнуть переміщатися, якщо ферменти, відповідальні за переміщення, кодуватимуться іншими повноцінними елементами. У геномі людини джерелом активної зворотної транскриптази є ретротранспозон L1 (кількість копій досягає 100 тис.). Активно переміщуються 30-60 тис., інші, пошкоджені, рухатися не можуть.

Мобільні генетичні елементи беруть участь в перебудовах хромосом. Наявність в хромосомах декількох однакових за нуклеотидною послідовністю копій рухливого елемента дозволяє здійснювати рекомбінацію по районах їх локалізації. В результаті нерівного кросинговера виникають делеції окремих ділянок або дуплікації (рис. 7.11).

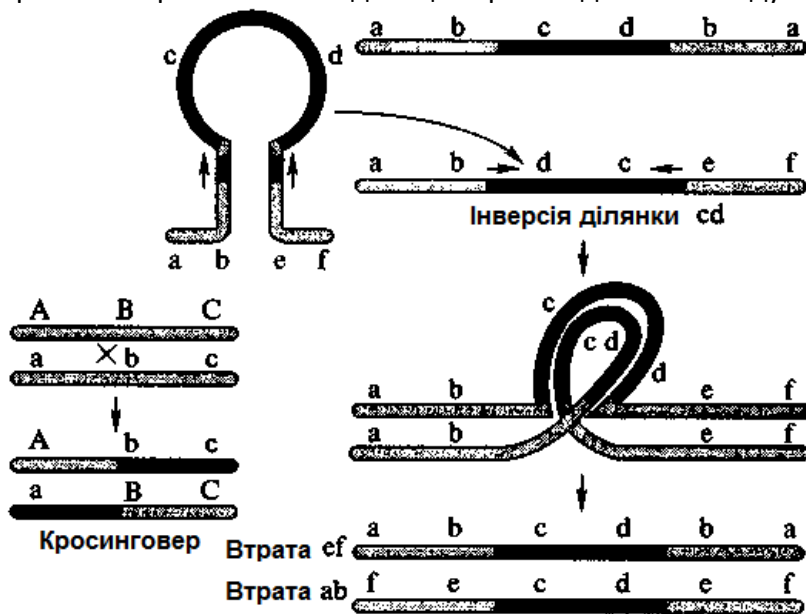


Рис. 7.11. Перебудови хромосом, обумовлені присутністю в них однакових послідовностей (позначені буквами), що повторюються, представлених рухливими елементами.

Нерівномірний кросингвер по ділянках локалізації транспозона *mariner* (моряк) у людини призводить до делеції ділянки короткого плеча 17-ої хромосоми. Якщо ця подія відбувається в зародковій клітині при дозріванні гамет, то хромосома з делецією буде передана нащадкам. Це

призводить до спадкових захворювань нервової системи - невропатій і паралічів.

Внутрішньохромосомна рекомбінація між двома елементами призводить до інверсії – обернення ділянки хромосоми на 180°. Інверсія може бути шкідлива для організму, а може сприяти еволюції генома, оскільки допомагає передати потомству сприятливе поєднання генів, що випадково утворилося, перешкоджаючи кросинговеру.

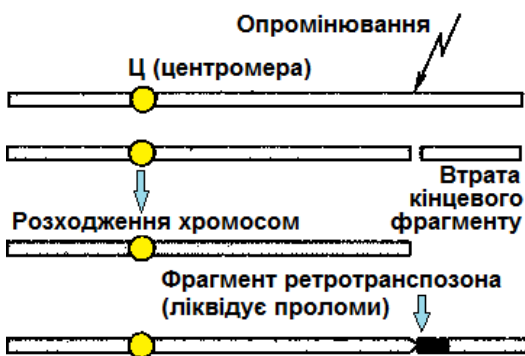


Рис. 7.12. Усунення дволанцюгового розриву ДНК за допомогою ретротранспозона.

Ретротранспозони з ДКП беруть участь у ліквідації дволанцюгових розривів ДНК. Зазвичай такий розрив відновлюється за допомогою

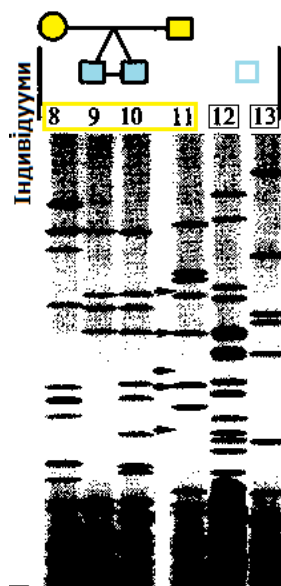
гомологічної молекули ДНК, н. сестринської, новореplikованого ланцюга. Участь реплікуючих ДНК ретротранспозонів з ДКП в процесі відновлення дволанцюгових розривів виявлено у дріжджів (рис. 7.12). Розрив в дволанцюговій спіралі, закладений ретротранспозоном, зберігає цілісність хромосоми, але змінює її нуклеотидну послідовність. Якщо ділянка хромосоми, де був розрив, не містить важливого гена, то клітина залишається життєздатною.

Рухливі елементи не варто розглядати тільки як «егоїстичну» ДНК, що паразитує на ДНК клітини-хазяїна. Вони пристосовані і для потреб генома клітини: сприяють збереженню структурної цілісності хромосомною ДНК; впроваджуючись в гени, інактивують, викликаючи мутації і мінюють характер їх експресії. У зв'язку з цим рухливі генетичні елементи, будучи важливими чинниками мінливості генів та перебудови структури хромосом, мають величезне значення в процесах еволюції геномів.

Розсіяні і тандемні повтори.

Вивчення організації геномів дозволили зробити важливий висновок, що споріднені послідовності ДНК часто утворюють тандемні повтори: у разі генів рРНК або гістонових генів, тандемно повторюються групи однакових генів; в інших випадках у тандемі організуються споріднені гени, н., члени мультигенних родин глобінових, овальбулінових генів і генів гормону росту людини. Проте тандемні повтори характерні не тільки для цілих генів, вони наявні також в їх кодуєчих і некодуєчих ділянках.

Наприклад, у зародків ссавців серед білків сироватки крові переважає α -фетопротейн, а після народження основним білком стає сироватковий альбумін. Обидва білки кодуються унікальними генами і синтезуються в печінці. У мишей ці два гени зчеплені з утворенням тандема довжиною 15 тис. н.п.; який локалізований в хромосомі 5, причому альбуміновий ген знаходиться перед геном α -фетопротейну. Ці гени значно дивергували і не гібридизуються, за своєю структурою вони схожі і утворилися у результаті тандемних реітерацій і подальшої дивергенції (н., положення 14 вставних послідовностей і довжини 15 екзонів в обох генах дуже близькі). У людини два згадані гени, зчеплені з третім геном родини, і локалізовані в довгому плечі хромосоми 4. Встановлено, що ген α -фетопротейну містить три тандемні копії сегмента ДНК. В ході еволюції ці копії дивергували, але доведено, що утворилися з однієї предкової послідовності.



У людини ген рецептора ЛПНЩ (ліпопротеїну низької щільності), має 18 екзонів, відповідальних за утворення кількох білкових доменів. Екзони 2-6 кодують ЛПНЩ-зв'язувальний домен і містять сім тандемних повторів. Ці повтори розрізняються, але, поза сумнівом, мають спільне походження. Захворювання родинної гіперхолестеролемії пов'язане з порушенням функціонування рецептора ЛПНЩ.

Рис. 7.13. Результати блотгібридизації зонду (AGAGGTGGGGAGGTGG)₂₉ з ДНК, обробленою рестриктазою HinfI.

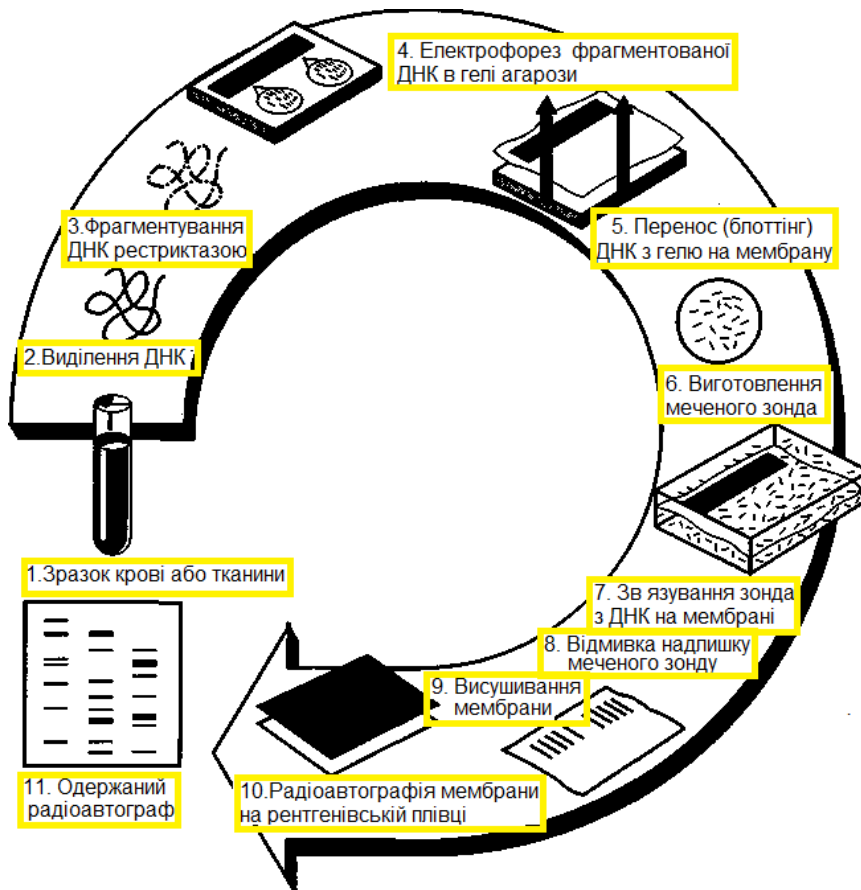
Чотири зразки ДНК отримано від членів однієї сім'ї: батька (□), матері (○) і їх дітей (□-□) - однойцевих близнюків. Доріжки 12 і 13 - неспоріднені індивідууми чоловічої статі. Стрілками відмічені "батьківські" смуги сателітів на електрофореграмах ДНК близнюків (Jeffreys A. та ін., 1985).

Гени колагенових поліпептидів у людини, курки, миші, гомологічні. Дослідження колагенової мРНК курки показали, що колагеновий ген має не менше 52 екзонів, довжина яких кратна дев'яти і становить 54 н.п. або 108 н.п., тобто кожен ген складається з ампліфікованих одиниць завдовжки 9 н.п., чим і пояснюється повторення в поліпептидному ланцюгу трипептиду.

Міні- і мікросателіти.

Мінісателіти характеризуються розміром мономерної ланки, яка повторюється, в інтервалі 6 -100 н. п. і довжиною кластера 0,2 - 20 тис. н.п. Більшість з них відноситься до GC - типу, але відомі AT-збагачені варіанти. Зміст різних класів і типів мінісателітів широко варіює, від декількох сотень до декількох тисяч копій на геном. Для деяких з них показана прителомерна кластеризація на деяких хромосомах, а інші рівномірно розподілені по геному.

Характерні розміри мономерної ланки мікросателітів складають 2-6 н. п. (СТ, САС, ТСС, GACA та ін.), кластери - 20-60 н. п. (до 1 000 н.п. при деяких спадкових захворюваннях, коли відбувається експансія триплетних повторів). Деякі мікросателіти налічують 104-105 копій, які розподіляються по всьому геному рівномірно.



А.Джеффрис і співавтр. (1985) використовуючи мінісателітні проби як зонди для детектування безлічі гомологічних локусів в ДНК людини, виявила специфічні для кожного індивідуума картини блот-гібридизації, що дістали назву ДНК-фінгерпринтів. Послідовність процедур ДНК-фінгерпринтинга, представлена на рис. 7.14.

Рис. 7.14. Схематичне зображення методу ДНК-фінгерпринтинга.

Метод включає: гідроліз ДНК-рестриктазою; розподіл фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу в агарозному гелі; перенесення фрагментів ДНК з гелю на мембранний

фільтр (блоттінг) із збереженням картини фракціонування рестриктів ДНК; гібридизацію фільтру з міченим зондом, що виявляє лише ті рестрикційні фрагменти, які гомологічні ДНК-зонду.

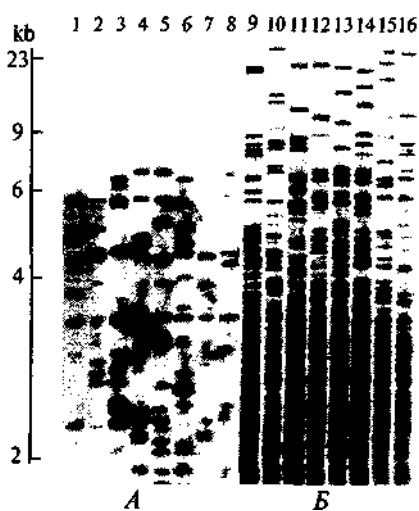
На гібридизаційній картині (рис.7.13) одночасно було виявлено безліч локусів, які містять гіперваріабельні мінісателіти. Поліморфізм цих картин був високий. Вірогідність їх збігу для двох неспоріднених індивідуумів при використанні одного зонду виявлялася рівною 10^{-11} . Ці гібридизуючі послідовності були специфічні для цього індивідуума більшою мірою, чим капілярні візерунки (10^{-6}), чому цей метод називають дактилоскопією генома, тобто з його допомогою можна здійснити ідентифікацію особи на рівні генома. Якщо розподіл гібридизаційних смуг у різних індивідуумів різний, то для ДНК з різних тканин одного індивідуума він залишається постійним. Це вказує на те, що картини гібридизації мають соматичну стабільність.

Соматичні відмінності спостерігаються лише при використанні різних рестриктаз. Розподіл смуг наслідується за ядерним типом (по Г.Менделю), тобто приблизно половина гібридизуючих фрагментів у нащадків - від матері, а інша половина - від батька. Кількості

ДНК, що міститься в декількох краплях крові, цілком вистачає для проведення блот-гібридації і визначення кровної спорідненості (найчастіше - батьківства).

У 1987 р. Дж-Вассарт та А.П.Рисков з співавторами. виявили, що мінісателіти фага М13 (15-фрагментна ланка - GAGGGTGGXGGXTCT (X – будь-який нуклеотид) утворює в геномі фага два кластери, повторюючись в одній ділянці 10, а в іншій 4 рази, і знаходиться в гені білка III) широко представлені у різних організмів, включаючи людину, безхребетних тварин, рослин, нижчих еукаріот і бактерій. Використання цієї проби для блот-гібридаційного аналізу ДНК неспоріднених індивідуумів виявило надзвичайно високий рівень поліморфізму (рис. 7.15). Той факт, що гомологічні мінісателіти виявляються в таких різних організмах (людина і фag М13), припускає широке розповсюдження цих послідовностей в живій природі і можливість використання ДНК-фінгерпринтинга із зондом ДНК фага М13 для дослідження індивідуальності, генетичної різноманітності і спорідненості будь-яких живих істот.

Виявилось, що деякі гіперваріабельні міні- і мікросателітні алелі мають мінливість у 100-1000 разів більшу, ніж звичайні локуси генома, внаслідок як мутаційних, так і рекомбінаційних процесів. У зв'язку з цим ДНК-фінгерпринтинг саме з міні- і мікросателітами як зонд став інформативним методом для фундаментальних досліджень в популяційній біології в плані вивчення біорізноманітності на генетико-популяційному рівні. ДНК-фінгерпринтинг дозволяє оцінити внутрішньо- і міжпопуляційну генетичну мінливість в аутбредних, імбредних і партеногенетичних популяціях.



Використання маркерів мінісателітів ефективно при вивченні диференціації ізольованих популяцій, а також для реконструкції їх філогенетичних зв'язків, що прекрасно було продемонстроване на популяції острівних лисиць (*Urocyon littoralis*) і горбатого кита (*Megaptera novaeangliae*).

Рис. 7.15 Гіперваріабельні ділянки ДНК людини, що виявляються за допомогою ДНК фага М13 (Просняк М.І. та ін., 1990): А - ДНК фага М13, мічена ³²P; Б - ДНК фага М13, без ізотопної варіант. Використана ДНК восьми індивідуумів.

ДНК-фінгерпринтинг виявився дуже інформативним методом в популяційній біології для вирішення численних завдань в програмах, пов'язаних з оцінкою, раціональним використанням і консервацією генетичних ресурсів, особливо для розробки науковообґрунтованих рекомендацій по збереженню і підтримці рідкісних і зникаючих видів.

Вибір популяційних зразків для консервації (при створенні заповідника або криогенних банків клітин і ДНК) визначається унікальністю їх генотипу. При зниженні популяційної чисельності значний вплив на генетичну структуру чинять дрейф і інбридинг. Усі ці параметри визначаються поліморфними маркерами і в першу чергу гіперваріабельними міні- і мікросателітами. Тут слід зазначити роботи по дослідженню зникаючої популяції вовка (*Canis lupus*) в міжнародному біосферному заповіднику на о. Айл-Ройал (Великі озера, Північна Америка); по відновленню зникаючого у Пуерто-Ріко папуги (*Amazona vittata*); сибірського журавля (*Grus leucogeranus*) або стерха; асконійської популяції коня Пржевальського (*Equus przewalskii*) та ін.

Метод є важливим для медицини в плані ДНК-діагностики. Виявлений взаємозв'язок між динамічними мутаціями і патогенезом ряду неврологічних спадкових захворювань (хорея Гентінгтона, синдром ламкої Х-хромосоми та ін.). Генетична паспортизація населення методом ДНК-фінгерпринтинга широко проводиться в розвинених країнах. Генетичний паспорт мають усі військовослужбовці США і усе чоловіче населення Англії.

Пошук і виявлення функції повторів – необхідний етап при аналізі геномів. Серед них

виявлені:

1. Сегментарні дуплікації (займають 3,3% генома людини). Включають перенесення 1-200 тис.н.п. блоків послідовностей геномів в прицентромерні і менше в субтеломерні ділянки хромосом. Ступінь гомології таких дуплікацій вище 90%. Деякі з них пов'язані з геномними хворобами.

2. Дуплікації генів і генні родини.

3. Множинні копії мобільних елементів.

4. Короткі повтори (один - декілька десятків нуклеотидів): мікросателіти і мінісателіти, які не кодують РНК або білки.

5. За взаємною орієнтацією в структурі ДНК розрізняють прямі, інвертовані, симетричні повтори, паліндроми, комплементарні паліндроми тощо.

6. Блоки тандемних повторюваних послідовностей, такі, як послідовності в центромерах, теломерах, коротких плечах акроцентричних хромосом, кластери рибосомальних генів.

У людини повтори займають принаймні не менше 50% генома, а більшу його частину складають мобільні елементи чотирьох типів:

1. LINE (*long interspersed elements*) ДНК повтор (6 тис.н.п., 850000 копій, родин - 21% генома). LINE-послідовності містять у собі гени зворотних транскриптаз, що є ознакою ретротранспозонів, але для них не характерні довгі кінцеві повтори LTR, типові для ретротранспозонів. Довгі повтори спочатку описані як послідовності ДНК завдовжки більше 5 kb і представлені більш ніж 104 копіями на геном (Singer, 1982). У геномі людини виявлено тільки одну родину повторів LINE-L1 (Hutchison et al, 1989). Консенсусна послідовність цих повторів має довжину близько 6 kb (poly-A «хвіст») на одному кінці і фланкована короткими прямими повторами менше 20 н.п., на другому – повтор довший. Велика кількість копій - $\approx 100\ 000$ на гаплоїдний геном.

2. SINE ДНК повтори (*short interspersed elements*) (довжиною 100-400 н.п., копій - 1500000, 13% генома). Добре вивченими повторами класу SINE в геномі людини і деяких приматів є так звані Alu-повтори (довжина - 300 н.п., в геномі людини $\approx 10^6$ копій, і становлять $\sim 5\%$ від сумарної кількості ДНК). Більшість SINE є ретропослідовностями, виникають за рахунок зворотної транскрипції з РНК-матриці і подальшою інтеграцією в геном.

3. LTR retrotransposons (ретровірусоподібні елементи) (довжина – 1,5-11 тис.н.п., копій - 450000, 8% генома);

4. ДНК transposons (довжина - 80-3000 н.п., число копій - 300000, 3% генома).

Ряд авторів наводять інші назви, число копій, довжину і кількість у геномі мобільних генетичних елементів. Так, Келлінен і Бетзер (2006) виділяють ще окрему групу SVA (структурні варіації), що складається з трьох елементів (SINE/VNTR/Alu). Вони вважають, що в геномі людини налічується до 3500 SVA; 11 елементів Alu; Alu-Alu рекомбінації. На їх думку, 0,27 % мутацій у людини викликані мобільними генетичними елементами.

Геноми органел еукаріот: ДНК мітохондрій і хлоропластів.

Цитоплазматична ДНК знаходиться в мітохондріях еукаріот і в хлоропластах рослин.

Як цитоплазматичні елементи, вони успадковуються за материнською лінією, а не за законами Менделя. Велика частина білків цих органел, закодована в ядерній ДНК, синтезується в цитоплазмі і потім переходить в органелу. Проте деякі білки мітохондрій і хлоропластів і усі їхні РНК кодуються в ДНК самих органел і в них синтезуються. РНК-компоненти рибосом органел, а також тРНК, які використовуються при трансляції, кодуються геномами мітохондрій і хлоропластів.

Розміри генома хлоропластів у всіх досліджених організмів схожі, тоді як мітохондріальні геноми у рослин набагато більші, ніж у тварин (таблиця 7.3).

Усі мітохондрії і хлоропласти містять по декілька копій власного ДНК генома. Ці

молекули ДНК зазвичай розподілені у вигляді окремих груп в матриксі мітохондрій і в стромі хлоропластів, де вони прикріплені до внутрішньої мембрани. Спосіб упаковки ДНК невідомий. По структурі геном більш схожий на бактеріальний : н., у них немає гістонів.

Таблиця 7.3. Геном органел.

| № за/п | Тип ДНК | Розмір (тис. н.п.) |
|--------------------------|--|--------------------|
| ДНК мітохондрій: | | |
| 1 | Найпростіші | 22-40 |
| 2 | Гриби | 17-78 |
| 3 | Вищі рослини | 150-2 500 |
| 4 | Тварини (включаючи плоских червів, комах, ссавців) | 16-20 |
| ДНК хлоропластів: | | |
| 5 | <i>Chlamidomonas</i> (зелена водорість) | 180 |
| 6 | Вищі рослини | 120-200 |

Геноми мітохондрій.

У клітинах ссавців мітохондріальна ДНК складає менше 1 % усієї клітинної ДНК. У клітинах інших організмів - в листах вищих рослин або в дуже великих яйцях амфібій - частка ДНК енергетичних органел може досягати 99 % усієї ДНК клітини.

Багато мітохондріальних геномів це замкнуті кільцеві надспіральні дуплексні ДНК. Більшість з них кодують

схожі функції.

Іноді навіть близькоспоріднені види мають абсолютно різні рестрикційні карти і лише частково співпадають їх нуклеотидні послідовності. Розташування гомологічних генів в кільцевій ДНК також розрізняється. У окремих рослин присутні мітохондріальні геноми різних розмірів, які представлені як лінійними, так і кільцевими молекулами. Мітохондрії деяких грибів і найпростіших мають лінійні геноми.

Уся мітохондріальна ДНК не метилована. У дуже великих мітохондріальних геномах пригнічуючу частку надлишкової ДНК складають некодуючі послідовності з невідомою функцією. Навпаки, мітохондріальна ДНК ссавців організована раціонально, і між генами майже немає проміжків.

До теперішнього часу ДНК мітохондрій секвеновано більш ніж у 20 видів найпростіших, дріжджів, рослин маршанції і арабідопсіса, людини. Виявилось, що схожі послідовності нуклеотидів іноді виконують різні функції. Першим повністю розшифрованим геномом органел виявився мітохондріальний геном людини (1981 р.), геном складається з 16569 пар нуклеотидів. Геном мітохондрій людини представлений однією кільцевою молекулою ДНК, її можна розділити на два ланцюга - важкий, який називається Н-ланцюгом, і легкий - L-ланцюг.

Геном мітохондрій людини кодує 13 білків, 22 транспортні РНК, дві рибосомальні РНК (рис.7.16). Більшість (60 %) генів, що кодують білки, припадають на 7 субодиниць комплексу, який окиснює НАДН, інші гени кодують 2 субодиниці АТФ-синтетази, 3 субодиниці цитохромоксидази, одна субодиниця убихинонцитохром с-редуктази (цитохром b). Гени усіх білків, окрім одного, гени 2 рибосомних і 6 тРНК знаходяться на важкому ланцюзі ДНК, гени 14 інших тРНК і одного білку - на легкому ланцюзі. Визначені також повні послідовності молекул ДНК мітохондріальних геномів корови і миші, які містять ті ж гени і організовані схожим чином. У геномі мітохондрій людини практично кожен нуклеотид входить до складу кодуючої послідовності або для білку, або рРНК або тРНК. Оскільки ці кодуючі послідовності переходять безпосередньо одна в іншу, для регуляторних послідовностей ДНК залишається дуже мало місця. Проміжки між генами, як правило, не перевищують 25 н.п. і в більшості випадків складають менше 3 н.п. і іноді перекриваються (н., ген тРНК^М, тРНК^{Глу} і гени АТФ-синтетазних субодиниць 6 і 8).

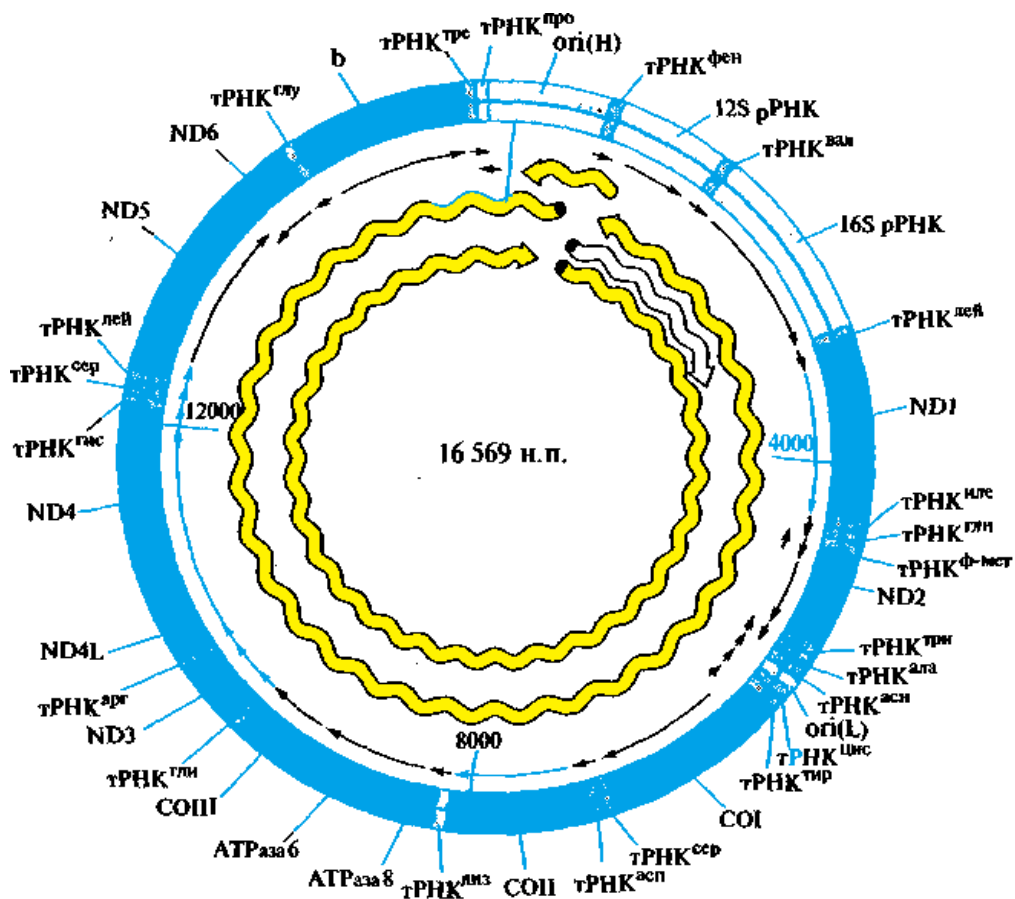


Рис. 7.16. Мітохондріальна ДНК людини (мтДНК). Позначені гени, що кодують субодиниці НАДН-дегідрогеназного комплексу (ND), субодиниці цитохром-С-оксидази (COI, COII, COIII), цитохром b (цит. b), субодиниці 6 і 8 АТФ-синтетази (АТРаза 6 і АТРаза 8), кодуючі рРНК (12SрРНК і 16SрРНК); кодуючі тРНК; ori (H) і ori (L) -сайти ініціації реплікації важкого і легкого ланцюгів ДНК. Точки усередині кола позначають сайти ініціації транскрипції. Маленькі стрілки вказують 5'→3' - напрям зчитування ланцюга в різних генах.

Мітохондріальна ДНК дріжджів і людини містить приблизно рівне число генів, але у дріжджів вона більше майже в 5 разів (~80 тис. н.п.). Основна її частина припадає на частку АТ-багатих ділянок з невідомою функцією, а також інтронів, які переривають кодуючі ділянки і відсутні в мітохондріальній ДНК ссавців. Відмінності в структурі мітохондріальної ДНК у різних штамів дріжджів визначаються в основному мінливістю некодуючих ділянок.

Кількість мітохондрій в рослинній клітині складає від 50 до 2 000, і кожна мітохондрія містить від 1 до 100 копій генома. Геном мітохондрій рослин значно більше генома мітохондрій тварин. У арабідопсіса (родина хрестоцвітних) мітохондріальний геном містить 370 тис.н.п. (в 20 разів більше генома мітохондрій людини). Розмір мітохондріального генома рослин сильно варіює навіть усередині однієї родини (в 5-10 разів). Н., у кавуна в ДНК мітохондрій знаходиться 330 тис. н.п., у гарбуза - 850 тис. н.п., а у дині - 2 400 тис. н.п.

Нині повністю секвенована послідовність мітохондріального генома маршанції, завершена робота по секвенуванню мітохондріального генома арабідопсіса. Мітохондріальний геном рослин кодує три рибосомні РНК, 16 тРНК, близько 10 рибосомальних білків, деякі білки дихального ланцюга, 3 субодиниці АТФ-синтетази, чотири білки, які беруть участь в синтезі цитохрому С. Велика варіабельність розміру молекул ДНК, їх множинність в мітохондріях вищих рослин пов'язана з рекомбіногенною природою самого генома у цих об'єктів. Велика кількість молекул ДНК утворилося в результаті рекомбінацій між послідовностями, які повторюються, і їх рекомбіногенними перебудовами. Частина послідовностей має ядерне і навіть хлоропластне походження. Рекомбінації і мутації мітохондріальної ДНК ведуть до цитоплазматичної чоловічої стерильності, викликаючи

порушення дозрівання пилкових трубок.

Реплікація мітохондріальної ДНК (мтДНК).

Реплікація мітохондріальної ДНК не пов'язана з клітинним циклом. Кожен з ланцюгів дуплексної молекули ДНК мітохондрій має свою точку початку реплікації. Реплікація ДНК у мітохондріях людини однонаправлена і асинхронна, що обумовлюється різною локалізацією точок ініціації реплікації. Спочатку ініціюється реплікація Н-ланцюга ДНК, а синтез L-ланцюга - тільки після того, як синтезується близько 67 % Н-ланцюга.

У дріжджовій мтДНК є більше сімі місць початку реплікації, розсіяних по усьому геному; кожне з них містить три коротких GC-сегмента, розділених двома довгими ділянками, які майже цілком складаються з АТ-пар. Синтез мтДНК здійснюється за участю ДНК-полімерази. Дані про інші ферменти і білкові чинники реплікації мтДНК відсутні.

Поліморфізм мітохондріальної ДНК і еволюція людини.

Унікальною властивістю мітохондріальної ДНК людини, як і інших хребетних, є успадкування її за материнською лінією (родинний аналіз).

Виникнення мутацій в одній з молекул мтДНК створює внутрішньоклітинну суміш мутантних і нормальних молекул (гетероплазмія). Послідовні ділення гетероплазменної клітини порушують співвідношення мутантних і нормальної мітохондріальної ДНК або до чисто мутантів, або до нормальних (гомоплазмія) молекул ДНК. Молекулярні основи підтримки стану гетероплазмії залишаються нез'ясованими. Швидкість еволюції мітохондріальної ДНК у 10-20 разів більша, ніж у ядерних генів. Через відсутність систем репарації та зміненого генетичного коду (заміни основ в третьому положенні кодонів не відбиваються на амінокислотних послідовностях білків) мутації фіксуються з більшою ймовірністю. Висока швидкість накопичення мутацій в мтДНК разом з відсутністю рекомбінаційних процесів є вкрай важливою властивістю, яка дозволяє використовувати мітохондріальну ДНК в еволюційних і популяційно-генетичних дослідженнях.

Варіабельність нуклеотидної послідовності мітохондріальної ДНК людини найбільша в ділянці головної некодуючої області (контрольної області), де знаходяться всі структури, які відповідають за ініціацію і регуляцію процесів транскрипції і реплікації, точка огі для важкого ланцюга, промотори транскрипції обох ланцюгів мітохондріальної ДНК, сайти зв'язування транскрипційних чинників. Варіабельність цієї ділянки обумовлена переважно нуклеотидними замінами і короткими делеціями або інсерціями. У людини, як і інших ссавців, вона складається з трьох доменів, які розрізняються мірою варіабельності і насиченості функціональними елементами. Найбільш варіабельною частиною контрольної області мтДНК є домен, розміщений між позиціями 16024-16400 н.п., який отримав назву гіперваріабельного сегменту I мітохондріальної ДНК. Через високий рівень мінливості саме цього сегменту контрольної області мітохондріальна ДНК найчастіше використовується в еволюційних дослідженнях.

До теперішнього часу дослідження поліморфізму мтДНК виконані в багатьох етнічних групах людини. Отримані дані про генетичну диференціацію сучасного людства широко використовуються для встановлення спорідненості між етносами і реконструкції расогенетичних процесів. Дослідження варіабельної мтДНК продемонстрували високий рівень мітохондріального генофонду і наявність кореляцій між типами мтДНК і етногеографічним походженням індивідуумів. Згідно з отриманими даними, максимальне різноманіття типів мітохондріальної ДНК було зафіксовано у популяціях негроїдів. За допомогою філогенетичного аналізу було встановлено, що усі типи цієї ДНК людини є гілками одного дерева, причому кореневі типи його характерні для сучасних негроїдів, що є підтвердженням гіпотези про африканське походження сучасної людини.

ДНК хлоропластів.

ДНК хлоропластів (хлДНК) є замкнутою кільцевою двоспіральною молекулою. Її

розміри варіюють у різних видів рослин переважно в інтервалі 130-160 тис. н.п. Нині повністю розшифрована нуклеотидна послідовність хлДНК деяких видів (н., тютюну і рису). При цьому виявлені загальні принципи організації ДНК хлоропластів і її консервативність (незмінність первинної структури) в процесі еволюції. ХлДНК містить близько 130 генів. У ній представлені по два гени чотирьох типів (4,5S, 5S, 16S і 23S) рибосомальних РНК (рРНК), гени усіх транспортних РНК (близько 30 видів), гени рибосомальних білків (близько 20), гени субодиниць РНК-полімерази. Хлоропластний геном кодує близько 40 білків тилакоїдної мембрани, які приймають у формуванні комплексів електронтранспортного ланцюга. Це складає близько половини білків, які входять до їх складу. Інші білки тилакоїдної мембрани кодуються в ядрі. ХлДНК містить ген великої субодиниці ключового ферменту фотосинтезу рибулозодифосфаткарбоксилази (РДФК).

За прокаріотичним типом організовані промотори, які регулюють початок транскрипції і локалізовані в області 35-10 н.п. до точки початку транскрипції, і термінатори. Але на відміну від прокаріот в хлДНК виявлені інтрони. Рибосоми хлоропластів відносяться до 70S-типу.

Для кожного виду рослин характерно певне число хлоропластів в клітині, яке варіює у різних видів. Число хлоропластів в клітині, а отже, їх ділення контролюється ядром. Так, ДНК-полімераза, що здійснює реплікацію хлДНК, кодується в ядрі, синтезується на 80S рибосомах цитоплазми і потім проникає в хлоропласт, де і забезпечує синтез ДНК. Формування ферментативного апарату темнових реакцій фотосинтезу, в ході яких відбувається засвоєння CO₂, також знаходиться під контролем двох геномів, ядра і хлоропласту. Велика субодиниця (54 кДа) ключового ферменту циклу Кальвіна-Бенсона рибулозодифосфаткарбоксилази кодується і синтезується в хлоропласті, а мала (14 кДа) кодується в ядрі і синтезується в цитоплазмі у вигляді попередника, який проникає в хлоропласт, де обидва поліпептида утворюють функціонально активний фермент рибулозодифосфаткарбоксилазу, який складається з 8 великих і 8 малих субодиниць. Таким чином, формування усіх найважливіших структур хлоропласту залежить і від ядра, і цитоплазми. Це пояснює неможливість створення культури ізольованих хлоропластів, де б вони самостійно розмножувалися.

Походження ДНК органел. Поширена думка, що мітохондрії і хлоропласти пішли від прокаріотичних ендосимбіонтів, які мешкали в цитоплазмі попередників еукаріот. Мітохондріям дали початок пурпурові бактерії, а хлоропластам - ціанобактерії або близькі до них організми. Симбіонти проникли в еукаріотичні клітини і в ході еволюції втратили свою автономність, передавши велику кількість найважливіших генів в ядерний геном. В результаті незалежна бактеріальна клітина перетворилася на напівавтономну органелу, яка зберегла головну початкову функцію – здатність до фотосинтезу (у хлоропластів) і систему окислювального фосфорилування (у мітохондрій). Хоча багато генів цих древніх бактерій все ще використовуються для синтезу білків органели, велика їх частина по незрозумілим причинам вклjučилася в ядерний геном, де вони кодують ферменти, які схожі з бактеріальними і синтезуються на рибосомах в цитоплазмі, а потім надходять в органелу.

Існують експериментальні дані що послідовності ДНК "подорожують" між органелами і ядром, а також між геномами самих органел. Підтвердженням першого є той факт, що дві субодиниці рибулозодифосфаткарбоксилази у *Suaanophora paradoxa* кодуються неядерним геномом, який входить до складу цианели (хлоропластоподібної структури ціанобактерій). Механізми переміщення і інтеграції ДНК органел в нові геноми доки не встановлені

Таким чином, інтенсивні дослідження у геноміці і особливо геноміці людини забезпечили новий етап у розвитку медицини і її перехід на субклітинний та молекулярно-генетичний рівень. Геноміка людини є основою молекулярної медицини. Різке збільшення інформації про організацію генома дало можливість по новому розглядати процеси розвитку людини і виникнення її спадкових та неспадкових хвороб.

Молекулярні основи спадкових захворювань

Молекулярні механізми генних, хромосомних і геномних мутацій. Мутаційна мінливість у людини. Генеративні і соматичні мутації. Молекулярні механізми генних мутацій. Класифікація генних мутацій. Поняття про моногенні спадкові хвороби. Молекулярні і цитологічні механізми хромосомних мутацій. Сучасні методи вивчення каріотипу людини: диференційне забарвлення, FISH-метод і ін. Класифікація мутацій за причинами виникнення. Мутагенні чинники, методи визначення мутагенної активності речовин. Антимутагенез.

Мутаційна мінливість у людини. Невід'ємна властивість живого – мінливість. Мінливість – властивість організмів існувати в різних варіантах ознак і властивостей або властивість організмів набувати в процесі індивідуального розвитку нових властивостей і ознак.

В біології виділяють: кореляційну, визначену, невизначену, онтогенетичну мінливість (Ч.Дарвін). З генетичної точки зору: фенотипова і генотипова мінливості реалізуються на молекулярному, клітинному і організмовому рівнях, в процесі індивідуального розвитку організму. *Фенотипова М.* – зміна(и) фенотипу під дією зовнішніх факторів, умов існування виду, які не викликані порушеннями генотипу. *Генотипова М.* – зміна(и) фенотипу внаслідок перекомбінування або мутації спадкового матеріалу на різних рівнях його організації (каріотипу, хромосом, генотипу). *Комбінативна М.* – форма спадкової мінливості, яка виникає внаслідок гібридизації при статевому розмноженні організмів з формуванням нових комбінацій генотипів. *К.* мінливість визначається: а) кросинговером, який виникає в профазі 1-го ділення мейозу; б) незалежним розходженням хромосом та хроматид в анафазах першого та другого ділення мейозу; в) випадковим сполученням гамет при заплідненні. *Мутаційна М.* – форма спадкової мінливості, яка визначається порушеннями спадкового матеріалу на різних рівнях його організації. Виділяють мутаційну мінливість геномну, хромосомну та генну.

В сукупності спадковість і мінливість забезпечили збереження життя на Землі і існування видів.

Результатом тривалої еволюції є спадкове різноманіття людини, враховуючи особливості еволюції людини як істоти біологічної і соціальної. У людини як соціальної істоти природний добір з часом протікав в більш специфічних формах, що, безумовно, розширювало спадкову різноманітність популяцій. Наприклад, повноцінне забезпечення себе їжею і можливість задовільняти потребу у вітаміні С дозволили людині в процесі еволюції «загубити» ген L-гулонолактонооксидази, який каталізує у тварин синтез аскорбінової кислоти.

В процесі еволюції людина набувала і патологічних ознак, як результат мутацій багатьох генів. Наприклад, у тварин відсутні компоненти мембрани клітин, які забезпечують сприйняття деяких патогенних чинників (чутливість до дифтерійного токсину і ін.). У людини мембранні компоненти, які детермінують токсини вже ідентифіковані і встановлена локалізація цих генів (ген чутливості до дифтерійного токсину локалізований в 5-й, а ген чутливості до вірусу поліомієліту – в 19-й хромосомі).

Поліморфізм людських популяцій збільшують мутації (гени групи крові, імуноглобулінів, морфологічних ознак, що визначають колір волосся, ріст, розріз очей та ін.), часто мутації порушують життєво важливі процеси і функції, і фенотипово проявляються – спадкові хвороби.

Спадкова патологія – результат спадкової мінливості, яка виникла і накопичилася за період існування *Homo sapiens*.

Людина, як біологічний вид, як і будь-який інший вид, зберігає в популяціях мутантні гени, які проявляються спадковими хворобами. Одна з головних концепцій вивчення медичної генетики – еволюційно накопичені патологічні мутації в людських популяціях.

Виходячи із закону гомологічних рядів спадкових форм М.І.Вавілова такі патологічні мутації виявляються і у тварин (ахондроплазії, гемофілії, м'язова дистрофія і ін.), що дозволяє їх моделювати в експериментах на тваринах. Розвиток молекулярно-генетичних методів діагностики спадкової патології дозволив встановити існування спадкових хвороб у людей, які жили тисячоліття тому.

Основним джерелом різноманіття спадкових ознак і їх безперервної еволюції служить мутаційна мінливість. ДНК здатна до конваріантної реплікації, тобто появи змін, які можуть репаруватися. Але можливий «збій» в системі репарації, може призвести до закріплення змін ДНК в геномі. Імовірність порушення точності реплікації молекули ДНК невелика: складає 10^{-7} - 10^{-9} точкових мутацій на кількість приєднаних нуклеотидів. Проте, враховуючи виключно велике число нуклеотидів в геномі ($3,2 \times 10^9$ на гаплоїдний набір), можна зробити висновок, що в геномі клітини за одне покоління можлива поява декількох мутацій в структурних генах. Кожна людина, можливо, успадковує 2-3 нові мутації, що може привести до патології або збільшити поліморфізм людських популяцій.

Зміна нуклеотидної послідовності молекули ДНК може відобразитися на первинній структурі білка або регуляції його синтезу. Так, деякі мутації гемоглобіну не змінюють його функцій – вони нейтральні і не піддаються добору. Інші мутації призводять до функціональних відхилень в молекулі білка. Ці відхилення в певних умовах життя організму можуть бути корисними, тобто мати адаптивне значення, тому зберігаються (н., стійкість до малярії). Мабуть, таким шляхом виникали і зберігалися в популяціях різноманітні варіанти структурних, транспортних і ферментних білків організму. Людському організму властивий широкий білковий поліморфізм, завдяки якому кожен індивід біохімічно неповторний, обумовлений мутаційною мінливістю і селективним добром адаптивних білкових варіантів.

Проте, якщо зміни істотно порушують виконання білком його функції, мутація стає патологічною і надалі або виключається з популяції разом з нежиттєздатною клітиною (організмом), або зберігається, обумовлюючи спадкову хворобу. В окремих випадках гетерозиготні носії патологічної мутації піддаються позитивному добору. Прикладом цього служить ген серповидно-клітинної анемії, який поширився в популяціях, які проживають в ендемічних по малярії регіонах, внаслідок формування імунітету у гетерозиготних носіїв гена S до малярії.

Ознаки організму по-різному стійкі до мутацій. Гістонові білки, які входять до складу хромосом, або скоротливі білки актин і тубулін, або ферментні білки реплікації і транскрипції, вельми консервативні і однакові не лише у різних представників людства, але і у біологічних видів значно віддалених філогенетично. Більшість білків організму, особливо ферментних, існують в декількох ізоформах і схильні до таких мутаційних змін, які приводять до патології.

Мутації відрізняються по здатності зберігатися і розповсюджуватися в популяціях. Одні з них, які дозволяють носію зберігати плодючість і не викликають серйозних несприятливих порушень у фенотипі, можуть передаватися з покоління в покоління тривалий час. Такі ознаки сегрегують (розподіляються) в поколіннях за законами Менделя, і обумовлений ними генетичний тягар в популяціях може довго зберігатися.

Деякі комбінації умовно патологічних рецесивних алелей можуть давати селективну перевагу індивідам (виживаємість, плодючість). Частота таких алелей в популяції підвищується до певного рівня у ряді поколінь, доки не настане рівновага між інтенсивністю мутаційного процесу і добору.

Частота різних мутантів алелей цього роду може бути неоднаковою в різних популяціях, що визначається закономірностями популяцій (ефект родоначальника, частота кровноспоріднених шлюбів, міграція і екологічні умови).

Якщо знову виникла мутація, яка має домінуючий патологічний прояв і веде до летального генетичного результату (індивід не залишає потомства), то вона не передається

наступному поколінню (важкі спадкові хвороби з домінантним типом успадкування, значна частина хромосомних хвороб).

Ефекти генетичного тягара у людини виражені:

- збалансованим поліморфізмом;
- летальністю;
- зниженою фертильністю.

На основі постійних протікаючих процесів зміни спадковості (мутацій) і добору генотипів при тривалій еволюції людини в популяціях сформувався збалансований поліморфізм (частоти алелей гена > 1%).

Прикладами збалансованого поліморфізму є: групи крові систем АВО, резус, MNS; гени муковісцидозу, фенілкетонурії, первинного гемохроматозу. Генетичне різноманіття людини засноване на збалансованому поліморфізмі, що формувалася протягом багатьох сотень і тисяч років. Таке різноманіття – основа розвитку людини як біологічного виду. Імовірність виникнення і фіксації в популяціях мутації з позитивним ефектом в еволюції людини існує і в даний час, але як правило, нові мутації завжди дають негативний ефект.

До ефектів мутаційного тягара відноситься летальність. Вона проявляється елімінацією гамет, зигот, ембріонів, плодів, смертю дітей. Приблизно 60% зигот гине до імплантації, спонтанні аборти – 15%.

З 1000 народжених дітей не менше 5 помирають у віці до року внаслідок спадкової патології, несумісної з життям.

Для більшості спадкових хвороб характерна знижена фертильність, обумовлена порушенням репродуктивної функції. Це веде до зменшення відтворення потомства в сім'ях із спадковою патологією.

Генеративні і соматичні мутації. Залежно від «місця» мутації розрізняють: генеративні і соматичні мутації. Генеративні – це мутації, які виникають в генетичному апараті генеративних клітин і передаються нащадкам при статевому розмноженні (наприклад, зміни каріотипу гаметоцитів при порушенні мейозу). Ці мутації безпосередньо не позначаються на здоров'ї даної людини, але призводять до народження потомства із спадковими хворобами. Причинами мутацій в генеративних клітинах є мутагенні чинники, а також різного роду порушення мейозу і кросинговеру при гаметогенезі. Залежно від змін генотипу статевих клітин, а потім зиготи, мутації можуть бути генними, хромосомними і геномними.

Геномні мутації. Якщо в каріотипі відбувається зміна числа хромосом, то говорять про геномні мутації. До них відносяться поліплоїдія і гетероплоїдія (анеуплоїдія).

Поліплоїдія – збільшення числа хромосом в 2,3,4 і більше разів в результаті додавання повних хромосомних наборів із-за порушення поділу. У поліплоїдних організмів відбувається збільшення числа хромосом, кратне гаплоїдному набору: 3п – триплоїд, 4п – тетраплоїд, 5п – пентаплоїд, і т.д. У рослин поліплоїди життєздатні і деякі володіють підвищеною врожайністю (крупніше листя, стебла, коренеплоди, плоди, квітки).

Поліплоїдія у людини є летальною мутацією. Наприклад, триплоїдія у людини (69 хромосом) є досить частою спонтанною мутацією набору хромосом в ембріогенезі. Але більшість таких зародків гинуть на першому місяці розвитку. До 6-7 місяця розвитку доживає 1%, що зазвичай закінчується спонтанними абортами. Іноді такі діти (синдром триплоїдії-69, ХХУ) народжуються, але живуть тільки 5-7 днів (мутація напівлетальна). Такі діти мають множинні вади розвитку головного мозку, серця, шлунково-кишкового тракту та ін. Причинами поліплоїдії є наслідки дії мутагенних чинників, внаслідок чого в клітинах може спостерігатися ендомітоз – подвоєння хромосом, але без подальшого поділу клітини. В результаті цього відбувається кратне збільшення хромосомних наборів клітин.

Гетероплоїдія (анеуплоїдія). Внаслідок порушень складних молекулярних процесів мейозу число хромосом в гаметах може змінюватися. Якщо такі гамети приймають участь у

заплідненні, то утворюються аномальні зиготи. Якщо яка-небудь з хромосом в каріотипі організму опиняється в потрібному наборі, то це називається трисомією ($2n+1$), а такий організм називається трисоміком. Трисомії відомі у багатьох видів рослин і тварин, а також у людини. Описані трисомії за 8,9,13,14,18,21 парами хромосом, X і Y. Життєздатними є лише трисомії по 21, X та Y-хромосомам, всі інші призводять до загибелі в перші дні після народження. Полісомія по X-хромосомі може доходити до п'яти із збереженням життєздатності. Приклади трисомії по аутосомам людини: по 21-й хромосомі – синдром Дауна ($47, +21$); по 18-й хромосомі – синдром Едвардса ($47, +18$); по 13-й хромосомі – синдром Патау ($47,+13$). Приклад анеуплоїдії по статевим хромосомам: синдром Клайнфельтера ($47, XXY$) (може зустрічатися $XXXY$, $XXYY$ і інші зміни числа хромосом). При цьому люди найчастіше або нежиттєздатні, або відрізняються зниженою життєздатністю і рядом патологічних ознак.

Якщо в результаті порушення ділення одна з хромосом втрачається ($2n-1$), то це явище називається моносомією, а організм моносомним. Анеуплоїдія виникає в результаті нерозходження гомологічних хромосом при мейозі. Якщо відсутні дві різні хромосоми, то організм є подвійним моносоміком ($2n-2$). Моносоміки зазвичай нежиттєздатні. Вважається, що близько 20% моносомій закінчується летально, ще в перші дні ембріонального розвитку, останні гинуть на пізніших стадіях. Єдиним прикладом життєздатної моносомії у людини є синдром Шерешевського-Тернера ($45, X0$).

Мутації геномів завжди проявляються фенотипово і підтверджуються цитогенетичними методами. Таким чином, анеуплоїдії, тобто порушення нормального числа хромосом, призводять до смерті, різноманітних патологій або до зниження життєздатності організму.

Соматичні мутації. Це мутації, які відбуваються в генетичному апараті соматичних клітин (наприклад, рак шкіри під дією ультрафіолетових променів). Вони не передаються нащадкам, але можуть передаватися дочірнім клітинам і істотно впливати на розвиток ознак організму, викликають генетичні хвороби соматичних клітин. Генетичні хвороби соматичних клітин виділені в окрему групу спадкової патології нещодавно. Приводом для цього стало виявлення при злоякісних новоутвореннях специфічних хромосомних перебудов в клітинах, які викликають активацію онкогенів (ретинобластома, пухлина Вільмса). Ці зміни в генетичному матеріалі клітин є етіопатогенетичними для злоякісного росту і тому можуть бути віднесені до категорії генетичної патології. Вже є перші докази того, що спорадичні випадки вроджених вад розвитку є результатом мутацій в соматичних клітинах в критичному періоді ембріогенезу. Отже, такі випадки можна розглядати як генетичні хвороби соматичних клітин. Аутоімунні процеси і старіння можуть бути віднесені до цієї ж категорії генетичної патології.

Молекулярні механізми генних мутацій. Генетичний матеріал – ДНК може змінюватися, мутувати під дією зовнішніх і внутрішніх чинників.

Результати мутацій залежать від клітин, де вони відбуваються. У соматичних клітинах (вони можуть відбуватися безперервно з самої першої хвилини існування нового організму – зиготи – до останньої хвилини життя), і як наслідок – з'являються численні хвороби, включаючи ракові пухлини, старіння і смерть. Якщо ж вони відбуваються в статевих клітинах, то виникають мутації, які можуть в процесі еволюції закріплюватися і розповсюджуватися в популяції, що призведе до поліморфізму. Коли мутації не відсіюються внаслідок випадкових причин або через їх шкідливу дію, то вони будуть впливати на життєздатність індивідуума і його потомства.

Різноманітність генів залежить від швидкості мутацій, розміру і демографічної історії популяції, в якій відбуваються мутації, часу, протягом якого відбувається накопичення цих відмінностей і селекції. Ступінь різноманітності, яка може підтримуватися в популяції,

прямопропорційна її розміру. Порівняно невелика варіабельність в популяції людини (варіабельність генома шимпанзе значно вище, ніж у людини) є результатом її молодого віку і походження від порівняно невеликої початкової популяції.

Шкідливі мутації постійно виникають, але швидко відсіюються з популяції. Існує баланс між виникаючими мутаціями і їх відсіюванням селекцією. В результаті шкідливі мутації, які викликають хворобу, володіють двома властивостями: вони зустрічаються рідко, і кожна конкретна мутація, що існує в популяції, виникла нещодавно.

У молекулах ДНК можуть відбуватися зміни послідовності нуклеотидів. Такі зміни, якщо вони зачіпають функціонально активні гени, можуть призводити до порушень метаболізму або функцій (ознак). Якщо ці зміни не призводять до загибелі організму або клітини – вони можуть передаватися у спадок. Отже, генні мутації – це стабільні зміни структури генів, реплікації, які повторюються в подальших циклах, і виявляються у потомства у вигляді нових варіантів ознак. Всі різновиди мутацій пов'язані із зміною нуклеотидної послідовності генів.

Класифікація генних мутацій. За особливостями структурних змін можна відзначити декілька груп різноманітних мутацій:

- заміна одних азотистих основ іншими (транспозиція) (Рис.8.1);
- зміна кількості нуклеотидних пар в структурі гена (дуплікація, інсерція, делеція);
- зміна порядку послідовності нуклеотидів у складі гена (інверсії);
- розрив ланцюгів;
- утворення зшивань.

Заміна азотистих основ. Причинами цього роду мутацій є:

- а) помилки реплікації;
- б) вплив певних хімічних агентів.

Під впливом хімічних агентів може відбуватися порушення структури азотистої основи вже приєднаного нуклеотида. Наприклад, під впливом азотистої кислоти може відбуватися мимовільне дезамінування цитозина. В результаті цього цитозин перетворюється на урацил. Надалі в циклі реплікації урацил з'єднується з аденіном, який в наступному циклі приєднує тиміновий нуклеотид.

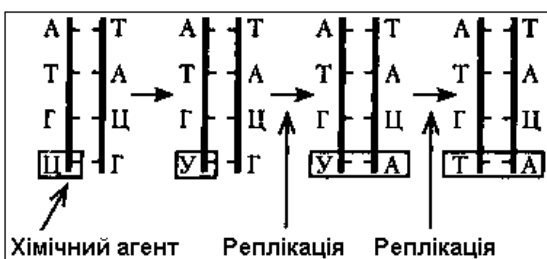


Рис.8.1. Схема виникнення мутації (транспозиції) по механізму заміни однієї азотистої основи іншою.

Ще однією причиною може бути помилкове включення в ланцюг ДНК нуклеотида, який утворюється, із зміненою основою. Якщо це залишається непоміченим ферментами репарації, змінена снова включається в процес реплікації, що

може привести до заміни основної пари на іншу.

Мутації в результаті заміни азотистих основ виникають спочатку в одному з ланцюгів ДНК. Якщо вони не виправляються в ході репарації, то при подальших реплікаціях закріплюються в обох ланцюгах молекули. Наслідком цього є утворення нового триплету в генетичному коді ДНК.

Це може відобразитися на первинній структурі кодованого білка, його просторовій організації і функції. Зміни первинної структури пептиду не відбудеться в тому випадку, якщо новий триплет є «синонімом» колишнього, тобто кодуватиме ту ж амінокислоту. Наприклад, амінокислота лейцин кодується шістьма триплетами: УУА, УУГ, ЦУУ, ЦУЦ, ЦУА, ЦУГ. Заміна одного з нуклеотидів в цих триплетях не змінить його «змісту». Цей приклад демонструє біологічне значення надмірності генетичного коду. Проте в більшості випадків заміна однієї амінокислоти на іншу призводить до серйозних наслідків. Наприклад, заміна глутамінової кислоти валіном в молекулі гемоглобіну призводить до зміни його структури і функцій. В

результаті цього у людини розвивається хвороба – серповидно-клітинна анемія. У ряді випадків заміна азотистих основ може призводити до появи нонсенс-кодону. Наслідком цього буде дострокове переривання процесу синтезу. Вважається, що заміна азотистих основ призведе в 25% випадків до утворення триплетів-синонімів, в 5% випадків – до утворення нонсенс-кодонів, і в 70% – до виникнення генних мутацій.

Зміна кількості нуклеотидів в гені. Ця мутація – результат випадіння (делеції) або вставки (інсерції) однієї або декількох пар нуклеотидів в молекулу ДНК. Такий тип мутацій зустрічається досить часто. Вказана зміна відбувається внаслідок дії на ДНК деяких хімічних агентів, а також радіоактивного опромінювання. Результатом цієї мутації є порушення рамки

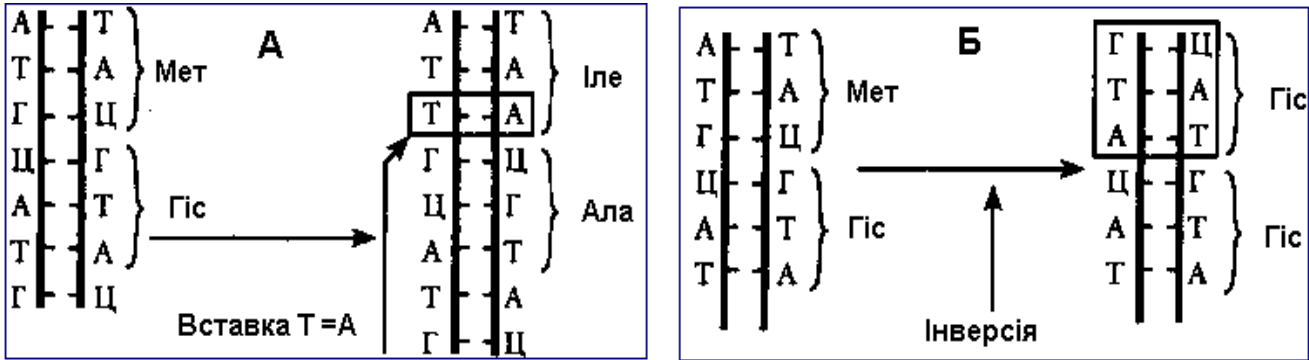


Рис.8.2. Схема виникнення мутації по типу вставки (А) та інверсії (Б).

зчитування інформації з генетичного коду. Наслідком цього є синтез поліпептидів із зміненою амінокислотною послідовністю, порушення структури і функцій білків, порушення фенотипу. Проте якщо кількість відновлених або втрачених нуклеотидів кратно трьом, то порушення рамки не відбувається. В цьому випадку в білку може з'явитися зайва або випасти

одна амінокислота. Однією з причин мутацій, що призводять до зміни кількості нуклеотидів, є вставки або делеції в результаті активності рухомих генетичних елементів.

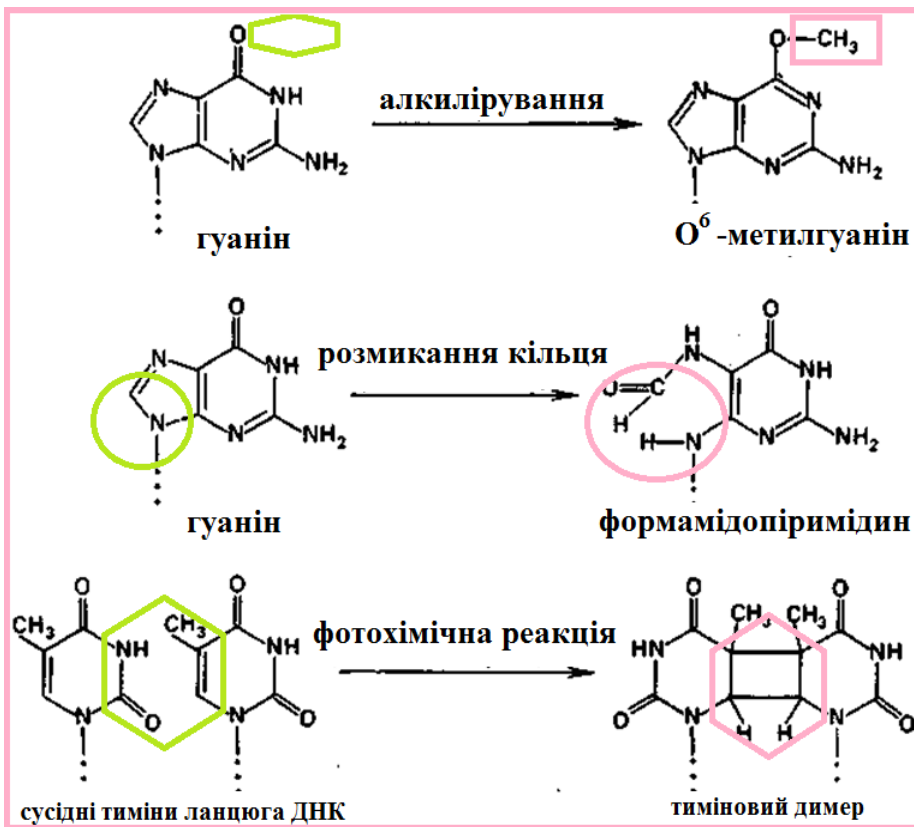


Рис 8.3. Найчастіші порушення нуклеотидів ДНК (алкилування, розмикання кільця, утворення тимінових димерів).

Це певні нуклеотидні послідовності, вбудовані в геноми багатьох організмів. Ці структури ДНК здатні мимоволі змінювати своє положення в результаті помилок при рекомбінації.

Зміна нуклеотидної послідовності гена (інверсія). Цей тип мутації пов'язаний з поворотом певної ділянки ДНК на 180°. Такі порушення відбуваються внаслідок дії хімічних

агентів і ряду фізичних чинників на молекулярно-генетичні процеси реплікації і рекомбінації. Наслідком цього є порушення нуклеотидної послідовності гена. Це призводить до зміни первинної структури поліпептиду, порушення структури і функції білка, порушення фенотипу. Розриви одного з ланцюгів можуть відбуватися під дією іонізуючої радіації, в результаті пошкодження хімічних зв'язків між нуклеотидами. Дефекти можуть відновлюватися ферментом лігазою.

Моногенні спадкові хвороби. Більшість форм спадкових захворювань обумовлена генними мутаціями, тобто молекулярними змінами на рівні ДНК (муковісцидоз, гемофілія, фенілкетонурія, нейрофіброматоз, міопатія Дюшена і т.д.). Це генні хвороби.

Мутації транскрибованих ділянок (визначають амінокислотну послідовність в молекулі білка, який синтезується) призводять до синтезу аномального продукту, тоді як мутації нетранскрибованих ділянок можуть призводити до зниження швидкості синтезу незамінного білка різного ступеню вираженості. Фенотипово генні мутації можуть виявлятися на молекулярному, клітинному, тканинному і органному рівнях.

Множинність метаболічних шляхів, функцій білків в організмі, обмеженість уявлень про нормальний метаболізм ускладнюють розробку обґрунтованої етіологічної класифікації генних хвороб. Число генних хвороб можна визначити відносно орієнтовно (3500-4500), оскільки немає чітких критеріїв нозологічних форм ні з клінічної, ні з генетичної точки зору. Наприклад, з клінічної точки зору міопатія Дюшена (тяжка) і Беккера (легка) є різними формами, а з генетичної точки зору це результат мутації в одному локусі. Встановлено, що міопатія Дюшена розвивається при повній блокаді, а Беккера – при частковій блокаді синтезу РНК для дистрофіна (при міопатії Беккера делеції гена за розміром менше).

Багато генних мутацій зумовлюють виникнення таких молекулярних форм білків, патологічна дія яких виявляється не в звичайних умовах, а лише при взаємодії із специфічними чинниками зовнішнього середовища. Це так звані екогенетичні варіанти. Наприклад, у осіб з мутаціями в локусі глюкозо-6-фосфатдегідрогенази при лікуванні сульфаніламидами виникає гемоліз еритроцитів, у осіб з аномальною холіноестеразою введення дитиліна приводить до тривалої зупинки дихання.

У зв'язку з великим числом нозологічних форм генних хвороб, неповною клінічною діагностикою спадкової патології, дані по частоті спадкових хвороб не завжди точні. Проте зібраний переконливий матеріал про розповсюдження генних хвороб, по яких проводяться масові діагностичні або профілактичні програми.

Загальна частота новонароджених з генними хворобами в популяціях в цілому складає приблизно 1%, з них з аутосомно-домінантним типом успадкування – 0,5%, аутосомно-рецесивним – 0,25%, Х-зчепленим – 0,25%; Y-зчеплені і мітохондріальні хвороби зустрічаються рідко.

Поширеність окремих форм хвороб коливається від 1:500 (первинний гемохроматоз) до 1:100 000 і нижче (гепатолентикулярна дегенерація, атаксія-телеангіоектазія і ін.).

Поширеність генної хвороби умовно можна вважати за високу, якщо 1 хворий зустрічається на 10 000 новонароджених і більше, середній – 1:10 000-1:40 000, низькою – дуже окремі випадки. У групу поширених входить не більше 20 генних хвороб, але вони обумовлюють майже 50% загальної частоти хворих зі спадковою патологією.

Мутаційний процес – постійно відбувається в популяціях людини в генеративних і соматичних клітинах і є основою виникнення і підтримки генетичної різноманітності людини і джерелом виникнення спадкових хвороб. По різних оцінках, частота виникнення мутацій (спонтанний рівень) у людини орієнтовно складає 1×10^{-3} – 1×10^{-7} генів на покоління. Лише у декількох генах мутації виникають з підвищеною частотою (1×10^4 гамет). Ці гени відрізняються від інших великими розмірами (360000 пар нуклеотидів в гені нейрофіброматозу і 2×10^6 – в гені міопатії Дюшена-Беккера).

Таким чином, поточний мутаційний процес на генному рівні в одному поколінні не може забезпечувати високої частоти патологічних алелей в популяціях. По приблизних оцінках загальний відсоток мутаційного процесу в розповсюдженість спадкових хвороб складає близько 20% їх загального числа.

Молекулярні і цитологічні механізми хромосомних мутацій. Хромосомні мутації (аберації) – зміна структури і розмірів хромосом, утворення фрагментів хромосом. Порушення структури хромосом є наслідком порушення процесів кросинговеру, мейозу або мітозу, а також мутагенною дією різних чинників.

Розрізняють внутрішньо- і міжхромосомні перебудови. Серед внутрішньохромосомних аберацій виділяють наступні: делеція – нестача внутрішніх ділянок хромосом; дуплікація – подвоєння ділянок хромосоми; інверсія – розвертання ділянки хромосоми на 180°; транслокація – переміщення ділянки з одного місця хромосоми в інше.

Причинами транслокацій є помилки молекулярно-генетичних процесів рекомбінації і розділення хромосом. Міжхромосомні перебудови – транслокації пов'язані з переміщенням ділянки хромосоми, яка відірвалася, на негомологічну хромосому (хромосому з іншої пари). Ділянка хромосоми може втрачатися клітиною під час мітозу. Розрізняють декілька видів транслокацій: а) реципрокні – взаємний обмін ділянками між негомологічними хромосомами, б) нереципрокні (транспозиції) – приєднання фрагмента до своєї ж хромосоми у іншому місці, в) поліцентричні і ін.

Хромосомні аберації призводять до зміни форми хромосом, групи зчеплення генів в хромосомах, характеру взаємодії генів і їх функціонування. Це негативно позначається на структурі і функції клітин, органів і призводить до хромосомних хвороб. Такі мутації – летальні або напівлетальні, але деякі можуть бути корисними. Наприклад, у людини 23 пари хромосом, а у сучасної людиноподібної мавпи 24 пари. Вважають, що суттєвим етапом еволюції людини є робертсонівська транслокація – злиття 12 і 13 хромосом мавп, і утворення другої хромосоми людини, яка майже повністю відповідає по генетичному складу своїм попередникам. В результаті цього відбулася зміна числа пар хромосом і комбінацій генів, що, імовірно, стало однією з причин появи людини. Решта хромосом людини практично має однакові групи зчеплення з хромосомами людиноподібних мавп.

Хромосомні аберації встановлюють цитогенетичним методом або молекулярно-генетичними (каріотипування, диференційне забарвлення, молекулярно-генетичні дослідження). Можна встановити зміни кількості хромосом, хромосомні аберації і навіть встановити локалізацію і порушення структури конкретного гена.

У людини відома транслокаційна форма хвороби Дауна, коли частина 21 хромосоми під час мейозу приєднується до 15-ої і разом з нею через гамети потрапляє в зиготу.

Сучасні методи вивчення каріотипу людини. Хромосомний комплекс даного виду з його особливостями: числом хромосом, їх формою, наявністю видимих у світловий мікроскоп деталей будови, генним і алельним складом називається каріотипом. Для кожного виду характерна специфічність набору хромосом. Всі живі організми мають постійне число специфічних хромосом в кожній соматичній клітині.

Диплоїдне число хромосом (2n) для людини – 46, для дрозодіфи – 8, для коня – 66, шимпанзе – 48, собаки – 78 і т.д. Гаплоїдне (n) для людини – 23, дрозодіфи – 4 і т.д. Гамети зазвичай містять гаплоїдний набір хромосом.

Мікроскопічні методи вивчення хромосом людини застосовуються з кінця XIX століття. Поєднання цитологічного спостереження хромосом з генетичним аналізом сегрегації і зчеплення генів призвело до народження цитогенетики. Термін «цитогенетика» введений В.Саттоном у 1903р. Спочатку цитогенетика концентрувалася на проблемах кореляції генетичних і цитологічних (хромосомних) ознак. У подальшому цитогенетика методично відокремилася від генетики в окрему галузь науки.

Цитогенетичні методи призначені для вивчення структури хромосомного набору або окремих хромосом. Найбільш поширеним методом в цитогенетиці людини є світлова мікроскопія. Електронна і конфокальна лазерна мікроскопія застосовується в сучасній цитогенетиці тільки з дослідницькою метою.

Об'єктом цитогенетичних спостережень можуть бути соматичні клітини в стані поділу, мейотичні та інтерфазні клітини. Вибір об'єкту визначається метою дослідження. Більшість цитогенетичних досліджень виконуються на соматичних клітинах.

Виготовлення препаратів мітотичних хромосом. Перша головна умова цитогенетичної діагностики – наявність проліферуючих клітин у цитологічному препараті. Використовують кістковий мозок, тканини сім'яника і хоріону, культури клітин фібробластів, ембріональних тканин, клітин амніотичної рідини. Найбільш зручним об'єктом для медичних генетиків виявилася культура лімфоцитів периферичної крові. Для її отримання беруть 1-2 мл венозної крові і додають її в суміш живильного середовища з фітогемаглютиніном (білок бобових рослин – викликає імунологічну трансформацію лімфоцитів і їх ділення). Тривалість культивування складає 48-72 год.

Другою методичною умовою цитогенетичних досліджень є використання колцеміду (або колхіцину) – клітинної отрути, яка руйнує веретено ділення і зупиняє клітинний поділ на стадії метафази. Мітотичний індекс в культурі клітин за 2-3 год. підвищується в 2-3 рази.

Хромосоми у присутності колцеміду коротшають за рахунок конденсації, і в препараті вони легше відділяються одна від одної. Хромосоми, які сильно конденсують на стадії метафази (метод називається метафазним), непридатні для детального аналізу певної ділянки. Для цього клітина має бути зафіксована на попередній стадії, коли хромосома редуплікувалася, але ще не повністю конденсувалася. Це стадія прометафази. Хромосоми на цій стадії погано видно на препараті, є багато накладань однієї хромосоми на іншу, але в окремих клітинах можна знайти ділянку, необхідну для аналізу. Цей метод (або підхід) на відміну від метафазного методу називають прометафазним або методом високодозвільної цитогенетики. Суть методичного втручання при даній модифікації методу полягає в припиненні процесу, який спіралізує і конденсує хромосоми в профази за допомогою препаратів, які вводять в культуру клітин за декілька годин до фіксації.

Диференційне забарвлення хромосом. Цей метод забарвлення хромосом застосовували як єдиний метод вивчення каріотипу людини до початку 70-х років. У 70-х роках у практику увійшли методи диференційного забарвлення і хронології реплікації ДНК в хромосомах.

Диференційне забарвлення забезпечується порівняно простими температурно-сольовими діями на фіксовані хромосоми. При цьому виявляється структурне диференціювання хромосом по довжині, що виражається у вигляді чергування еу- і гетерохроматинових ділянок (темні і світлі смуги). Протяжність цих ділянок специфічна для кожної хромосоми. При диференційному забарвленні ідентифікуються всі хромосоми, плечі і навіть окремі райони. Кожна хромосома має свій малюнок. При диференційному забарвленні метафазних хромосом в каріотипі можна оцінити близько 200-400 ділянок.

Спочатку при спеціальному зафарбовуванні хромосом використовували флуоресцентну речовину акрихін-іприт. Цей варіант був названий Q-методом. Даний метод вимагає швидкої обробки препарату, що не завжди зручно. Для розгляду препарату треба користуватися люмінесцентним мікроскопом.

У подальшому була розроблена методика диференційного забарвлення без флуоресцентних фарбників. Найпоширеніше G-зафарбовування (Гімза). При цьому хромосоми заздалегідь обробляють (або інкубують в сольовому розчині, або обробляють протеазою). Попередня обробка частково порушує структуру хромосом, яка в деяких ділянках відновлюється при забарвленні, що і додає хромосомі індивідуальну смугастість.

Механізм утворення сегментів доки недостатньо з'ясований. Вважають, що забарвлені сегменти – гетерохроматинові, пізно репліковані ділянки хромосом з послідовностями ДНК, що повторюються, а нефарбовані – еухроматинові ділянки, в яких розташовані кодуючі послідовності.

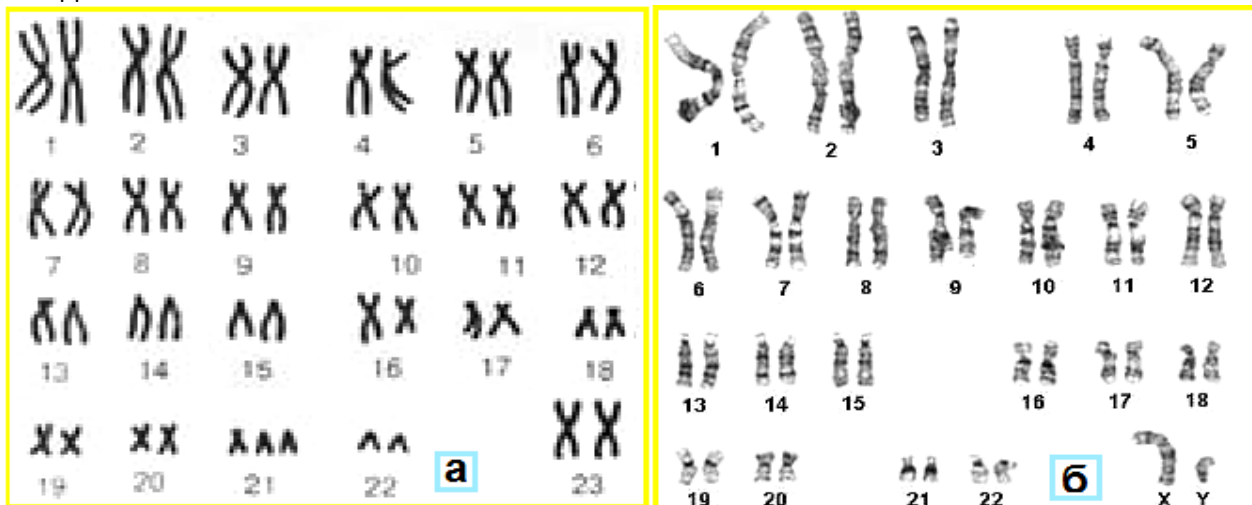


Рис. 8.4. Каріотиби людини при простому (а) і при диференційному (б) забарвленні.

Для ідентифікації хромосом, окрім методів виявлення лінійної структурної диференціації, можна скористатися однією з важливих характеристик хромосом людини – асинхронністю їх реплікації по довжині.

«Малюнки» послідовності реплікації специфічні для кожної хромосоми. Для виявлення послідовності реплікації застосовується аналог тимідину 5-бромде-зоксидин. Ділянки хромосоми, які увімкнули цей аналог, забарвлюються погано. Використовуючи цей метод, можна ідентифікувати будь-яку хромосому або хромосомну перебудову. Введення аналога 5-бромдезоксидину в культуру на 24 години і більше застосовується для диференційного забарвлення сестринських хроматид.



Якщо 5-бромдезоксидин ввести на повний клітинний цикл, то знову утворена хроматида включає аналог тимідину і забарвлюється слабо.

Рис. 8.5. Метафазная пластинка з диференціальним забарвленням сестринських хроматид.

Інша хроматида забарвлюється, як завжди, інтенсивно. Цей метод дозволяє легко виявляти сестринські хроматидні обміни (СХО), число яких збільшується при спадкових хворобах з хромосомною нестабільністю (анемія Фанконі, пігментна ксеродерма і ін.). Частота СХО збільшується також при мутагенних діях, тому метод обліку СХО широко використовується при вивченні мутаційного процесу під впливом різних чинників у людини.

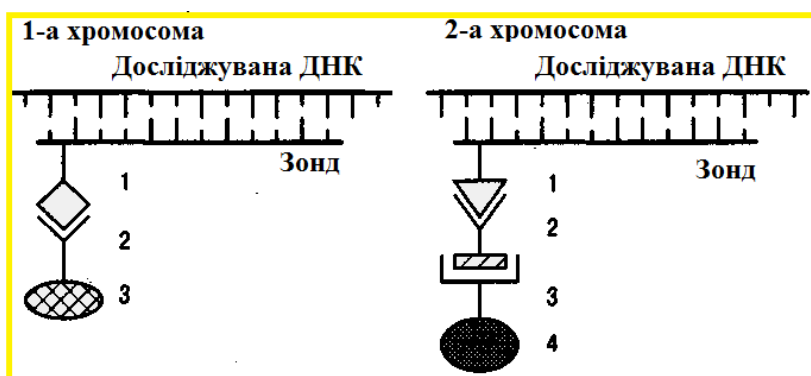
Молекулярно-цитогенетичні методи. Завдяки успіхам молекулярної генетики людини розроблений принципово новий метод вивчення хромосом — *метод флуоресцентної гібридизації in situ (FISH)*. Принцип цього методу полягає в наступному.

Для хромосоми, яка вивчається, або конкретної її ділянки, виходячи із специфічності послідовності основ ДНК, готують одноланцюгову ділянку ДНК, до якої приєднується біотваній або дігксогенин. Така «мічена» ділянка ДНК називається зондом.

На мікроскопічному препараті *in situ* при лужній обробці хромосомна ДНК

денатурується, тобто розриваються зв'язки між двома нитками ДНК. Зондом обробляють препарат. Оскільки послідовність основ ДНК-зонда і відповідна ділянка хромосоми взаємно комплементарні, то зонд приєднується до хромосоми. У цій ділянці відбувається ренатурація ДНК.

Після цього препарат обробляють речовиною, яка завдяки своїй структурі здатна вибірково приєднатися до біотваню або дігноксигеніну. Як видно на схемі, для біотваню такою речовиною є стрептовідин, для дігноксигеніну — антидігноксигенінове антитіло. До цих речовин можуть бути приєднані в один або два етапи флюоресцентні фарбники (родамін — червоний колір або флюоресцеїн ізотіоціанат — зелений колір). За допомогою люмінесцентного мікроскопа забарвлені хромосоми візуалізуються на фоні нефарбованих. Межі застосування методу FISH дуже широкі: від локалізації гена до розшифровки складних перебудов між декількома хромосомами. Слід підкреслити, що з'єднання молекулярногенетичних і цитологічних методів робить майже необмеженими можливості



діагностики хромосомних аномалій.

Рис.8.6. Схема подвійної специфічної флюоресцентної гібридизації *in situ*.

Дво- і трибарвна флюоресцентна гібридизація *in situ* застосовується для обліку симетричної хромосомної аберації у осіб, опромінених

багато років тому іонізуючими випромінюваннями. Вказаний метод вимагає менше часу, чим каріотипування диференційно забарвлених метафаз.

У клінічній цитогенетиці метод FISH займає вагомe місце. У випадках складних хромосомних перебудов, які охоплюють більше двох хромосом, диференційне G-забарвлення не завжди дозволяє ідентифікувати змінені сегменти хромосом. У цих випадках застосовують трибарвний варіант методу FISH. Наприклад, у дитини з множинними вродженими аномаліями при G-аналізі виявлені складні перебудови в шести хромосомах (1, 4, 7, 8, 9 і 12) з 10 розривами. Повна ідентифікація розривів можлива тільки за допомогою FISH-забарвлення.

Метод FISH може застосовуватися для діагностики анеуплоїдій в інтерфазних ядрах. Принцип методу в цьому варіанті такий же, як і для метафазних пластинок. Наприклад, специфічний для хромосоми 21 зонд ДНК, сполучений з біотином, гібридується з денатурованими клітинами з амніотичної рідини. У нормі, тобто якщо у плоду є дисомія по хромосомі 21, в ядрі можна бачити дві флюоресцентні відповідним кольором крапки. Якщо у плоду трисомія, то в ядрі спостерігається 3 крапки. Такий методичний прийом називають інтерфазною цитогенетикою. Метод простий, економічний і вимагає мало часу (декілька годин).

24-кольоровий FISH.

Каріотип людини складається з 22 аутосом і статевих хромосом X і Y. Тобто для одночасної ідентифікації матеріалу усіх хромосом людини необхідно мати 24 унікальномічені хромосомспецифічні ДНК проби. Для їх мічення цілком достатньо 5 флуорохромів. Хромосомспецифічна ДНК-бібліотека мітяться унікальними комбінаціями трьох флуорохромів. В результаті флуоресцентної *in situ* гібридизації кожній хромосомі людини відповідає свій псевдоколір. Такий метод хромосомного аналізу дозволяє виявляти і ідентифікувати будь-які транслокації матеріалу негомологічних хромосом. Забарвлення хромосоми більш ніж одним кольором свідчить про наявність транслокації. Колір

хромосомних районів дозволяє однозначно визначити хромосоми, які були залучені в дані хромосомні перебудови. Більше того, одночасне отримання посмугованих аналізованих хромосом нерідко дозволяє провести також ідентифікацію точок розривів-з'єднань, що мали місце при хромосомних перебудовах. Завдяки 24-кольоровій FISH первинний аналіз складних каріотипів може бути завершений менш ніж за дві доби. При цьому отримані результати будуть абсолютно достовірні. Тільки у найскладніших випадках необхідні додаткові дослідження для уточнення положення точок розривів-з'єднань. На жаль, необхідно відмітити, що 24-кольоровий FISH не застосовують при аналізі внутрішньохромосомних перебудов. Делеції, інверсії, дуплікації залишаються непомітними для цього методу.

R_xFISH. У 1997 р. група дослідників з Кембріджського університету під керівництвом професора Малкольма Фергюсона-Сміта, докторів Йоганнеса Вієнберга і Стефана Мюллера розробила базу для методу багатоколірного бендінга хромосом людини. В основі цього методу, що дістав назву R_xFISH, лежить той же принцип багатоколірної *in situ* гібридизації, але на відміну від 24-кольорового FISH методу, він дозволяє виявляти і частину внутрішньохромосомних перебудов. ДНК проби, які використовуються в R_xFISH, помічені комбінацією трьох флуорохромів, що забезпечує 7 псевдокольорів. Проте вони специфічно забарвлюють окремі ділянки хромосом, створюючи їх кольорову посмугованість. Усі проби забарвлюють декілька хромосомних ділянок різних хромосом. Така особливість ДНК проб для R_xFISH обумовлена способом їх отримання. Вони є хромосомспецифічними ДНК бібліотеками двох видів гібонів: *Nylobates concolor* і *Nylobates syndactylus*. В результаті інтенсивних хромосомних перебудов, що мали місце при формуванні сучасного вигляду гібонів, матеріал їх хромосом виявився перекомбінованим порівняно з організацією хромосом у їх загального предка, а також у людини, хромосоми якої відомі своїм консерватизмом. Очевидно, що, незважаючи на усю фантастичність картини R_xFISH, використання цього методу має досить серйозні обмеження: перебудови хромосом, що мали місце усередині одного кольорового R_x-бенда, не можуть бути виявлені за допомогою цього методу, якщо вони не призводять до значних і легко помітних змін розміру цього бенда. Проте R_xFISH при збільшенні кількості використаних флуорохромів буде більш інформативним, ніж рутинний 24-кольоровий FISH метод. Цікавою методичною особливістю R_xFISH є можливість його проведення без супресії гібридизації мічених повторювальних послідовностей перед гібридизацією з Cot1 ДНК людини. Автори вважають, що це стало можливим завдяки відмінності первинних послідовностей повторів гібонів і людини, що диспергували. Варто зазначити, що одночасне використання ДНК проб, що помічаються 3 різними флуорохромами, повинно призводити до 3-х кратного послаблення сигналу, обумовленого повторами, що диспергують.

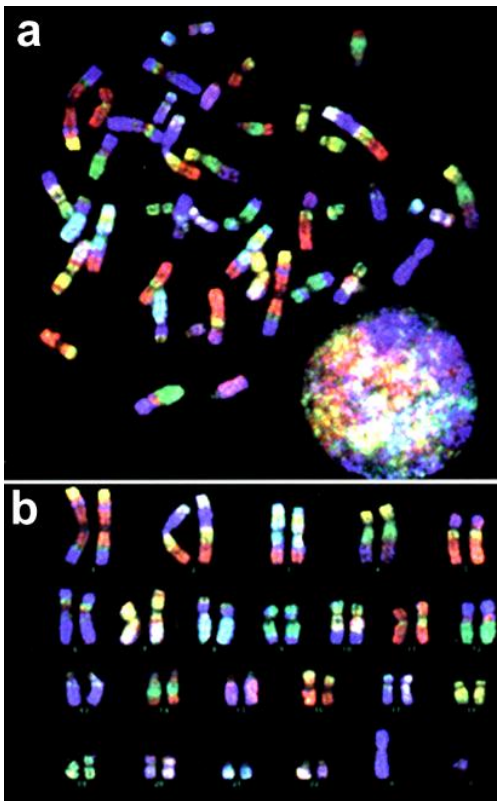
Фірма засновник «Applied Imaging» перетворила його на рутинну процедуру, створивши комерційно доступне і необхідне матеріальне забезпечення. До переваг R_xFISH нині слід віднести наступні пункти:

- метод дозволяє здійснювати аналіз усього генома людини в одному експерименті багатокольорового FISH методу;
- є в наявності комерційно доступні набори міченої ДНК проб і необхідних систем детекції;
- метод дозволяє проводити швидку ідентифікацію значної частини внутрішньо- і міжхромосомних перебудов;
- можлива автоматична ідентифікація метафазних хромосом «кольорового бендінга».
- для кожної хромосоми людини існує унікальний колірний баркод;
- R_xFISH інтегрований в робочу станцію CytoVision і стандартні системи флуоресцентної мікроскопії.

До недоліків R_xFISH можна віднести великий розмір багатьох кольорових бендів. А кожна з хромосом людини, 15, 18, 19, 21, 22, X і Y є однокольоровим бендом. Використання в майбутньому більшого числа флуорохромів і нових ДНК проб, отриманих завдяки використанню штучних хромосом або мікродисекції метафазних хромосом, може значно розширити використання методу.

Багатоколірний FISH/високодозвільний бендинг.

Одночасно з R_xFISH була запропонована ще одна система отримання багатоколірного бендинга хромосом людини. На відміну від R_xFISH, вона призначена не для повного аналізу усіх хромосом, а для проведення детального аналізу однієї з них. Ця система була розроблена співробітниками Інституту генетики людини університету міста Іена (У.Клауссен, І.Худорба) в співпраці з фірмою MetaSystems. У цих цілях був отриманий комплект мікродисекційних ДНК проб і розроблено спеціальне програмне забезпечення «MetaSystems' isis mFISH» для порівняльного аналізу рівня світіння різних флуорохромів. Специфічні ділянки ДНК проби були помічені різними флуорохромами або комбінаціями флуорохромів. Рівень сигналу кожної з мікродисекційних специфічних ділянок бібліотек варіює по інтенсивності, досягаючи максимуму в центрі і поступово падаючи практично до нуля в його межах. Перекривання профілів інтенсивності сигналів ДНК проб забезпечує варіації співвідношень інтенсивностей флуоресценцій різних флуорохромів уздовж хромосоми. Співвідношення інтенсивностей можуть бути переведені в поняття псевдоколюру, і таким чином, кожній точці зображення приписаний свій псевдоколір. В результаті програмної обробки зображення кожному з хромосомних районів відповідатиме свій псевдоколір. Необхідне програмне забезпечення входить в пакет програм фірми MetaSystems GmbH. Наочним прикладом використання цього підходу може служити кольоровий бендинг хромосоми 5 людини. Сім специфічних ділянок мікродисекційних ДНК проб були помічені 5-ма різними флуорохромами. Комп'ютерна обробка співвідношень інтенсивності світіння флуорохромів виділила більше 20 бендів різних псевдоколюрів. Причому, це число бендів виявляється навіть на коротких, сильно конденсуючих хромосомах, що відкриває можливість проведення високодозвільного хромосомного аналізу



при фарбуванні хромосом пізньої метафази (рис.8.7). Цей варіант багатоколірної FISH виявився високоефективним при аналізі не лише міжхромосомних, але і внутрішньохромосомних перебудов. Для успішного застосування методу дослідник повинен заздалегідь визначити хромосому, в детальному вивченні якої він зацікавлений.

Рис. 8.7. Кольорова посмугованість хромосом людини при R_xFISH.

Нині у ряді діагностичних центрів деякі варіанти багатоколірного FISH використовуються як рутинні методики при аналізі хромосомних перебудов у людини. Найбільш широке застосування вони знаходять при аналізі реорганізації генома трансформованих клітин у випадках онкологічних захворювань. Перспективним представляється їх використання при вивченні організації інтерфазного ядра і просторової організації хромосом в ході клітинного циклу. Подальше вдосконалення методів багатоколірного FISH і їх спільне використання з

конфокальною мікроскопією може відкрити принципово нові можливості в цитологічних дослідженнях, а отримані з їх допомогою результати можуть привести до революції в наших поглядах на морфофункціональну організацію клітини.

Метод порівняльної гібридизації генома (CGH - comparative genome hybridization). Область використання методу - онкологічна цитогенетика. Призначення методу - визначення ділянок хромосом, які делегуються або ампліфікуються в певному типі пухлини. Ділянки делецій, як правило, містять гени-супресори пухлинного росту, а ділянки ампліфікації містять онкогени. Таким чином, метод використовується здебільшого для картування і клонування генів, залучених у канцерогенез.

Іноді буває досить складно отримати хромосомні препарати хорошої якості з пухлини або у хворих з гематологічними онкозахворюваннями, тому був розроблений оригінальний метод непрямого аналізу хромосом в пухлині. Суть методу CGH в тому, що з пухлини виділяють ДНК і помічають її певним флуорохромом. ДНК, виділену з нормальної тканини, помічають іншим флуорохромом. Хромосомні препарати готують стандартним способом з лімфоцитів периферичної крові контрольного індивіда. Мічену ДНК з пухлини і незміненої тканини гібридизують з хромосомним препаратом. По інтенсивності світіння мітки визначають ділянки делецій і ампліфікації. Ділянка розрізюваності — 5-10 млн. пар нуклеотидів. Для обробки даних використовують програми комп'ютерного аналізу хромосом.

Спектроскопічний аналіз хромосом (SKY). Цей метод використовує флуоресцентні фарбники, що мають спорідненість до певних ділянок хромосом. При використанні набору специфічних зондів з різними фарбниками кожна пара хромосом має свої унікальні спектральні характеристики. Особливість методу — використання інтерферометра, аналогічного тому, який використовується для вимірювання спектру астрономічних об'єктів. Незначні варіації в спектральному складі, враховуються при комп'ютерній обробці, і потім програма призначає кожній парі хромосом кольори, які легко розпізнаються. Результат у вигляді кольорового зображення частіше використовується в цифровій формі. Аналіз каріотипу значно полегшується, оскільки гомологічні хромосоми мають один і той же колір, а аберація стає легко помітною. Крім того, спектральне каріотипування використовується для виявлення транслокацій, які не розпізнаються традиційними методами. Область використання методу — онкоцитогенетика. Завдяки такому підходу вдається точно описати множинні структурні перебудови хромосом, що відбуваються в пухлинних клітинах. У клінічній цитогенетиці визначають дуже незначні за величиною транслокації, інсерції і маленькі маркерні хромосоми.

Показання для цитогенетичного дослідження достатньо широкі, особливо при акушерсько-гінекологічній і дитячій патології (підозра на хромосомну хворобу по клінічній симптоматиці, наявність у дитини множинних вроджених вад розвитку, багаточисельні (більше двох) спонтанні аборти, мертвонародження або народження дітей з вродженими вадами розвитку і ін.).

Класифікація мутацій за способом виникнення. Залежно від причин виникнення мутації можуть бути спонтанні або індуковані. Спонтанні — це мутації, які відбуваються в природі раптово без видимих причин під дією чинників. Індуковані — це мутації, які відбуваються при спрямованій дії певних мутагенів.

До 1925—1927 рр. генетики мали справу тільки із спонтанними мутаціями. Різні спроби підвищити частоту мутацій, у тому числі і розроблені Т.Х.Морганом, не приносили успіху. Складалося враження, що мутаційний процес не залежить від навколишнього середовища. Це стимулювало автогенетичні концепції, згідно яким еволюцію організмів пов'язували тільки з дією внутрішніх чинників.

Оволодіння методами індукованого мутагенезу зіграло величезну роль у боротьбі з

такими тенденціями, а також розширило можливості генетичного аналізу. Вперше підвищення частоти спадкової мінливості під впливом зовнішніх агентів виявили в 1925 р. радянські мікробіологи Г.А.Надсон та Г.С.Філіппов. Вони спостерігали збільшення різноманітності спадкових форм — сальтантів, як вони їх назвали, після дії «променями радію» на нижчі гриби.

У 1927 р. Г.Меллер повідомив про дію рентгенівських променів на мутаційний процес у дрозофіли і запропонував класичний кількісний метод обліку рецесивних летальних мутацій в Х-хромосомі у цього об'єкту. Майже одночасно Л.Стадлер (1928 р.) описав вплив рентгенівських променів на мутаційний процес у ячменю. У тому ж році М.Н.Мейсель в лабораторії Г.А.Надсона отримав мутації у дріжджів під дією хімічних сполук (хлороформ і ін.).

У 30-х роках відкрито хімічний мутагенез у дрозофіли: спочатку В.В.Сахаров (1932 р.), а потім М.Ю.Лобашев і Ф.А.Смірнов (1934 р.) показали, що деякі сполуки (йод, оцтова кислота, аміак) здатні індукувати рецесивні летальні гени в Х-хромосомі. У 1939 р. С.М.Гершензон відкрив сильний мутагенний ефект екзогенної ДНК у дрозофіли. Могутні хімічні мутагени були відкриті в 1946 році А.Рапопортом (етиленимін) і Ш.Ауербах і Дж.Робсоном (азотистий іприт). Разом з мутагенами були знайдені речовини – антимутагени.

Можливість змінювати швидкість мутаційного процесу послужила вирішальним стимулом до з'ясування причин спонтанних мутацій. Одна з перших спроб пояснити причини спонтанних мутацій зводилася до припущення про те, що насправді їх індукує природний фон радіоактивності. Проте з'ясувалося, що таким шляхом можна пояснити виникнення лише близько 0,1 % всіх спонтанних мутацій у дрозофіли. Не підтвердилася і гіпотеза про тепловий рух атомів як головну причину спонтанних мутацій. Були спроби пояснити спонтанні мутації результатом дії продуктів метаболізму клітин і організму.

Сучасна точка зору на причини спонтанних мутацій сформувалася в 60-х роках завдяки з'ясуванню механізмів відтворення, репарації і рекомбінації генів і відкриттю ферментних систем, відповідальних за ці процеси. Зараз загальноновизнана тенденція пояснювати генні мутації, як помилки матричного синтезу ДНК.

Великий вплив на розвиток теорії мутаційного процесу сприяло вивчення його генетичного контролю. Були відкриті гени, мутації яких можуть підвищувати або знижувати частоту, як спонтанних, так і індукованих мутацій.

Перше пояснення механізму мутаційних змін (генних мутацій і хромосомних аберацій) було запропоновано в 1935 р. М.С.Тімофєєвим-Ресовським, К.Циммером и М.Дельбрюком на підставі аналізу радіаційного мутагенезу у вищих організмів і перш за все у дрозофіли.

Перспективи подолання цих і інших суперечностей теорії мутаційного процесу, були представлені у фізіологічній гіпотезі мутаційного процесу М.Ю.Лобашевим в 1946 році.

Мутагенні чинники. Забруднення навколишнього середовища небезпечно не тільки для сучасного покоління, але і представляє небезпеку для майбутніх поколінь, оскільки багато забруднювачів є мутагенами. Виявлення і усунення генетично активних чинників з місця існування людини — завдання генетичної токсикології, яка є найбільшим розділом екологічної генетики, що активно розвивається. Це пояснюється її величезним прикладним значенням.

Відкриття індукованого мутаційного процесу вимагає значних зусиль від дослідників: пригадаємо, що Г.Дж.Меллер отримав Нобелівську премію за відкриття мутагенної дії рентгенівських променів (1927 р.). Тепер же мутагени виявляються на кожному кроці. Багато продуктів виробничої діяльності людини, що з'являються як результат так званого технічного прогресу, володіють генетичною активністю. При цьому ми говоримо не тільки про відходи виробництва. Це можуть бути ліки, консерванти, харчові добавки і фарбники, косметика, інсектициди і пестициди, не говорячи вже про дим сигарет і випромінювання, тим більше

зброя масового знищення — ядерна і хімічна. Складніше йде справа з антропогенними чинниками зовнішнього середовища. Так, наприклад, багато інсектицидів — хлоровані вуглеводні ніколи не існували в природі. Вони не трансформуються в харчових ланцюгах і тому не розкладаються біологічним шляхом, що не враховується при їх застосуванні. До них відносяться поліхлорбіфеніли, зокрема пестициди: 2,4-дихлорфеноксиоцетова кислота (2,4-Д) або 2,4,5-трихлорфеноксиоцетова кислота (2,4,5-Т) — ефективні дефоліанти. Діоксин, що також відноситься до поліхлорованих біфенілів і найактивнішої отрути, що є, відомою в даний час. Один з них входив до складу agent orange, що застосовувався армією США у В'єтнамі, як бойовий дефоліант. Діоксин утворюється також при спалюванні сміття у великих кількостях на заводах по знищенню міських відходів.

У списку найбільш значущих антропогенних чинників забруднення середовища (з 19 найменувань) перші п'ять місць займають: 1) пестициди; 2) важкі метали; 3) діоксид вуглецю; 4) діоксид сірки і продукти її окислення, суспензії; 5) розливи нафти, стічні води промислових підприємств. При цьому радіоактивні відходи, які є генетично активними, стоять тільки на 12-му місці як забруднювачі.

У генетичній токсикології прийнято говорити не тільки про мутагени, але і про генетично активні чинники. Не завжди можна визначити безпосередньо мутагенний ефект тієї або іншої дії, але можна показати його вплив на кросинговер, тобто на рекомбінацію генів або індукцію репаративного синтезу ДНК, супроводжуючого багато пошкоджень генетичного матеріалу.

Таким чином, мутагенез, рекомбінагенез і індукція репаративного синтезу ДНК — це показники генотоксичності або генетичної активності досліджуваного чинника.

Генетично активні чинники діляться на фізичні, хімічні і біологічні. До фізичних чинників відносяться температура, іонізуюча радіація, ультрафіолетове випромінювання, високочастотне електромагнітне випромінювання, ультразвук і т. д. Хімічні генетично активні чинники набагато важче піддаються підрахункам і класифікації. Досить сказати, що до них відносяться будь-які речовини, що порушують структуру відтворення молекул ДНК. Вихлопні гази автотранспорту і викиди в атмосферу виробничих підприємств містять алкідні сполуки (їх називають радіоміметиками), органічні сполуки ртуті, поліциклічні вуглеводні, що володіють генетичною активністю. Багато хімічних сполук самі по собі не проявляють генетичної активності, але їх легко активують внутрішньоклітинні метаболіти, а іноді і сполуки, що знаходяться в навколишньому середовищі. Наприклад, поширені солі азотної кислоти легко перетворюються на нітрит (солі азотистої кислоти) — мутагени, що дезамінують основи ДНК. У кислому середовищі шлунку ссавців нітрит і амін-сполуки дають нітросполуки — супермутагени, які порушують реплікацію ДНК. Багато речовин, так звані промутагени, активуються в організмі ссавців при дії цитохрому Р-450. Цей фермент синтезується в печінці, відноситься до класу неспецифічних монооксигеназ і призначений для інактивації чужорідних сполук, які потрапляють в організм. Але Р-450 разом з тим здатний активувати деякі промутагени. Може активувати не тільки промутагени, але і потенційні канцерогени — речовини, які викликають рак. Необхідно відзначити високий рівень кореляції між мутагенним і канцерогенним ефектами багатьох чинників, перш за все фізичних і хімічних.

Особливий інтерес представляють біологічні генетично активні чинники. В кінці 30-х років С.М.Гершензон встановив мутагенний ефект ДНК і вірусів. Пізніше було з'ясовано, що хромосомна аберація в соматичних клітинах викликається вірусами віспи, кору, вітряної віспи, грипу, гепатиту. Стрептолізін-О, токсин гемолітичного стрептокока, підвищує частоту мутацій в культурі ембріональних фібробластів людини. У контролі частота хромосомної аберації складає $4,0 \pm 0,5\%$, а при дії токсину - $24,3 \pm 0,6\%$. Ю.Я.Керкис показав мутагенний ефект імунологічного стресу при пересадці і відторгненні через тканинну несумісність шкіри у

мишей. Могутнім мутагеном біологічного походження виявився афлатоксин — продукт життєдіяльності цвілевого гриба *Aspergillus flavus*.

Методи визначення мутагенної активності речовин. Нові хімічні сполуки (а всього їх в ужитку більше 4,5 млн) проходять перевірку на генетичну активність. Це своєрідна служба генетичної безпеки, що використовує багатий арсенал різних тест-систем для виявлення генетичної активності. Ці системи дозволяють враховувати мутації генів, їх рекомбінації, втрати і іншу аберацію хромосом, порушення ділень ядра, індукцію репарації ДНК і так далі. При цьому використовуються різні об'єкти: бактерії, дріжджі і інші нижчі гриби, плодова мушка-дрозофіла, рослини, культура клітин тварин і людини.

Найбільший інтерес представляє генетична активність досліджуваних агентів для людини. Оскільки пряме дослідження їх дії на людину неможливе, доводиться обмежуватися результатами, які отримані на модельних об'єктах. Ці результати в значній мірі підходять і для людини із-за біологічної універсальності властивостей генетичного матеріалу — це завжди ДНК. Проте екстраполяція даних результатів на людину завжди ускладнюється, оскільки разом з принципом біологічної універсальності слід враховувати і специфіку об'єктів, що мають свої особливості реагування на мутагени.

Як приклад розглянемо тільки одну тест-систему, що набула широкого поширення при первинному виявленні генетичної активності. Ця система, розроблена в 60-і роки ХХ століття американським дослідником Б.Еймсом, який тривалий час вивчав мутації в генах, контролюючих біосинтез гістидину у *Salmonella typhimurium*. Робота Б.Еймса, приклад того, як спочатку чисте теоретичне дослідження, спрямоване на з'ясування структури і функції гена, мало суто практичне значення. Маючи в своєму розпорядженні детально охарактеризовані мутанти сальмонели, що потребують гістидину, знаючи молекулярну природу мутаційних змін: заміни, вставки або випадіння пар основ в ДНК гена або інші перебудови генетичного матеріалу, Еймс запропонував вивчати реверсії гістидинових мутантів, тобто відновлення у них здатності синтезувати гістидин, і рости на середовищі без гістидину в результаті дії різних мутагенів.

Тест дуже простий: досить засіяти середовище без гістидину мутантом сальмонели, що потребує гістидину (який природно не росте на такому середовищі, і нанести в центр чашки Петрі випробовувану хімічну сполуку. Через 2-3 доби можна бачити появу колоній мутантів (в даному випадку ревертантів) навколо плями нанесеної речовини, які є генетично активними.

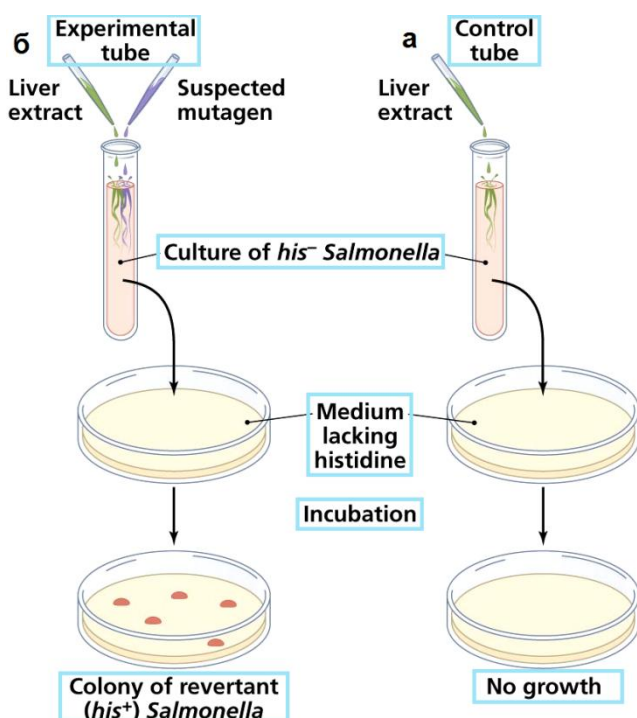


Рис. 8.8. Схема встановлення мутагенної активності речовин в спот-тесті з використанням системи Б. Еймса:

а - контрольна чашка Петрі, що містить середовище без гістидину і засіяна культурою мутанта *S. typhimurium* His⁻, не здатного синтезувати гістидин. Зростають тільки рідкісні спонтанні ревертанти His⁻ - His⁺. У центрі кружок фільтрувального паперу, змочений розчинником, який не містить мутагену;
б - чашка, в центр якої розміщений кружок фільтрувального паперу, змочений розчином мутагену. Навколо нього з'являється колонії індукованих мутантів - ревертантів His⁺.

Це приклад так званого спот-теста (від англ. spot — пляма). В даний час тест Еймса вдосконалений: в геном сальмонели вводять делецію по одному з генів репарації, тобто інактивують цей процес,

тим самим підвищують чутливість бактерії до мутагенів. Вводять також мутаген, який блокує синтез ліпополісахаридної капсули для підвищення проникності клітин, а також плазміди, що підвищують чутливість клітин до агентів, і підсилюють рекомбінацію. Нарешті, випробовувану речовину почали наносити разом з екстрактом мишачої або щурячої печінки, що містить цитохром Р-450 для активації промутагенів. Таким чином, тест-системи для виявлення генетичної активності можуть бути далі вдосконалені і в значній мірі генетичними методами. Із застосуванням тесту Еймса вперше були показані мутагенні ефекти: сигаретного попелу, деяких харчових консервантів, фарби для волосся і так далі. Велика кількість хімічних сполук, які по мірі їх появи необхідно перевіряти на генетичну активність, зумовила розробку простих, надійних і дешевих методів і тест-систем для скринінгу, або просіювання, великого числа сполук.

Для виявлення мутагенів, в цих тест-системах використовують різні об'єкти і наступні основні критерії: 1) генним мутаціям — замінам, вставкам і випадінням пар нуклеотидів; 2) конверсії; 3) реципрокної, переважно мітотичної, рекомбінації; 4) нерозходження хромосом у мітозі; 5) хромосомні аберації; 6) обмін між сестринськими хроматидами. Крім того, застосовують такі критерії, як збільшення частоти домінантних леталей у дрозофіли та мишей і частоти аномальних сперматозоїдів у мишей. Останні два тести не можна віднести до суто генетичних, проте їх результати добре корелюють з рештою тестів, заснованих на критеріях пошкодження генетичного матеріалу.

Зараз для виявлення індуктування генних мутацій, які викликають чинники середовища або харчові добавки, використовують тест Еймса на штаммах *Salmonella typhimurium*, а саме: TA98, який індукує мутації за механізмом зсуву рамки зчитування та TA100, як індуктор мутацій заміни пар основ. Аналіз проводився з використанням та без використання мікросомальної фракції печінки щура (Федоренко В.О. та ін., 2005 р.). Мутагенний ефект прийнято вважати встановленим у тому випадку, коли співвідношення кількості колоній ревертантів у досліді і контролі становить 2,5 і більше разів, причому мутагенний ефект характеризується як слабкий при перевищенні кількості дослідних колоній над контрольними у 2,5-10 разів (1 бал), середній — у 10-100 разів (2 бали), сильний — у понад 100 разів (3 бали) (Дуган А.М. та ін., 1990).

Домінантні летальні мутації вивчали на *Drosophila melanogaster*. Даний тест виявляє цілу групу різноманітних пошкоджень генетичного матеріалу до якої належать анеуплоїдія за аутосомами, асиметричні транслокації, великі делеції, втрата цілих хромосом. Частота виникнення домінантних леталей залежить від стадії сперматогенезу. Відомо, що зрілі сперматозоїди дуже чутливі до впливу пошкоджуючих факторів, оскільки ефективність репарації на цій стадії суттєво знижена, або репарація не відбувається взагалі. Суть методу полягає у порівнянні частоти виникнення домінантних летальних мутацій (ДЛМ) у контролі і за дії досліджуваних речовин.

Як об'єкти при масовому визначенні генетичної активності тих або інших чинників використовують культури клітин людини і тварин, вищі рослини, мікроорганізми, дрозофілу.

Антимутагенез. Це поняття включає такі дії на клітину і організм, які блокують або зменшують вірогідність виникнення мутацій. Подібні дії можуть стимулювати системи інактивації мутагенів або пригнічувати системи активації промутагенів, можуть стимулювати процеси безпомилкової репарації або безпосередньо модифікувати мутаген, «відволікати» його від генетичного матеріалу. Крім того, в організмі є спеціальні механізми, що знижують несприятливий ефект мутацій. По-перше, це здатність ДНК-полімерази здійснювати корекцію дефектів (на основі комплементарності ланцюгів ДНК) при утворенні нових ланцюгів ДНК. Існує також спеціальний фермент — ендонуклеаза, що редагує структуру дочірніх ланцюгів ДНК. Певну роль в стабільності генотипу відіграє надмірність генетичного коду, а також диплоїдність каріотипу соматичних клітин. Парність алелей (диплоїдний набір хромосом)

перешкоджає прояву рецесивних мутацій. До зниження проявів шкідливих мутацій призводить наявність в генотипі декількох десятків або сотень копій генів (екстракопіювання генів), що кодують життєво важливі білки. Окрім цього існують спеціальні молекулярні механізми репарації.

Антимутагенною активністю володіють радіопротектори — сполуки, які здатні зменшувати летальний ефект іонізуючої радіації, перш за все сірковмісні амінокислоти: цистеїн, цистин, метіонін і ін.

Зазвичай для кожного конкретного мутагену антимутагенна активність специфічна, що ускладнює пошуки антимутагенів. Генетичну активність N'-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідину (МННГ) нейтралізує кров ссавців, в якій основним антимутагеном (анти-МННГ) служить гемін. Ненасичені жирні кислоти, тонінова кислота і катехін, що міститься в чаї і каві, деякі вітаміни, наприклад α -токоферол, і інші сполуки володіють більшою або меншою антимутагенною активністю по відношенню до окремих мутагенів.

Різноманітність досліджуваних сполук і об'єктів велика, тому важко робити узагальнення про природу антимутагенних ефектів. Крім того, дослідники не можуть контролювати всі етапи становлення мутації. Відсутні тест-системи, спеціалізовані для пошуку антимутагенів.

Людські популяції гетерогенні за багатьма ознаками, зокрема по реакції на різні дії зовнішніх чинників. Цю обставину вже враховує фармакогенетика, що вивчає реакцію різних груп людей на лікарські речовини. Відомо, наприклад, що у деяких хворих сульфаніламідні препарати викликають гемоліз. Це пов'язано зі спадковою недостатністю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Є категорія людей із спадковою хворобливою реакцією на глюкокортикоїди. При застосуванні цих препаратів у них підвищується внутрішньоочний тиск. Нестабільність деяких форм мутантів гемоглобіну пов'язана з гемолізом при застосуванні окислювачів.

Відома також спадкова чутливість до дії деяких мутагенів і канцерогенів. Наприклад, люди з підвищеною активністю арилгідрокарбонгідроксилази схильні до захворювань на рак легень у разі контакту з поліциклічними вуглеводнями, які після гідроксилування вказаним ферментом перетворюються на епоксиди, що володіють високою канцерогенною активністю.

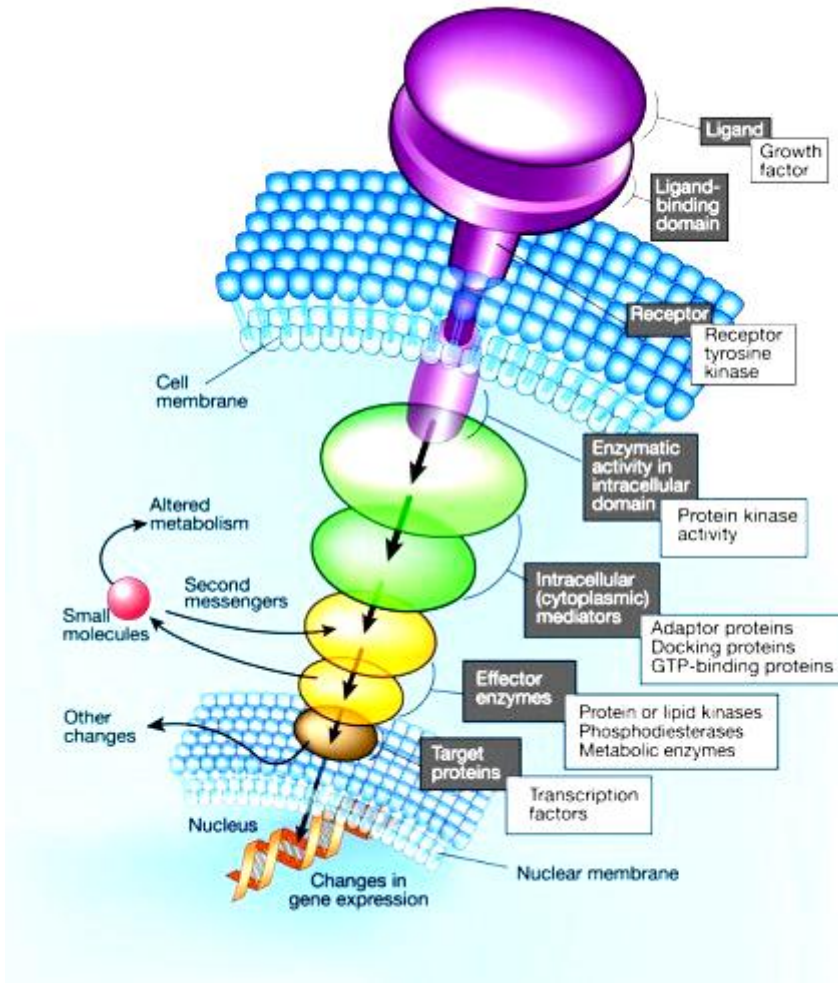
Ці обставини необхідно враховувати в різних областях людської діяльності: при лікуванні хворих, при професійному відборі людей, які мають справу з шкідливим виробництвом. Заходи по забезпеченню генетичної безпеки людини пов'язані з вирішенням багатьох проблем, загальних для генетики і екології, і, перш за все охорона навколишнього середовища від забруднення. Генетична токсикологія робить при цьому головний акцент на генетично активні чинники.

Регуляція клітинного циклу. Апоптоз

Мітотичний цикл і його регуляція. Роль циклінів і циклінзалежних кіназ. Принципи передачі мітогенного сигналу. Роль чинників зростання, інтегринів і кадгеринів. Контрольні точки мітотичного циклу. Апоптоз.

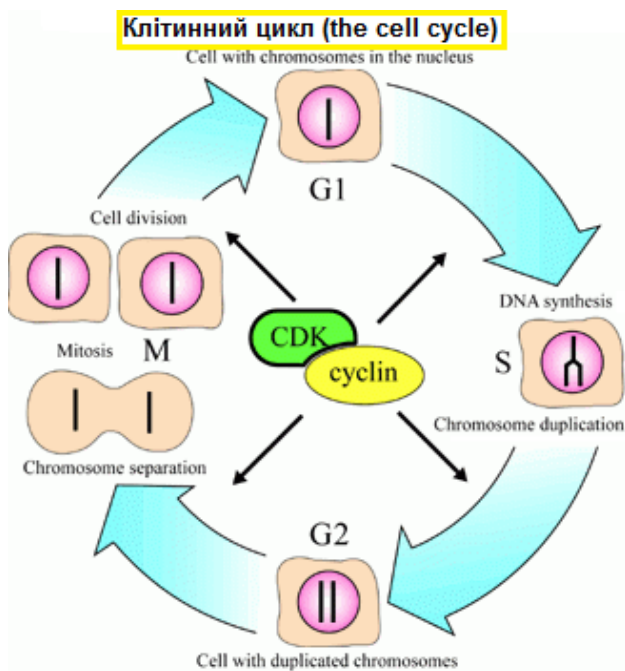
Клітина - елементарна структурно-функціональна і генетична одиниця всього живого. Поза клітиною життя немає. Розмноження клітин відбувається тільки шляхом поділу початкової клітини, якому передують відтворення її генетичного матеріалу. Активація поділу клітини відбувається внаслідок дії на неї зовнішніх або внутрішніх чинників. Процес поділу клітини з моменту її активації називається проліферацією. Іншими словами, проліферація - це розмноження клітин – збільшення числа клітин, що відбувається шляхом мітотичних ділень. Період від ділення до ділення клітини, зазвичай називають клітинним циклом або мітотичним циклом.

Рис. 9.1. Активація проліферації.



У дорослому організмі людини клітини різних тканин і органів мають неоднакову здатність до ділення. Крім того, при старінні інтенсивність проліферації клітин знижується (тобто збільшується інтервал між мітозами). Зустрічаються популяції клітин, що повністю втратили властивість ділитися. Це, як правило, клітини, що знаходяться на термінальній стадії диференціювання, н., зрілі нейрони, зернисті лейкоцити крові, кардіоміоцити. В цьому відношенні виняток становлять імунні В- і Т-клітини, які, знаходячись

в кінцевій стадії диференціювання, при появі в організмі певного антигена, який раніше зустрічався, здатні розпочати проліферацію. В організмі людини є тканини, що постійно оновлюються, - різні типи епітелію, кровотворні тканини. У таких тканинах існує пул клітин,



які постійно діляться, замінюючи типи клітин (н., клітини крипт кишківника, клітини базального шару покривного епітелію, кровотворні клітини кісткового мозку), які відпрацювали або загинули. Також в організмі існують клітини, які не розмножуються в звичайних умовах, але знову набувають цю властивість за певних умов, зокрема при необхідності регенерації тканин і органів. Процес проліферації клітин жорстко регулюється, як самою клітиною (регуляція клітинного циклу, припинення або уповільнення синтезу аутокринних ростових чинників і їх рецепторів), так і її мікрооточенням (відсутність стимулюючих контактів з сусідніми клітинами і матриксом, припинення секреції або синтезу паракринних ростових чинників).

Рис. 9.2. Клітинний (мітотичний) цикл.

Порушення регуляції проліферації призводить до необмеженого поділу клітини, що у свою чергу ініціює розвиток онкологічного процесу.

Клітинний цикл складається з 4 періодів: пресинтетичного (G1-період), синтетичного (S-період), постсинтетичного (G2-період) і власне мітоза (M). Крім того, існує так званий G₀-період, що характеризує стан спокою клітини.

Перші три періоди – інтерфаза, мітоз і цитокінез складають M-фазу клітинного (мітотичного) циклу, який завершується утворенням двох дочірніх клітин. Кожна дочірня клітина вступає в G1-період інтерфази і може почати новий клітинний цикл. За періодом G1 починається S-фаза, під час якої ДНК і хромосоми подвоюються (реплікуються), і далі - фаза G2. Початок мітозу означає кінець інтерфази. Клітини, що знаходяться у стані спокою, затримуються у фазі G1 і, переходять у фазу G₀. Зазвичай еукаріотичні клітини, які не зупинилися у фазі G₀, завершують цикл за 24 ч.

У G1- періоді клітини мають диплоїдну кількість ДНК в одному ядрі. У цей період починається ріст клітин за рахунок синтезу і накопичення клітинних білків, що обумовлено збільшенням кількості РНК в клітині. Крім того, починається підготовка до синтезу ДНК. У наступному S-періоді відбувається реплікація ДНК і, відповідно, подвоєння хромосом (кожна хромосома утворена двома хроматидами). Постсинтетична G2 фаза називається також премітотичною. У цій фазі відбувається активний синтез мРНК, потім починається власне мітоз.

Ділення усіх еукаріотичних клітин пов'язане з конденсацією подвоєних (реплікованих) хромосом. В результаті ділення хромосоми передаються в дочірні клітини. Такий тип ділення еукаріотичних клітин називається мітоз (від греч. mitos - нитки) - є єдиним повноцінним способом збільшення числа клітин і збереження спадкового матеріалу. Процес мітотичного поділу підрозділяють на декілька етапів: профаза, прометафаза, метафаза, анафаза, телофаза.

Призначення регуляторних механізмів клітинного циклу полягає не в регуляції проходження клітинного циклу як такого, а в тому, щоб забезпечити безпомилковість розподілу спадкового матеріалу в процесі репродукції клітин. В основі регуляції розмноження клітин лежить зміна станів активної проліферації і проліферативного спокою. Регуляторні чинники, контролюючі розмноження клітин можна умовно розділити на дві групи: позаклітинні (екзогенні) та внутрішньоклітинні (ендогенні). Екзогенні чинники знаходяться в мікрооточенні клітини і взаємодіють з поверхнею клітини. Чинники, які синтезуються самою клітиною і діють усередині неї, відносяться до ендогенних.

Такий підрозділ дуже умовний, оскільки деякі чинники, будучи ендогенними по відношенню до клітини, що продукує їх, можуть виходити з неї і діяти як екзогенні регулятори на інші клітини. Якщо регуляторні чинники взаємодіють з тими ж клітинами, які їх продукують, то такий тип контролю називається аутокринним. При паракринному контролі синтез регуляторів здійснюється іншими клітинами.

Екзогенні регулятори проліферації. У багатоклітинних організмів регуляція проліферації різних типів клітин відбувається внаслідок дії не одного будь-якого ростового чинника, а їх сукупності. Крім того, деякі ростові чинники, будучи стимуляторами для одних типів клітин, поводяться як інгібітори по відношенню до інших. Класичні ростові чинники є поліпептидами з молекулярною масою 7-70 кДа. Вже відомо більше сотні таких ростових чинників.

Найбільша кількість літератури присвячена чиннику росту з тромбоцитів (PDGF). Звільняючись при руйнуванні судинної стінки, PDGF бере участь в процесах тромбоутворення і загоєння ран. PDGF є потужним ростовим чинником для фібробластів, які покояться. Разом з PDGF, не менш докладно вивчений епідермальний чинник росту (EGF), який також здатний стимулювати проліферацію фібробластів, окрім цього також стимулює і інші типи клітин,

зокрема хондроцити. Багато клітин здатні ділитися, тільки будучи прикріпленими до позаклітинної структури - базальної мембрани (епітеліоцити), колагенових волокон (фібробласти) і так далі. Інформація ж про зв'язок клітини з такою структурою поступає від інтегринів. Це адгезивні білки, що складаються з двох нерівних субодиниць.

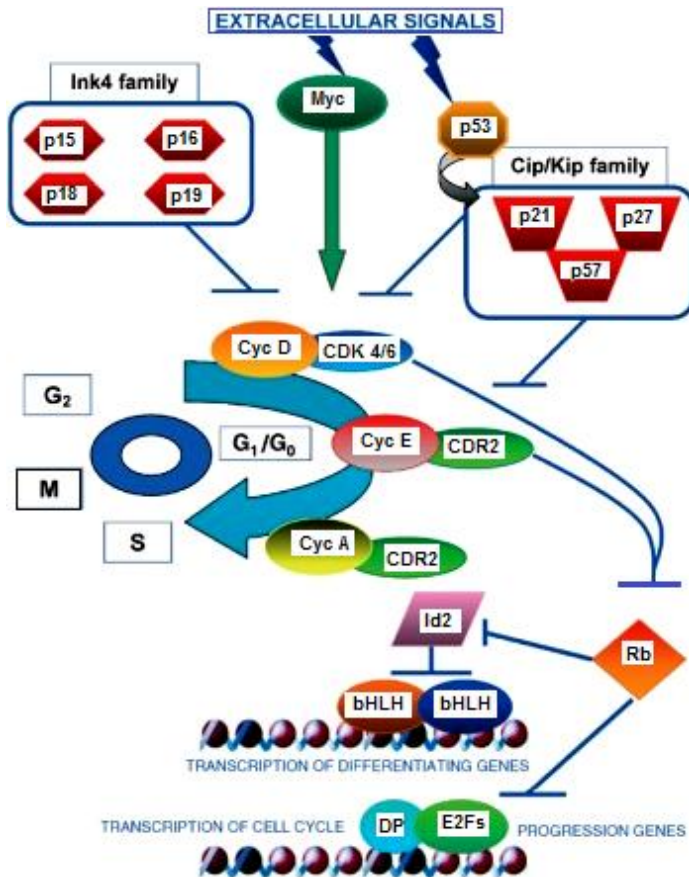


Рис. 9.3. Регуляція клітинного циклу.

При зв'язуванні з позаклітинним матриксом менша (β -) субодиниця інтегрину активує одну з тирозинкіназ — FAK (Focal Adhesion Kinase), а та ще одну тирозинкіназу — Src. Остання відноситься до класу нерцепторних тирозинкіназ, оскільки не входить до складу рецепторного комплексу і навіть не взаємодіє безпосередньо з рецепторами.

Безпосереднім субстратом Src є білок SHC, який зв'язує цей сигнальний шлях (що йде від інтегринів) з сигнальними шляхами від рецепторів мітогенів. Загальною ж частиною останніх шляхів є каскади МАПК (мітогенактивуючих протеїнкіназ). Отже, адаптерний білок SHC повинен стимулювати проходження сигналу по цих каскадах.

Велику групу ростових чинників складають цитокініни (інтерлейкіни, чинники некрозу пухлини, колонію-стимулюючі чинники і так далі). Усі цитокініни поліфункціональні. Вони можуть, як посилювати, так і пригнічувати проліферативні відповіді. Так, н., різні субпопуляції CD4+ T-лімфоцитів, Th1 і Th2, що продукують різний спектр цитокінінів, по відношенню один до одного є антагоністами. Тобто, Th1 цитокініни стимулюють проліферацію клітин, які їх продукують, але в той же час пригнічують ділення Th2 клітин, і навпаки. Таким чином, в нормі в організмі зберігається постійний баланс цих двох типів T-лімфоцитів. Взаємодія чинників росту з їх рецепторами на поверхні клітини призводить до запуску цілого каскаду подій усередині клітини. Внаслідок чого відбувається активація чинників транскрипції і експресія генів проліферативної відповіді, що зрештою ініціює реплікацію ДНК і вступ клітини в мітоз.

Контактне гальмування проліферації. Якщо ж клітина встановлює контакт не з позаклітинним матриксом, а з іншими клітинами, то спостерігається ефект, прямо протилежний попередньому, — припинення ділень. Це позначається як контактне гальмування. Н., після чергового пересівання культури клітин в плоску скляну посудину вони спочатку — впродовж декількох годин прикріплюються до дна посудини і лише після цього входять в клітинний цикл (стимуляція ділень). Коли ж на дні посудини не залишається вільного місця і клітини вступають в контакт один з одним, ділення припиняються - контактне гальмування. Сигнал про міжклітинний контакт, мабуть, йде від кадгеринів — адгезивних білків, що беруть участь в утворенні таких контактів. Ймовірно, у кадгеринів міняється при цьому конфігурація; тому їх цитоплазматичні домени набувають здатність зв'язувати білок β -катенін. Припускають, що цей білок — чинник транскрипції. Коли він вільний від зв'язку з кадгерином (т. б. коли клітина ще не контактує з іншими клітинами), він утворює активний

комплекс з ще одним чинником транскрипції — білком Tcf4. Комплекс мігрує в ядро і тут прямим або (швидше за все) опосередкованим способом стимулює транскрипцію генів цикліна D і білка Мус. Їх синтезують ті самі гени, які активуються в сигнальних шляхах, що йдуть від ростових чинників і від інтегринів. Ті шляхи сходяться і взаємно доповнюють один одного на каскадах мітогенактивуючих кіназ (МАПК).

Ендогенні регулятори клітинного циклу. У нормальних еукаріотичних клітинах проходження клітинного циклу строго регулюється. Причиною онкологічних захворювань є трансформація клітин, яка пов'язана з порушеннями регуляторних механізмів клітинного циклу. Одним з основних результатів дефективності клітинного циклу є генетична нестабільність, оскільки клітини з неповноцінним контролем клітинного циклу втрачають здатність коректно подвоювати і точно розподіляти між дочірніми клітинами свій геном. Генетична нестабільність приводить до придбання нових особливостей, які відповідають за прогрес пухлині.

Циклін-залежні кінази (CDK) і їх регуляторні субодиниці (цикліни) є основними регуляторами клітинного циклу.

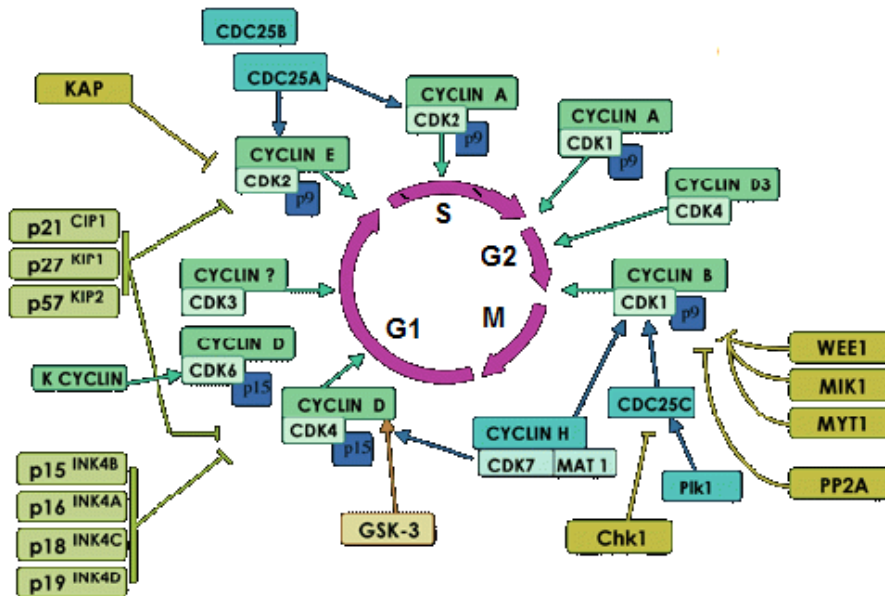


Рис. 9.4. Ендогенні регулятори клітинного циклу.

Дослідження мітотичного циклу показали, що ключову роль в почерговій зміні його фаз відіграють спеціальні протеїнкінази - тобто циклінзалежні кінази (Cdk-cyclin - dependent kinas). Кожна з них фосфорилує певні

білки, залучені у відповідну фазу циклу, і таким чином активує або інгібує їх.

Молекула будь-якої CDK складається лише з однієї субодиниці, яка сама по собі неактивна. Для активації CDK потрібно зв'язування з нею спеціального білка – цикліна (Ц). Є декілька різних циклінів, і, як вважають, що зв'язаний з CDK циклін не лише активує фермент, але і надає йому субстратну специфічність відносно тих або інших білків.

У активній формі протеїнкінази є гетеродимерними комплексами циклін-CDK (Ц-CDK), де циклін служить активаторною, а CDK – каталітичною субодиницею. Їх називають комплексами, через те, що можуть бути різні поєднання конкретних циклінів і конкретних Cdk, причому кожне таке поєднання характерне тільки для певної фази циклу.

Роль білку p53 («Вартовий генома», «Диспетчер апоптозу», «Пухлинний супресор»). Білок p53 контролює виключно важливі клітинні процеси і, завдяки цьому, залучений у велику кількість всяких регуляторних ланцюгів. Він (чи його ген) активується у відповідь на різноманітні ушкодження клітинної структури: нерепаровані розриви і інші ушкодження ДНК, порушення розходження хромосом в мітозі, руйнування мікротрубочок і т. д.

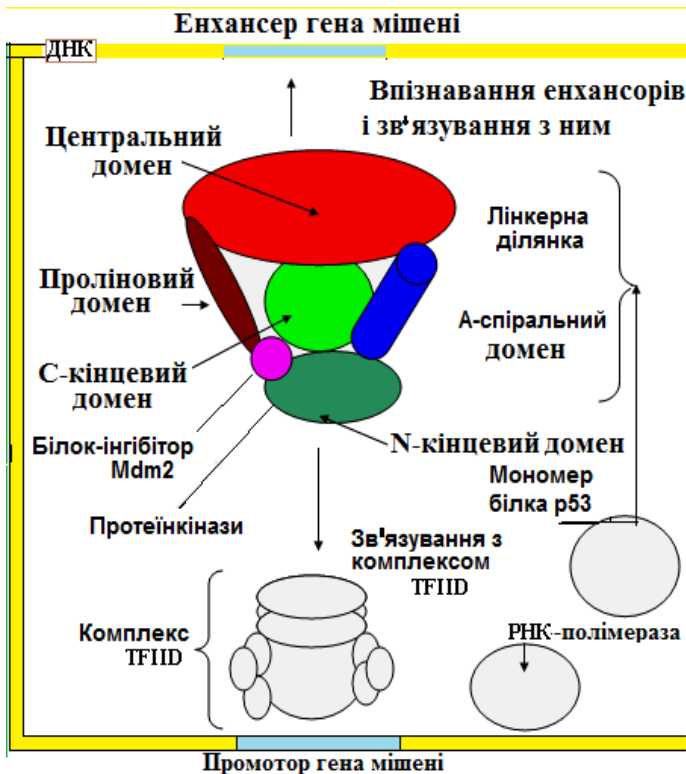
Сам же білок p53 регулює активність, принаймні, трьох груп генів:

- 1) активує гени (P21, GADD45 і інші), що відповідають за зупинку клітинного ділення;
 - 2) активує гени (BAX, KILLER/DR5, PIG і інші), що запускають апоптоз - процес, який призводить шляхом активації спеціальних ферментів, до загибелі клітини; а також саморепресує гени (BCL2, RELA), які стримують апоптоз;
 - 3) активує гени (TSP1, BAI1 і інші), що гальмують ангіогенез (утворення нових судин).
- У результаті через посередництво білку p53 клітина у відповідь на ушкодження своєї

структури або затримується на тій чи іншій стадії мітотичного циклу і виправляє ці ушкодження; або (при неможливості виправлень) взагалі припиняє ділення і вступає в процес клітинного старіння (фаза III по Хейфліку); або (при потенційній небезпеці пошкодженої клітини для її оточення) здійснює апоптоз.

Апоптозу, окрім інших, піддаються і клітини, в яких відбулася пухлинна трансформація. В зв'язку з цим зрозуміло, чому одночасно гальмується ангиогенез (ще один спосіб обмеження пухлинного росту).

Тому білок p53 - один з найбільш важливих пухлинних супресорів. У більшості пухлин функції білку p53 порушені. Така загальна біологічна роль білку p53. Розглянемо деякі



пов'язані з ним питання детальніше. Білок p53 складається з 392 амінокислот, що утворюють 6 доменів: 1) N-кінцевий домен активує ген білку p21 (інгібітор кіназ), та інших білків, що зупиняють поділ клітини; 2) додатковий домен транскрипції для активації генів-мішеней; 3) гнучкий проліновий домен – проявляє супресорну активність, запускає апоптоз; 4) центральний домен зв'язується з енхансерами. У цій ділянці мутації 5-8 екзонів призводять до онкогенезу; 5) α-спіральний домен відповідає за ядерну локалізацію p53 і утворення тетрамерів (мономери не активні); 6) С-кінцевий домен - мішень для модифікуючих ферментів (кіназ, ацетилаз, глікозилаз).

Рис. 9.5. Білок p53.

Якщо С-кінцевий домен не модифікований, центральний домен не здатний взаємодіяти з ДНК-мішенню. Модифікація ж С-домена не лише надає білку p53 таку здатність, але і впливає на його специфічність. Річ у тому, що p53-залежні енхансери (що відносяться до різних генів) дещо розрізняються послідовністю нуклеотидних пар і від виду модифікації С-домена, а від цього залежить, з якими конкретно енхансерами зв'язуватиметься білок p53, а з якими – ні. Таким чином, за допомогою модифікації двох кінцевих (N- і С-) доменів білок p53 отримує (від дуже численних «джерел») інформацію про стан клітини, переробляє її шляхом зміни своєї конфігурації і належним чином реагує як чинник транскрипції певних генів.

С-кінцевий домен виконує ще одну функцію. Як відзначалося вище, деякі гени (BCL2, RELA) білком p53 не активуються, а репресуються. Ця дія, як вважають, здійснюється С-доменом. При цьому останній (замість N-домена) зв'язується з комплексом TFIIID і пригнічує його активність.

Проходження клітинного циклу досягається шляхом послідовної активації і дезактивації різних комплексів циклін-CDK. Дія комплексів циклін-CDK полягає у фосфорилуванні ряду білків-мішеней відповідно до фази клітинного циклу, в якій активний той або інший комплекс циклін-CDK. Так, н., циклін E-CDK2 активний в пізній стадії G1 фази і фосфорилує білки, необхідні для проходження через пізню стадію G1 фази і вхід в S фазу. Циклін A-CDK2 активний в S і G2 фазах, він забезпечує проходження S фази і вхід в мітоз.

Циклін А і циклін Е є центральними регуляторами реплікації ДНК. Тому неправильна регуляція експресії якого-небудь з цих циклінов призводить до генетичної нестабільності. Накопичення ядерного цикліна А відбувається виключно у той момент, коли клітина входить в S фазу, тобто у момент G1/S переходу. З іншого боку рівень цикліна Е підвищувався після проходження так званої точки обмеження (R- точки) в пізній G1 фазі, а потім істотно знижувався, коли клітина входила в S фазу.

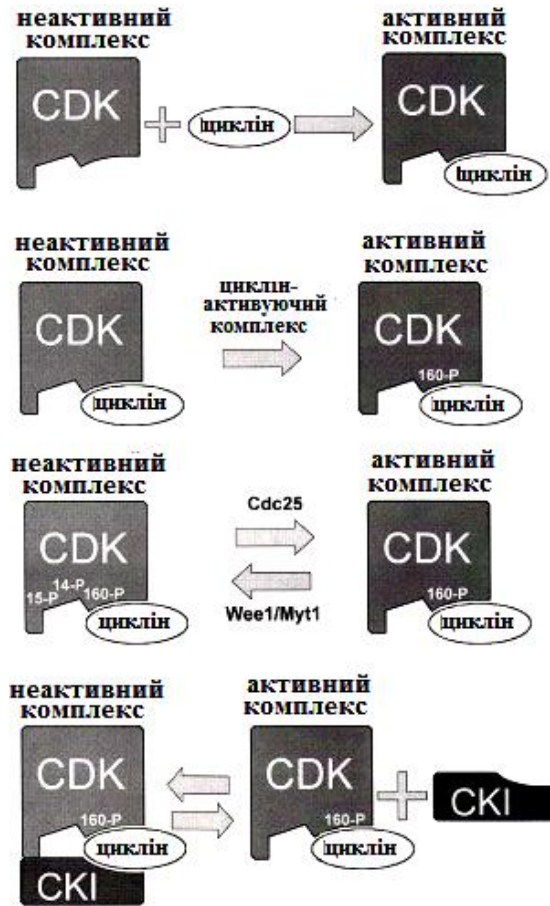


Рис. 9.6. Регуляція активності циклін-залежних кіназ (CDK).

Регуляція CDK. Активність циклін-залежних кіназ (CDK) жорстко регулюється, принаймні, по чотирьох механізмах:

- 1) основний спосіб регуляції CDK - це зв'язування з цикліном, тобто у вільному виді кіназа не активна, і тільки комплекс з відповідним цикліном володіє необхідними активностями;
- 2) активність комплексу циклін-CDK також регулюється за рахунок зворотнього фосфорилування. Для того, щоб придбати активність, потрібне фосфорилування CDK, яке здійснюється за участю CDK активуючого комплексу (CAK), що складається з цикліна H, CDK7 і Mat1;
- 3) з іншого боку, в молекулі CDK, в регіоні, відповідальному за зв'язування субстрату, є сайти, фосфорилування яких призводить до інгібування активності комплексу циклін-CDK. Ці сайти фосфорилуються групою кіназ, включаючи Wee1 кіназу, і дефосфорилуються фосфатазами Cdc25. Активність цих ферментів(Wee1 і Cdc25)

істотно варіює у відповідь на різні внутрішньоклітинні події, такі як ушкодження ДНК;

4) деякі комплекси циклін-CDK можуть бути заінгібовані внаслідок зв'язування з інгібіторами CDK (CKI). Інгібітори CDK складаються з двох груп білків INK4 і CIP/KIP. Інгібітори INK4 (p15, p16, p18, p19) зв'язуються з CDK4 і CDK6 та інактивують їх, запобігаючи взаємодії з цикліном D. CIP/KIP інгібітори (p21, p27, p57) можуть зв'язуватися з комплексами циклін-CDK, CDK1, що містять, CDK2, CDK4 і CDK6. Відмічено, що за певних умов CIP/KIP інгібітори можуть

посилювати кіназну активність комплексів циклін D-CDK4/6.

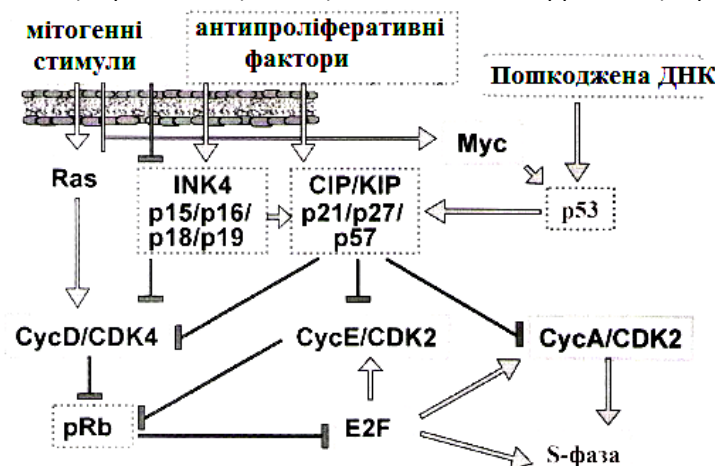


Рис. 9.7. Регуляція G1 фази.

Регуляція G1 фази. У G1 фазі, в так званій точці рестрикції (обмеження, R- точка), клітина приймає рішення, ділиться їй або ні. Точка рестрикції - це та точка клітинного циклу, після якої клітина стає несприйнятливою до зовнішніх сигналів аж до завершення усього клітинного циклу. Точка рестрикції

ділить G1 фазу на два функціонально різних етапа: G1pm (постмітотичний етап) і G1ps (пресинтетический етап). Впродовж G1pm клітина оцінює присутні в її оточенні ростові чинники. Якщо необхідні ростові чинники є присутніми в достатній кількості, то клітина переходить в G1ps.

На теперішній час виділено і охарактеризовано значну кількість чинників росту: тромбоцитарний чинник росту; епідермальний чинник росту (EGF); чинники росту фібробластів (FGF) (мають дев'ять ізоформ і мають невелику клітинну специфічність, тому відносяться до групи малоспецифічних); чинник росту нервів (NGF) (цей чинник росту діє тільки на клітини нервової системи); еритропоетин (EPO) (цей чинник росту стимулює утворення еритроцитів в кістковому мозку); інтерлейкін-2 і інтерлейкін-3.

Усі ці чинники росту діють в основному на специфічні клітини-мішені. Кожен чинник росту є лігандом, який зв'язується із специфічним поверхневим рецептором клітини і ініціює процес передачі сигналу.

Клітини, що перейшли в G1ps період, продовжують нормальне проходження усього клітинного циклу навіть за відсутності ростових чинників. Якщо відсутні необхідні ростові чинники в G1pm періоді, то клітина переходить в стан проліферативного спокою (G0 фаза).

Основним результатом каскаду сигнальних подій, що відбуваються внаслідок зв'язування ростового чинника з рецептором на поверхні клітини, є активація комплексу циклін D-CDK4/6. Активність цього комплексу істотно зростає вже в ранньому G1 періоді. Цей комплекс фосфорилує мішені, необхідні для проходження в S фазу. Основним субстратом комплексу циклін D-CDK4/6 є продукт гена ретинобластоми (pRb). Нефосфорильований pRb зв'язується і інактивує чинники транскрипції групи E2F. Фосфорилування pRb комплексами циклін D-CDK4/6 призводить до вивільнення E2F, який проникає в ядро і ініціює трансляцію білків, необхідних для реплікації ДНК – генів цикліна E і цикліна A. У кінці G1 фази відбувається короткочасне збільшення кількості цикліна E, яка провіщає накопичення цикліна A і перехід в S фазу.

Зупинку клітинного циклу в G1 фазі можуть викликати наступні чинники: підвищення рівня інгібіторів CDK, депривація ростових чинників, ушкодження ДНК, зовнішні дії, онкогенна активація.

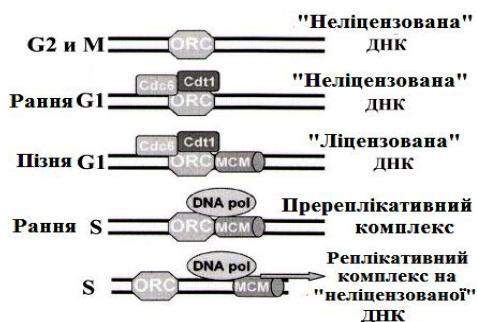


Рис. 9.8. Регуляція S фази.

S фаза - це етап клітинного циклу, коли відбувається реплікація ДНК. Кожна з двох дочірніх клітин, які утворюються у кінці клітинного циклу, повинна отримати точну копію ДНК материнської клітини. Кожна з молекул ДНК, що становить 46 хромосом людської клітини, має бути скопійована тільки один раз. Саме тому синтез ДНК регулюється у край жорстко.

Тільки ДНК клітин, що знаходяться в G1 або S фазі, може реплікуватися. Це наводить на думку, що ДНК має бути «ліцензована» для реплікації і що ділянка ДНК, яка була подвоєна, втрачає цю «ліцензію». Реплікація ДНК починається в місці зв'язування білків, званих ORC (Origin of replicating complex). Декілька компонентів, необхідних для синтезу ДНК, зв'язуються з ORC в пізній M або ранній G1 фазі, формуючи пререплікативний комплекс, який і дає «ліцензію» ДНК для реплікації. На стадії переходу G1/S до пререплікативному комплексу додаються ще білки, необхідні для реплікації ДНК, таким чином, утворюється комплекс ініціації. Коли починається процес реплікації і утворюється реплікативна вилка, багато компонентів відділяються від комплексу ініціації, а в місці ініціації реплікації залишаються тільки компоненти постреплікативного комплексу.

У багатьох роботах було показано, що для нормального функціонування комплексу ініціації потрібна активність циклін A-CDK2. Крім того, для успішного закінчення S фази також потрібна активність комплексу циклін A-CDK2, що, власне, і є основним регуляторним механізмом, що забезпечує успішне завершення синтезу ДНК. Зупинку в S фазі може індукувати ушкодження ДНК.

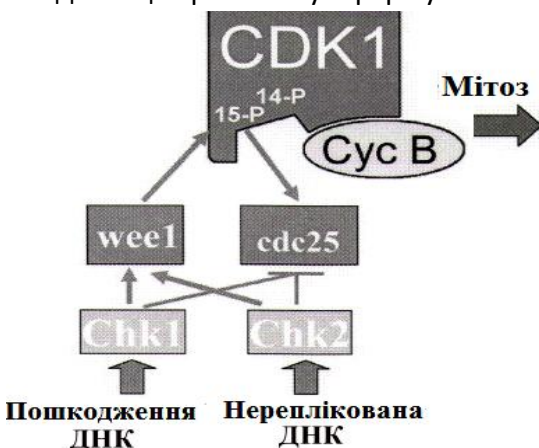


Регуляція G2 фази. G2 фаза - це етап клітинного циклу, який починається після завершення синтезу ДНК, але до початку конденсації. Основним регулятором проходження G2 фази є комплекс циклін B-CDK2.

Рис.9.9. Регуляція G2 фази.

Зупинка клітинного циклу в G2 фазі відбувається внаслідок інактивації комплексу циклін B-CDK2. Регулятором переходу G2/M є комплекс циклін B-CDK1, його фосфорилування/дефосфорилування регулює вхід в M фазу. Ушкодження ДНК або наявність нереплікованих ділянок запобігає переходу в M фазу.

Регуляція мітозу. Мітоз - процес ділення ядра (каріокінез) клітини і цитоплазми (цитокінез). Для проходження раннього мітозу потрібна активність цикліна A. Проте, основним регулюючим цикліном, як і в попередній стадії, є циклін B у комплексі з CDK1. Активність комплексу циклін B-CDK1 призводить до деградації ядерної оболонки, конденсації хроматину і формування з конденсованих хромосом метафазної пластинки. При переході з метафази в анафазу, відбувається деградація цикліна B. Втрата активності комплексу циклін B-CDK1 індукує міграцію хромосом до полюсів і поділ клітини надвоє. У профазі активований комплекс циклін B-CDK1 гарантує, що перехід з інтерфази в мітоз незворотний за рахунок фосфорилування членів родини Cdc25.



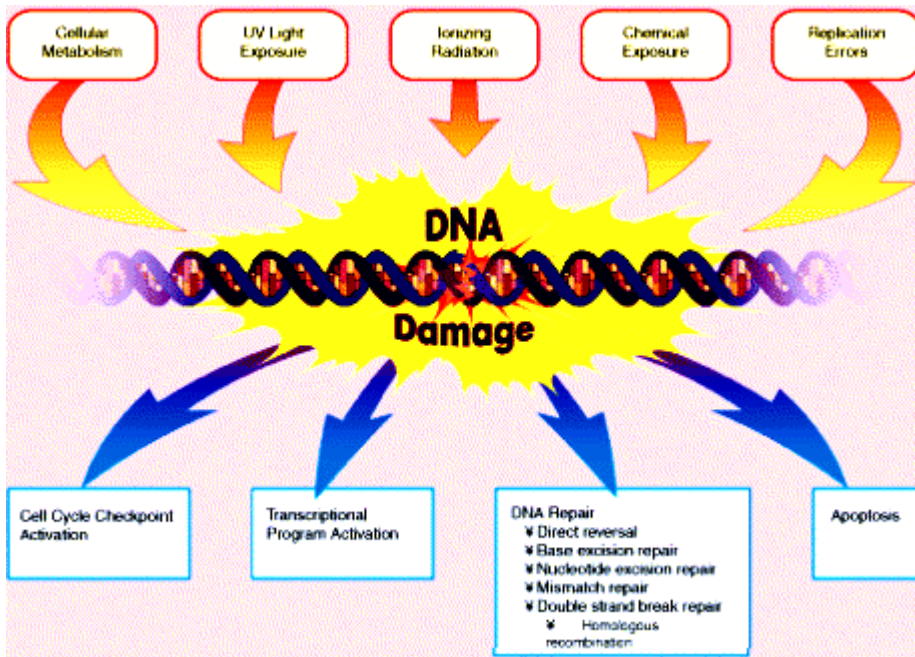
При переході з метафази в анафазу, відбувається деградація цикліна B. Втрата активності комплексу циклін B-CDK1 індукує міграцію хромосом до полюсів і поділ клітини надвоє. У профазі активований комплекс циклін B-CDK1 гарантує, що перехід з інтерфази в мітоз незворотний за рахунок фосфорилування членів родини Cdc25.

Рис. 9.10. Перехід до мітозу. Контроль ушкоджень ДНК.

Таким чином, знижується інгібуючий вплив Cdc25B і Cdc25C на комплекс циклін B-CDK1, що утворює так звану петлю позитивного зворотного зв'язку. Отже, активний комплекс циклін B-CDK1 призводить до безповоротного виходу з інтерфази. У ранній анафазі відбувається деградація комплексу циклін B-CDK1, що в подальшому призводить до утворення ядерної оболонки і цитокінезу.

Для того, щоб зберегти і захистити генетичну інформацію, еукаріотичні клітини створили сигнальні або комунікаційні мережі, що відповідають за відновлення і контроль ушкоджень ДНК. Ушкодження ДНК можуть бути індуковані багатьма агентами, включаючи іонізуюче опромінення, вільні радикали і токсичні речовини. Дволанцюгові розриви ДНК (DBS) - ушкодження ДНК, що найчастіше зустрічаються. Подібні ушкодження можуть також утворюватися і при реплікації ДНК, а неправильна репарація розривів може призводити до клітинної загибелі, соматичних мутацій і формування пухлин.

Відновлення дволанцюгових розривів ДНК. Існує, два шляхи відновлення дволанцюгових розривів: гомологічна рекомбінація (HR) і негомологічне кінцеве зрощення (NHEJ). У разі репарації шляхом HR використовуються гомологічні послідовності ДНК в якості шаблону для репаративного синтезу, тоді як у разі NHEJ часто відбувається просте



склеювання кінців в місцях розривів.

Рис. 9.11. Відновлення і контроль ушкоджень ДНК.

Репарація розривів ДНК через NHEJ відбувається негайно упродовж усього клітинного циклу. Хоча NHEJ ефективно зрощує кінці в ділянці розривів, цей шлях часто призводить до втрати генетичної інформації, оскільки відбувається процесинг

закінчень в ділянці розриву нуклеазами. На відміну від NHEJ, HR відбувається, головним чином, пізніше - в стадії S і G2 фазах, оскільки залежить від присутності сестринських хроматид, які є шаблоном для репарації. Оскільки відновлення шляхом HR досягається за рахунок нового синтезу з використанням повноцінної гомологічної ДНК, це дозволяє клітині відновлювати ДНК з високою точністю.

У відновленні дволанцюгових розривів ДНК ключову роль відіграють білки ATM і NBS1. ATM - це протеїнкіназа, яка активується негайно після появи дволанцюгових розривів ДНК. Окрім цього, для забезпечення ефективного функціонування репарації ДНК і проходження ключових точок клітинного циклу високовпорядкована структура еукаріотичного хроматину має бути відповідним чином змінена, щоб забезпечити доступ чинників репарації до ДНК. Ці зміни називаються хроматиновими перебудовами, вони здійснюються за рахунок специфічних комплексів, пов'язаних з модифікаціями гістонів.

Для ефективного відновлення дволанцюгових розривів клітина активує безліч різних шляхів. Сигнальний каскад, генерований у відповідь на розриви ДНК, складається з сенсорних, медіауторованих і ефекторних білків і регулюється посттрансляційними модифікаціями білків, а саме їх фосфорилуванням і ацетилюванням. Клітинна відповідь на дволанцюгові розриви ДНК ініціюється розпізнаванням пошкодженої ділянки молекули сенсорними білками. ATM і NBS1 діють спільно як первинні сенсорні білки. Внаслідок розпізнавання ушкоджень ДНК сенсорними білками медіатори, такі як BRCA1, MDC1, 53BP1, набувають посттрансляційні модифікації, які генеруються сенсорними білками. Ці модифіковані медіауторовані білки потім посилюють сигнал від пошкодженої ДНК і передають його на ефектори, такі як RAD51, Artemis, Chk2, p53.

ATM є одним з основних білків, залучених у збереження генетичної стабільності, контроль довжини теломери і в активацію контрольних точок клітинного циклу. NBS1 залучений у виконання тих же функцій. Ці білки діють синергічно. NBS1 утворює комплекс з MRE11 і RAD50 і перетягує цей комплекс безпосередньо до пошкодженої ділянки ДНК. Крім

того, цей комплекс RAD50/MRE11/NBS1(RMN) потрібний для залучення ATM в місце дволанцюгового розриву і для ефективного фосфорилування субстратів ATM.

Крім того, ATM фосфорилує багато чинників, залучених в HR шлях, але роль його в регуляції цього шляху доки залишається не зовсім вивченою.

Функцією NBS1 в якості основного чинника в процесі HR є регуляція клітинної локалізації комплексу RMN. Головну функцію в накопиченні комплексу RMN в місці дволанцюгового розриву виконує домен FHA/BRCT в молекулі NBS1. Цей домен потрібний не лише для ефективного процесу HR, але також для правильного використання сестринських хроматид. Таким чином, NBS1 може регулювати і зчеплення сестринських хроматид, і етап проміжної дисоціації впродовж HR реакції.

Функції ATM в процесі NHEJ полягають у фосфорилуванні нуклеази Artemis. NBS1 також бере активну участь в репарації шляхом NHEJ. Хоча роль NBS1 в NHEJ шляху в клітинах ссавців не настільки критична як в клітинах грибів, було встановлено, що NBS1 потрібний для проведення реакцій NHEJ поблизу розривів ДНК. NBS1 залучений в Artemis-опосередкований шлях NHEJ, ймовірно, за рахунок активації ATM. У відповідь на ушкодження ДНК відбувається взаємодія між комплексом RMN і нуклеазою Artemis. Таким чином, RMN може брати участь в двох шляхах відновлення розривів ДНК в ATM-залежному і ATM-незалежному. Більшою мірою RMN сприяє гомологічній репарації, ніж шляхи негомологічного зрощення кінців.

Клітинні відповіді на дволанцюгові розриви ДНК регулюються за рахунок посттрансляційної модифікації білків, а ATM і комплекс RMN грають ключову роль в подібній модифікації. Ці білки в подальшому забезпечують повноцінну репарацію пошкодженої ДНК і, як наслідок, нормальну життєдіяльність клітини.

Регенерація тканин. Регенерацією називається утворення нової тканини на місці загиблої, відмерлої. У здоровому, нормальному організмі увесь час відбувається фізіологічна регенерація клітин; постійно злущується відмерлий роговий шар епідермісу, і замість нього у внутрішньому шарі шкіри розмножуються нові клітини. Таке ж злущування покривного епітелію відбувається і на слизових оболонках. У кровоносних судинах еритроцити зазвичай живуть 60-120 днів. Отже, приблизно впродовж 2 місяців відбувається повне їх оновлення. Так само систематично заповнюються у міру їх загибелі або відмирання і лейкоцити, і інші формені елементи крові. При різних патологічних процесах клітини і тканини руйнуються у більшій кількості, ніж в нормі. Регенерації тканин належить величезне значення в процесі відновлення пошкоджених тканин і органів («відновна регенерація»). Без регенерації було б неможливе яке-небудь загоєння. У регенерації розрізняють такі поняття, як форма регенерації, рівень регенерації, спосіб регенерації.

Форми регенерації: 1. фізіологічна регенерація - відновлення клітин тканини після їх природної загибелі (н., кровотворення); 2. репаративна регенерація - відновлення тканин і органів після їх ушкодження (травми, запалення, хірургічної дії і так далі).

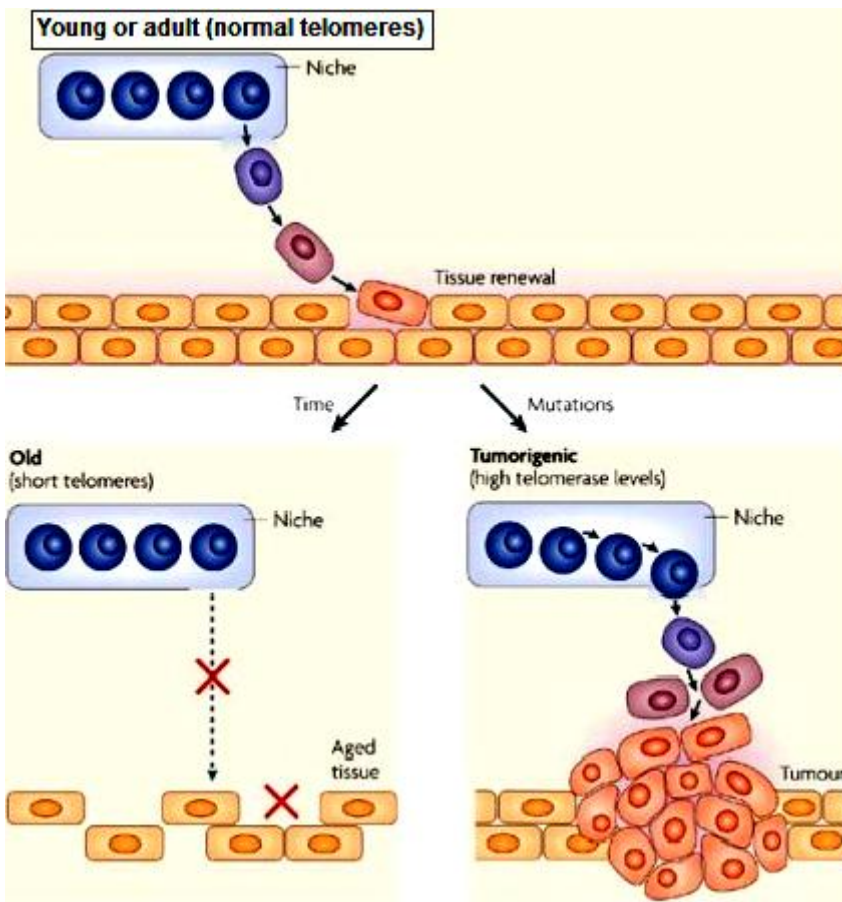
Рівні регенерації відповідають рівням організації живої матерії: 1. клітинний (внутрішньоклітинний); 2. тканинний; 3. органний.

Способи регенерації: 1. клітинний спосіб розмноженням (проліферація) клітин; 2. внутрішньоклітинний спосіб (внутрішньоклітинне відновлення органел, гіпертрофія, поліплоїдія); 3. замісний спосіб (заміщення дефекту тканини або органу сполучною тканиною, зазвичай з утворенням рубця, наприклад: утворення рубців в міокарді після інфаркту міокарду).

Чинники, що регулюють регенерацію:

1. Гормони - біологічно активні речовини.
2. Медіатори - індикатори метаболічних процесів.

3. Кейлони - це речовини глікопротеїної природи, які синтезуються соматичними клітинами, основна функція - гальмування клітинного дозрівання.
4. Антагоністи кейлонів - чинники росту.
5. Мікрооточення будь-якої клітини.



Регенерація тканин відбувається внаслідок проліферації недиференційованих клітин, що мають здатність не лише ділитися під дією відповідних стимулів, але також і диференціюватися в клітини тієї тканини, регенерація якої відбувається. Ці клітини носять назву дорослих стовбурових клітин.

Рис.9.12. Регуляція регенерації тканин.

Багато тканин дорослого організму, такі як тканини гемопоетичної системи, травний епітелій, червоний кістковий мозок, епідерміс, легені містять пул таких клітин. Стовбурові клітини тканин дорослого індивідуума забезпечують організм зрілими

диференційованими клітинами при функціонуванні нормального гомеостазу, а також під час регенерації і відновлення тканин і органів. Дві унікальні особливості характеризують дорослі стовбурові клітини: здатність генерувати нові плюрипотентні стовбурові клітини (самооновлюватися) і здатність давати диференційованих нащадків, які втрачають здатність до самооновлення.

Наші знання про механізми, які визначають коли, де і чому стовбурові клітини будуть самооновлюватися або диференціюватися, залишаються дуже обмеженими, але нещодавно було показано, що мікрооточення (чи ніша) стовбурових клітин забезпечує необхідні сигнали для подальшої поведінки цих клітин. Більше того, втрата контролю над поведінкою цих клітин може призводити до трансформації клітин і раку. Диференційовані клітини разом з виконанням своїх специфічних функцій здатні синтезувати особливі речовини — кейлони, що гальмують інтенсивність розмноження клітин-попередників і стовбурових клітин. Якщо в силу яких-небудь причин кількість диференційованих функціонуючих клітин зменшується (н., після травми), гальмівна дія кейлонів слабшає і чисельність популяції відновлюється. Окрім кейлонів (місцевих регуляторів), клітинне розмноження контролюється гормонами; одночасно продукти життєдіяльності клітин регулюють активність залоз внутрішньої секреції. Якщо які-небудь клітини під впливом зовнішніх ушкоджуючих чинників зазнають мутації, вони елімінуються з тканинної системи внаслідок імунологічних реакцій.

Дослідження в області вивчення механізмів контролю клітинного циклу і регуляції репарації ДНК широко ведуться у всьому світі. Ця тематика є актуальною вже багато десятиліть, оскільки з порушеннями процесів ділення клітин пов'язані багато захворювань,

зокрема онкологічні хвороби. Крім того, процес старіння організму передусім пов'язаний з процесами старіння клітин (нездатність клітин до самовідтворення і регенерації, до збереження і відновлення у разі «поломок» спадкової інформації).

Величезну роль у вивченні механізмів регуляції клітинного циклу зіграв британський вчений Paul Maxime Nurse. P.Nurse разом з Leland H.Harwell і R.Timothy Hunt в 2001г. отримали Нобелівську премію в області фізіології і медицини за відкриття механізмів регуляції клітинного циклу циклінами і циклін-залежними кіназами. P.Nurse має величезну кількість публікацій з тематики регуляції роботи окремих клітин і організму в цілому.

Відомим ученим в області вивчення клітинного циклу і репарації ДНК є професор Гарвардського університету, генетик, Stephen J.Elledge. S.Elledge вивчає регуляцію клітинного циклу і клітинні відповіді на ушкодження ДНК. S.Elledge, услід за нобелівським лауреатом Paul Nurse, що відкрив ключовий ген *клітинного* циклу Cdc2 у грибів, виявив гомологічний ген в клітинах ссавців. Таким чином, йому вдалося відкрити регуляторні механізми, що лежать в основі переходу з G1 в S фазу клітинного циклу, і, крім того, виявити помилки, що відбуваються на цьому етапі, які призводять до злоякісної трансформації клітин. S.Elledge зі своїм колегою Wade Harper *виділили* ген p21 – інгібітор Cdc2. Вони показали, що мутації в цьому гені спостерігаються практично в половині випадків ракових захворювань. Також S.Elledge виявив ген p53, *член* родини p21, який є мутованим у разі захворювання, що називається синдромом Beckwith-Wiedemann – спадкового захворювання, при якому значно підвищений ризик злоякісних новоутворень. Інша область дослідження проф. S.Elledge - вивчення процесів розпізнавання і репарації ушкоджень ДНК. Йому вдалося ідентифікувати фермент Chk2, який активує білок p53 (супресор пухлинного росту), тим самим, запобігати діленню клітин, що мають ушкодження в молекулі ДНК. У іншому своєму дослідженні Elledge показав, що білок, відомий як ATM, бере участь в репарації ДНК. А мутації в гені, що кодує цей білок, зустрічаються в 10% випадків раку молочної залози. Окрім цього, Stephen Elledge розробляє генетичні технології для створення нових лікарських препаратів.

Для підтримки і збереження гомеостазу організму потрібні жорсткі системи регуляції процесів, що протікають на молекулярному, клітинному і організмовому рівнях. Так, щоб уникнути формування злоякісних новоутворень, в кожній клітині організму, що ділиться, виробилися механізми, контролюючі її ділення. Причому цей контроль здійснюється як позаклітинними, так і внутрішньоклітинними чинниками. В процесі старіння організму не лише знижується проліферативна активність клітин, але також порушуються процеси, що регулюють цю активність. Тому з віком підвищується ризик виникнення онкологічних захворювань. У зв'язку з цим, потрібне детальне вивчення механізмів регуляції проліферації і регенерації, щоб запобігти і попередити наслідки безконтрольних процесів, що протікають в клітині і в організмі.

Апоптоз.

Існує багато визначень поняття «апоптоз»:

- програмована клітинна смерть, що супроводжується характерними цитологічними ознаками (маркери апоптозу) і молекулярними процесами;
- форма загибелі клітини, що проявляється зменшенням її розміру, конденсацією (ущільнення) і фрагментацією хроматину, ущільненню зовнішньої і цитоплазматичної мембран без виходу вмісту клітини в довкілля.

У багатоклітинному організмі апоптозом гинуть клітини в процесі ембріогенезу, Т-клітини в процесі диференціювання в тимусі, клітини, заражені вірусами, змінені клітини (при недостатній інтенсивності апоптотичних процесів розвиваються онкологічні захворювання) і б. ін. Основне біологічне призначення апоптозу полягає в тому, щоб в процесі ембріонального морфогенезу створювати органи і тканини з еволюційно закріпленими конфігураціями і розмірами і потім підтримувати ці параметри з допустимими

варіантами впродовж життя.

Найважливішим проявом цієї функції апоптозу після закінчення розвитку людини і інших ссавців є його участь в процесі фізіологічної регенерації (оновлення) клітин різних тканин і органів і підтримці клітинного гомеостазу. Регенерації у різному ступені упродовж усього життя схильні практично усі клітини нашого організму. Особливо інтенсивно клітинне оновлення протікає в клітинах епітелію, дотичних до зовнішнього середовища, шкіри, шлунково-кишкового тракту, сечостатевої і легеневої систем, а також в клітинах крові, імунної системи.

Іншою найважливішою функцією апоптозу є контроль за внутрішнім середовищем клітини, у тому числі клітинного ядра з його вмістом. Зараз доведено, що апоптоз може протікати і в клітинах, позбавлених ядра. При виникненні в клітині порушень, що перевищують допустимі межі, клітина піддається самознищенню. Апоптоз виникає при дії різних ушкоджуючих чинників, які здатні викликати некроз, але в невеликих дозах, наприклад, при дії високої температури, іонізуючого випромінювання, протипухлинних препаратів. Апоптоз бере активну участь у ряді фізіологічних і патологічних процесів. Н., при гормонзалежній інволюції органів у дорослих, зокрема, відторгнення ендометрію під час менструального циклу, атрезії (зарощуванні) фолікулів в яєчниках в менопаузі і регресії (зворотному розвитку) молочної залози після припинення лактації.

Велика роль апоптозу і при патологічній атрофії гормонзалежних органів, н., атрофії передміхурової залози після кастрації і виснаженні лімфоцитів в тимусі при терапії глюкокортикоїдами. А також при патологічній атрофії паренхіматозних органів після обтурації (закупорки) вивідних проток, що спостерігається в підшлунковій і слинних залозах, нирках. Загибель клітин в процесі атрофії спостерігається і в корі надниркових залоз при дії глюкокортикоїдів або при атрофії ендокринзалежних тканин.

У багатьох випадках гострої або хронічної ішемічної або токсичної дії загибель клітин відбувається шляхом апоптозу. Така картина спостерігається при інсульті, інфаркті не лише міокарду, але і у нирках, при діабеті, окремих формах нефриту, нейродегенеративних захворюваннях, таких як хвороба Альцгеймера і Паркінсона. У патогенезі токсичних ушкоджень печінки, підшлункової залози і нирок активація апоптозу має важливе значення.

Форми клітинної загибелі, їх відмінності. Існує дві форми загибелі клітини - некроз і апоптоз. Некроз – це патологічний процес, що виражається в місцевій загибелі тканини в живому організмі в результаті її ушкодження або екзо- (зовнішнього) або ендогенного (внутрішнього) фактора. Некроз проявляється в набряканні, денатурації і коагуляції (злипання) цитоплазматичних білків, руйнуванні клітинних органел і усїєї клітини.

Головна відмінність некрозу і апоптозу полягає в тому, що апоптоз - це програмована загибель клітини, а некроз - патологічний процес, що запускається у відповідь на яку-небудь ушкоджуючу дію (інфекцію, хімічна дія, опромінення, недостатнє кровопостачання і ін.).

В процесі апоптозу в клітині задіяні складні молекулярні каскади, в результаті реалізації яких відбувається зморщування цитоплазматичної мембрани, зменшення об'єму клітини, розриви ниток ядерної ДНК, конденсація хроматину по периферії ядра, подальший розпад ядра на частини, фрагментація клітин на везикули (бульбашки) з внутрішньоклітинним вмістом — апоптотичні тільця, які захоплюються сусідніми клітинами, можуть і фагоцитами, як у разі некрозу. Викиду клітинного вмісту не відбувається, запалення не виникає. При некрозі, навпаки, відбувається вихід лізосомальних ферментів з лізосом, які і переварюють вміст клітини, клітина набрякає і лопається. Вміст клітини викидається в позаклітинне середовище, де поглинається фагоцитами, розвивається запалення.

Існують і інші форми програмованої загибелі, н., аутофагія. Процес аутофагії полягає в тому, що органели з'єднуються з лізосомами, де перетравлюються лізосомальними ферментами. Потім залишки клітини поглинають макрофаги. Взаємозв'язок апоптозу і

аутофагії :

а) - кінетична модель балансу апоптозу і аутофагії. Одно з летальних дій активує в клітині програму і клітина вирішує «померти». Якщо вистачає апоптотичних ефекторів (молекул, задіяних в процесі апоптозу), то апоптоз є єдиною відповіддю більшості клітин на летальну дію. Пригнічення апоптотичних ефекторів запускає альтернативний шлях – аутофагію;

б) - інгібіторна модель. Коли летальна дія активує BAX/BAK- залежний мітохондріальний внемембранний шлях (BAX/BAK- dependent mitochondrial outer - membrane permeabilization pathway) запускається апоптоз. BAX/BAK, так само як і каспази, є активним інгібітором BCL2/BCL - XL. що полегшує аутофагію. Активний апоптоз пригнічує аутофагію.

Механізми апоптозу. Механізми апоптозу складні і різноманітні, є складним молекулярним каскадом, вивченням якого займається багато хто і багато лабораторій по всьому світу. Безперечно важливість цих досліджень в аспекті онкології і геронтології доведена успіхами терапії онкологічних захворювань індукторами апоптозу ракових клітин.

Перший етап апоптозу. З чого ж розпочинається цей складний процес? З того, що клітина отримує "наказ померти", її загибель потрібна для подальшої життєдіяльності організму. Це відбувається за допомогою сигналів з позаклітинного середовища, які клітина сприймає за допомогою свого рецепторного апарату. Іноді сигналом для початку апоптозу може бути і відсутність необхідного сигналу.

В результаті контакту сигнальних молекул із зовнішньою частиною білку-рецептора цей рецептор зазнає структурні зміни. Структурна перебудова захоплює і внутрішньоклітинну частину молекули рецептора. Вона може або мати певну ферментативну активність сама, або бути тісно пов'язана з деякими клітинними ферментами. Зміна активності рецепторної молекули призводить до активації ферменту. Часто йдеться про зміну концентрації іонів кальцію, а також деяких відносно дрібних фосфоровмісних органічних сполук, що відносяться до класу нуклеотидів.

Активні з'єднання з'являються і в результаті гідролізу певних ліпідів клітинної мембрани. У свою чергу, усе це веде до приєднання або від'єднання залишків фосфату від молекул білкових регуляторів (фосфорилювання), здатних впливати на генетичний апарат клітини. Фосфорилювання і дефосфорилювання (відщеплення залишку фосфорної кислоти), а також деякі інші біохімічні модифікації міняють активність цих регуляторів.

Рецептори, що сприймають «летальний сигнал».

Відомі два структурно гомологічних рецептора TNF, p55 і p75 (TNF - RI і TNF - RII, відповідно), що відносяться до трансмембранних білків 1 типу.

Окрім цього задіяні «рецептори смерті» CD95. Рецептори CD95 і рецептори TNF належать до суперродини рецепторів, що мають гомологію в екстраклітинних доменах. Родина включає також рецептор чинника росту нервів, В-клітинний антиген CD40, маркер активації Т-лімфоцитів CD27 і деякі гомологічні білки ссавців і вірусів.

CD95 і TNF-R1 мають додаткову гомологічну послідовність у внутрішньоклітинній частині молекул. Це трансдукції цитотоксичного (що ушкоджує клітину) сигналу. Цитоплазматичний С-кінець CD95 містить також "домен порятунку", видалення якого посилює цитотоксичну активність рецептора.

TNF і ліганд CD95 (CD95-L) є трансмембранними білками другого типу з позаклітинним С-кінцевим, внутрішньоклітинним N-кінцевим і одним трансмембранним елементами, але вони можуть функціонувати і в розчинній, "спущеній" з мембрани формі. І CD95-L, і TNF зв'язуються з тим, що відповідає рецепторами у вигляді тримера, "зшивають" 3 молекули рецептора, що активує його для передачі проапоптотичного сигналу. Інтенсивні дослідження сигнальних механізмів апоптозу, що індукується антитілами до CD95/CD95, - L і TNF, привели

до значного прогресу в двох напрямках - ідентифікація білків, що взаємодіють з CD95 і TNF, - R1, і з'ясування участі в процесі вторинного месенджера цераміду.

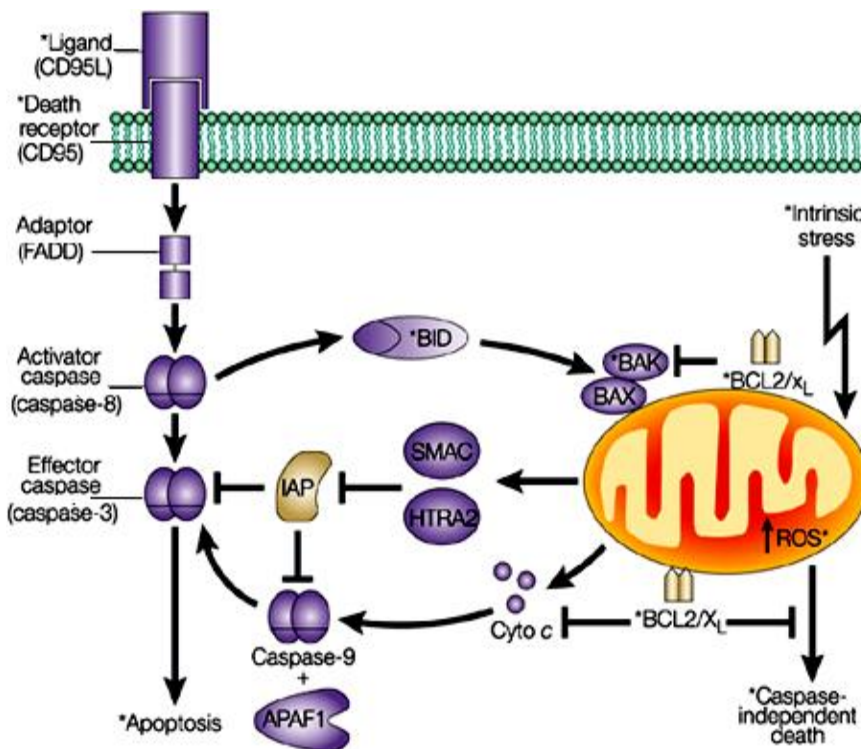


Рис. 9.13. Рецептори сприйняття і передачі летального сигналу.

«Домен смерті» TNF-R1 взаємодіє також з серин/треоніною протеїнкіназою і фосфорилує цим ферментом. 30 С-кінцевих аміно-кислотних залишків інгібують зв'язування рецептора з протеїнкіназою. Роль цих подій в передачі цитотоксичного сигналу незрозуміла. Нещодавно описана тирозинова фосфатаза FAP-1, що взаємодіє з 15 С-кінцевими амінокислотами CD95, "доменом порятунку".

Гіперекспресія FAP-1 пригнічує апоптоз, який опосередкований CD95.

Описані білки беруть участь, мабуть, в початкових етапах передачі сигналу. Інша група даних свідчить про те, що і CD95 - L або антитіла до CD95, і TNF активують сфінгомеліновий шлях передачі. Пізні етапи клітинної загибелі, що індукуються через CD95 і TNF, - R1, такі ж, як при класичному апоптозі. Загибель клітин може бути відвернена cmtA, що вказує на участь ICE-подібних протеаз. Vc1-2 пригнічує апоптоз, індукований через CD95 і TNF - R1, принаймні на деяких клітинних лініях.

Участь FAS (CD95). Цей шлях передачі летального сигналу схематично можна зображувати таким чином: індуктори - рецептори - адаптери - каспази першого ешелону – регулятори - каспази другого ешелону. Так, рецептор, Fas, взаємодіючи з відповідним лігандом (лігандом FasL), трансмембранним білком Т-кілера, активується і запускає програму смерті клітини, інфікованої вірусом. Тим же шляхом при взаємодії з лігандом FasL на поверхні Th1-лімфоцитів або з антитілом до Fas-рецептору гинуть ті клітини, що стали непотрібними організму, який одужав - лімфоцити, продуценти антитіл, Fas-, що несуть, рецептор, FasL-ліганд, що відноситься до численного родини чинника некрозу пухлин TNF. Це родина гомотримерних лігандів (біологічно активних речовин (білків), частинок), що складаються з 3 однакових доменів (окрім FasL і TNFa, включає також TNFb (лімфотоксин).

Fas - член родини рецепторів TNF. Як говорилося вище, усі вони представлені трансмембранними білками, які позаклітинними ділянками взаємодіють з тримерами лігандів-індукторів. Взаємодія рецептора і ліганда призводить до утворення кластерів рецепторних молекул і зв'язування їх внутрішньоклітинних ділянок з адаптерами. Адаптер, зв'язавшись з рецептором, вступає у взаємодію з ефекторами, поки ще неактивними попередниками протеаз з родини каспаз першого ешелону (каспази, що ініціюють). Взаємодія адаптера з рецептором і ефектором здійснюється через гомофільні білок-білкові взаємодії невеликих доменів: DD(death domain - домен смерті), PEP(death - effector domain - домен ефектора смерті), CARD (домен активації і рекрутування каспази). Усі вони мають схожу структуру, містять по шість α -спіральних ділянок. Домени DD (домен смерті) беруть участь у взаємодії рецептора Fas з адаптером FADD (Fas - associated DD - protein). Домени DED беруть

участь у взаємодії адаптера FADD з прокаспазами 8 і 10.

Найдетальніше охарактеризована прокаспаза-8, що рекрутується рецептором Fas через адаптер FADD. Утворюються агрегати FasL-Fas-FADD-прокаспаза-8.

Подібні агрегати, в яких відбувається активація каспаз, названі **апоптосомами, апоптозними шаперонами, або сигнальними комплексами, що індукують смерть.**

Прокаспази мають незначну протеолітичну активність, 1-2% активності зрілої каспази. Будучи в мономерній формі, прокаспази, концентрація яких в клітині нікчемна, знаходяться в латентному стані. Передбачається, що просторове зближення молекул прокаспаз при їх агрегації веде до утворення активних каспаз через механізм протеолітичного само- і перехресного розщеплювання (ауто- або транс-процесінга). В результаті від прокаспази (молекулярна маса 30-50 кДа) відділяється регуляторний N-кінцевий домен (продомен), а частина молекули, що залишилася, розділяється на велику (~20 кДа) і малу (~10 кДа) субодиниці. Потім відбувається асоціація великої і малої субодиниць. Два гетеродимера утворюють тетрамер з двома каталітичними ділянками, що діють незалежно один від одного. Таким чином прокаспаза-8 активується і вивільняється в цитоплазму у вигляді каспази-8. Існують інші шляхи активації каспази-8 - за участю рецепторів TNFR1 і DR3.

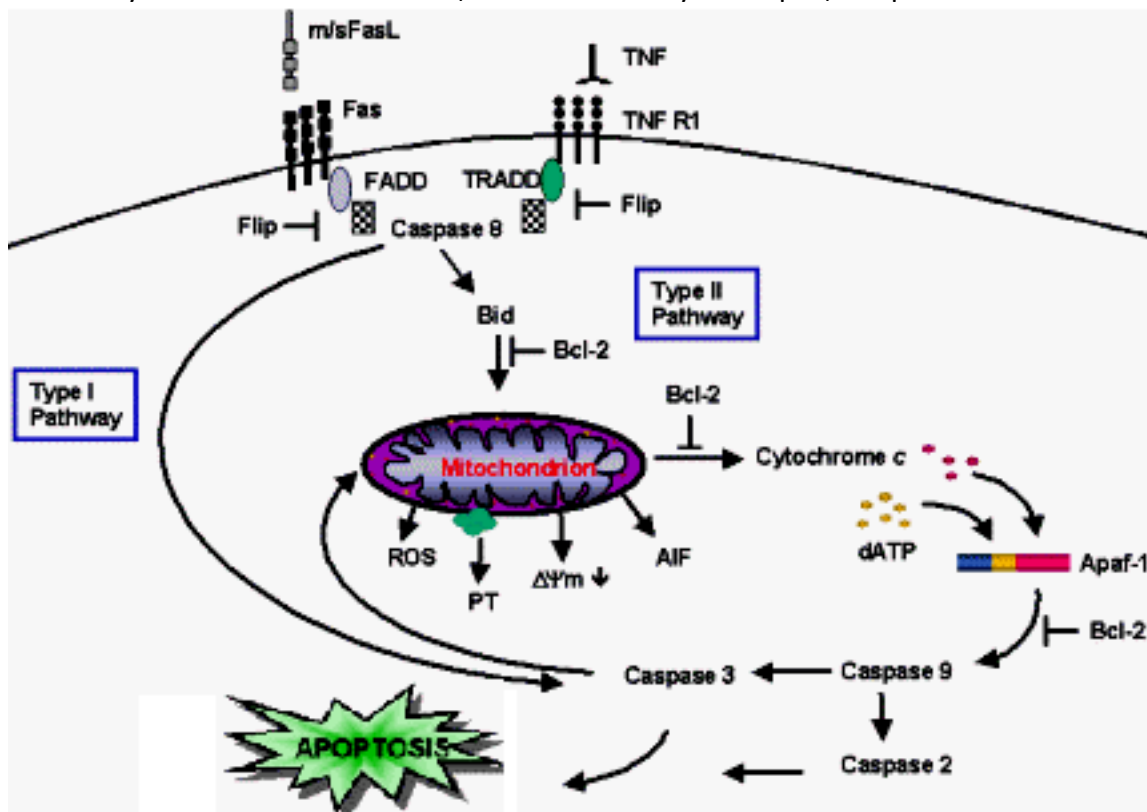


Рис.9.14. Шляхи апоптозу: тип I і тип II.

На етапі активації каспаз першого ешелону життя клітини ще можна зберегти. Існують регулятори, які блокують або, навпаки, посилюють руйнівну дію каспаз першого ешелону. До них відносяться білки Bcl-2 (інгібітори апоптозу: A1, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-XL, Bcl-1, Mcl-1 і NR13) і Bax (промотори апоптозу: Bad, Bak, Bax, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim, Hrk, Mtd). Ці білки еволюційно консервативні: гомолог Bcl-2 виявлений навіть у губок, у яких апоптоз потрібний для морфогенезу. Каспаза-8 активує каспазу другого ешелону (ефекторну каспазу): шляхом протеолізу з прокаспази-3 утворюється каспаза-3, після чого процес, запущений програмою смерті, стає безповоротним. Каспаза-3 здатна надалі до самостійної активації (автокаталізу або автопроцесінгу), активує ряд інших протеаз родини каспаз, активує чинник фрагментації ДНК, веде до безповоротного розпаду ДНК на нуклеосомальні фрагменти. Так запускається каскад протеолітичних ферментів, що здійснюють апоптоз.

Каспази. Каспази – родина еволюційно консервативних серінових протеаз, які специфічно розщеплюють білки після залишків аспарагінової кислоти.

На основі структурної гомології каспази підрозділяються на підродини:

- каспази-1 (каспази 1, 4, 5);
- каспази-2 (каспаза- 2);
- каспази-3 (каспази 3, 6-10).

Цистеїнові протеази, мабуть, також беруть участь в програмованій клітинній загибелі у рослин. Проте апоптоз можливий і без участі каспаз: надсинтез білків-промоторів апоптозу BAX і BAK індукує загибель у присутності інгібіторів каспаз.

В результаті дії каспаз відбувається:

- активація прокаспаз з утворенням каспаз;

- розщеплювання антиапоптозних білків родини Bc1-2. Піддається протеолізу інгібітор ДНКази, відповідальний за фрагментацію ДНК. У нормальних клітинах апоптозна ДНКаза CAD (caspase - activated DNase) утворює неактивний комплекс з інгібітором CAD, ICAD. При апоптозі інгібітор ICAD за участю каспаз 3 або 7 інактивується, і вільна CAD, викликаючи міжнуклеосомальні розриви хроматину, веде до утворення фрагментів ДНК з молекулярною масою, кратній молекулярній масі ДНК в нуклеосомних частках - 180-200 пар нуклеотидів.

Апоптоз можливий і без фрагментації ДНК. Виявлений ядерний білок Acinus (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus), з якого при комбінованій дії каспази-3 (протеоліз при Asp 1093) і неідентифікованої протеази (протеоліз при Ser 987) утворюється фрагмент Ser 987 - Asp 1093. Цей фрагмент у присутності додаткових неядерних чинників викликає апоптотичну конденсацію хроматину і фрагментацію ядра (каріорексис) без фрагментації ДНК; гідроліз білків ламінів що армують (зміцнюють) ядерну мембрану. Це веде до конденсації хроматину; руйнування білків, що беруть участь в регуляції цитоскелета; інактивація і порушення регуляції білків, що беруть участь в репарації ДНК, сплайсингу мРНК, реплікації ДНК.

Мішенню каспаз є полі(ADP- рибозо) полімераза(PARP). Цей фермент бере участь в репарації ДНК, каталізуючи полі(ADP- рибозилірування) білків, пов'язаних з ДНК. Донором ADP- рибози є NAD⁺. Активність PARP зростає в 500 разів і більше при зв'язуванні з ділянками розриву ДНК. Апоптична загибель клітини супроводжується розщеплюванням PARP каспазами. Надмірна активація PARP при масованих розривах ДНК, сильно знижуючи зміст внутрішньоклітинного NAD⁺. веде до пригнічення гліколізу і мітохондріального дихання і викликає загибель клітини по варіанту некрозу.

У клітинах, що піддалися дії індуктора апоптозу, різко знижується мембранний потенціал ($\Delta\psi$) мітохондрій. Падіння $\Delta\psi$ обумовлене збільшенням проникності внутрішньої мембрани мітохондрій внаслідок утворення велетенських пор. Різноманітні чинники викликають розкриття пор. До них відносяться виснаження клітин відновленим глутатіоном, NAD (P) H, ATP і ADP, утворення активних форм кисню, відокремлення окислювального фосфорилування протонофорними з'єднаннями, збільшення змісту Ca²⁺ в цитоплазмі. Утворення пір в мітохондріях можна викликати церамідом, NO, каспазами, амфіпатичними пептидами, жирними кислотами. Пори мають діаметр 2,9 нм, що дозволяє перетинати мембрану речовинам з молекулярною масою 1,5 кДа і нижче. Наслідком розкриття пори є набрякання мітохондріального матриксу, розрив зовнішньої мембрани мітохондрій і вивільнення розчинних білків міжмембранного простору. Серед цих білків - ряд апоптогенних чинників: цитохром 3, прокаспазы 2, 3 і 9, білок AIF (apoptosis inducing factor), флавопротеїн з молекулярною масою 57 кДа. Утворення велетенських пір не є єдиним механізмом виходу міжмембранних білків мітохондрій в цитоплазму. Передбачається, що розрив зовнішньої мембрани мітохондрій може бути викликаний гіперполяризацією (перехід заряду в негативну область) внутрішньої мембрани. Можливий і альтернативний механізм,

без розриву мембрани, - розкриття велетенського білкового каналу в самій зовнішній мембрані, здатного пропускати цитохром і інші білки з міжмембранного простору.

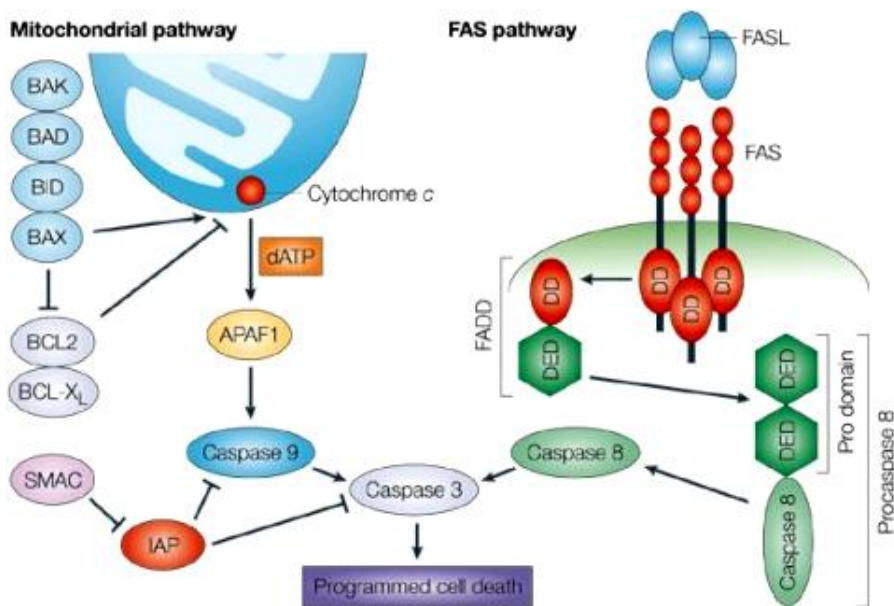


Рис. 9. 15. Мітохондріальний шлях апоптозу.

Цитохром, що вивільняється з мітохондрій разом з цитоплазматичним чинником АРАФ-1 (apoptosis protease activating factor-1) бере участь в активації каспази-9. АРАФ-1 - білок з молекулярною масою 130 кДа, CARD - що містить домен (caspase activation and recruitment domain), утворює

комплекс з прокаспазой-9 у присутності цитохрому і dATP або АТР. З цих субодиниць збираються жорсткі, симетричні структури, на вигляд віяла або пропелера. АРАФ - 1 відіграє роль арматури, на якій відбувається аутокаталітичний процесинг каспази-9. Передбачається, що в результаті залежного від гідролізу dATP (чи АТР) конформаційної зміни АРАФ-1 набуває здатності зв'язувати цитохром С. Зв'язавши цитохром С, АРАФ-1 зазнає подальшу конформаційну зміну, сприяючу його олігомеризації, що відкриває доступ САРД-домена АРАФ-1 для прокаспазы-9, яка теж містить САРД-домен. Так утворюється конструкція, що називається апопсомом, з молекулярною масою $\geq 1,3$ млн. дальтон, у складі якої - не менше 8 субодиниць АРАФ-1. Завдяки гомофільної САРД-САРД-взаємодії з АРАФ-1 в еквімолярному співвідношенні зв'язується прокаспазы-9, а потім прокаспазы-9 зв'язує прокаспазы-3. Просторове зближення молекул прокаспазы-9 на мультимірній арматурі з АРАФ-1 - цитохром-С-комплексом, мабуть, призводить до міжмолекулярного протеолітичного процесингу (модифікації) прокаспазы-9 з утворенням активної каспази-9. Зріла каспаза-9 потім розщеплює і активує прокаспазы-3.

Флавопротеїн АІФ, будучи доданим до ізольованих ядер з клітин HeLa, викликає конденсацію хроматину і фрагментацію ДНК, а при додаванні до ізольованих мітохондрій печінки щурів - вивільнення цитохрому С і каспази-АІФ - є мітохондріальним ефектором загибелі клітин у тварин, що діє незалежно від каспаз. Окрім розглянутих компонентів, при порушенні зовнішньої мембрани мітохондрій з міжмембранного простору виділяється термолабільний чинник, що викликає безповоротне перетворення ксантиндегідрогенази на ксантиноксидазу. Ксантиндегідрогеназа каталізує залежне від NAD^+ окислення ксантину до гіпоксантину і подальше окислення гіпоксантину до сечової кислоти. Ксантиноксидаза каталізує ті ж реакції, але не з NAD^+ , а з O_2 в якості акцептора електронів. При цьому утворюються O_2A , H_2O_2 , а з них - і інші активні форми кисню (АФК), які руйнують мітохондрії і є потужними індукторами апоптозу. Механізми утворення АФК, звичайно, не обмежуються ксантиноксидазною реакцією. Головним джерелом АФК в клітинах є мітохондрії. Різке збільшення АФК відбувається при зростанні мембранного потенціалу в мітохондріях, коли понижено споживання АТР і швидкість дихання лімітується АDP. Цитоплазматична мембрана макрофагів і нейтрофілів містить O_2A - генеруючу $NADPH$ -оксидазу.

Залежно від шляху, по якому здійснюється активація каспаз, розрізняють різні типи клітин. Клітини типу I (зокрема, лінія лімфобластоїдних В-клітин SKW і Т-клітини лінії H9)

піддаються ПКС по шляху, залежному від апоптозних рецепторів плазматичної мембрани без участі мітохондріальних білків. Клітини типу II (н., лінії Т-клітин Jurkat і СЕМ) гинуть шляхом апоптозу, залежного від мітохондріального цитохрому С. Загибель клітин, викликана хіміотерапевтичними з'єднаннями, УФ- або γ -опроміненням, мабуть, безпосередньо пов'язана з апоптозною функцією мітохондрій.

Деякі клітини, н., клітини ембріональної нервової системи, включають механізми апоптозу, якщо вони відчувають дефіцит апоптозопригнічуючих сигналів (називаються також чинниками виживання) від інших клітин. Фізіологічний сенс процесу - в елімінації надмірних нервових клітин, що конкурують за обмежений фонд чинників виживання. Епітеліальні клітини при відділенні від позаклітинного матриксу, що виробляє чинники виживання, теж приречені на смерть. Чинники виживання зв'язуються відповідними цитоплазматичними рецепторами, активуючи синтез агентів, що пригнічують апоптоз, і блокуючи стимулятори апоптозу. Деякі речовини (н., стероїдні гормони) роблять диференційований ефект на різні типи клітин - запобігають апоптозу одних типів клітин і індукують його у інших. Так, за наявності в позаклітинному матриксі чинників росту PDGF (platelet - derived growth factor - тромбоцитарний чинник росту) або NGF (nerve growth factor - чинник росту нервів) і цитокіна інтерлейкіна-3 (IL-3) проапоптозний білок Bad не активний. Чинники росту, зв'язавшись зі своїм рецептором на плазматичній мембрані, викликають активацію цитозольної протеїнкінази В, що каталізує фосфорилювання Bad по Ser-136. IL-3 теж зв'язується зі своїм рецептором на плазматичній мембрані і активує мітохондріальну cAMP-залежну протеїнкіназу А, що каталізує фосфорилювання Bad по Ser - 112. Будучи фосфорильованим по обох залишках серину, Bad утворює комплекс з білком 14-3-3, розташованим в цитоплазмі. Дефіцит чинників росту і IL - 3 сприймається клітиною як сигнал до апоптозу: відбувається дефосфорилювання Bad, його впровадження в зовнішню мембрану мітохондрій, вихід цитохрому із мітохондрій і подальша активація каспази-9 через APAF- 1-залежний механізм.

У ряді випадків апоптоз реалізується в результаті комбінованої дії двох шляхів - з участю рецепторів плазматичної мембрани і мітохондріального цитохрому С. Так, ушкодження ДНК веде до накопичення в клітині білкового продукту гена p53, який може зупиняти ділення клітин/або індукувати апоптоз.

Білок p53 є чинником транскрипції, що регулює активність ряду генів. Передбачається, що реакція у відповідь на утворення білку p53 залежить від міри порушення клітинного генома. При помірному порушенні генома відбувається зупинка клітинного ділення, здійснюється репарація ДНК, і клітина продовжує своє існування. При надмірному порушенні генома, коли ДНК вже не піддається репарації, включаються рецепторний і цитохром С-залежний апоптозний каскад активації каспаз.

Також існує шлях передачі летального сигналу за участю ендоплазматичного ретикулума (ЕР). У ЕР локалізована прокаспаза-12. Порушення внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостаза додаванням тапсигаргіна або Ca^{2+} -іонофорного антибіотика А23187 веде до апоптозу клітин, викликаного перетворенням прокаспази-12 на каспазу-12. ЕР-залежний апоптоз пов'язаний з хворобою Альцгеймера.

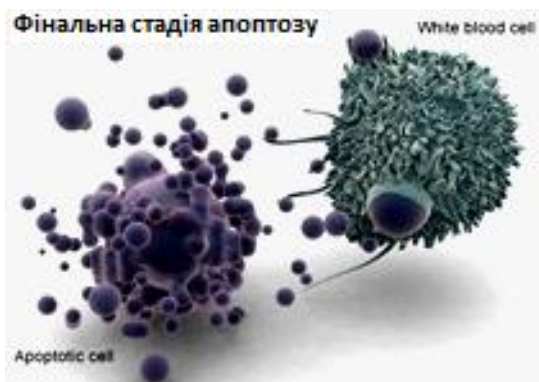
Цитотоксичні лімфоцити, Т-кілери, можуть викликати апоптоз інфікованих клітин за допомогою білку перфорину. Полімеризуючись, перфорин утворює в цитоплазматичній мембрані клітини-мішені трансмембранні канали, по яких всередину клітини надходять TNFb, гранзими (фрагментини) - суміш серинових протеаз. Істотним компонентом цієї суміші є гранзим В – протеолітичний фермент, що перетворює прокаспазу-3 в активну каспазу-3.

Взаємодія клітин з позаклітинним матриксом здійснюється за допомогою інтегринів. Інтегрини - велика родина гетеродимерних мембранних білків, які беруть участь в адгезії клітин, зв'язуючи внутрішньоклітинний цитоскелет з лігандами позаклітинного матриксу. Порушення адгезії клітин індукує апоптоз.

Особливу форму апоптозу зазнають еритроцити ссавців. Біогенез еритроцитів з плюрипотентної стовбурової клітини в кістковому мозку включає ряд проміжних етапів. На етапі еритробласту ядро виштовхується з клітини і пожирається макрофагом. Альтернативний варіант: каріорексис (деструкція ядра) з утворення тілець Жоллі (залишки хроматину) і їх подальший розпад і лізис усередині клітини. Без'ядерна клітина, що називається ретикулоцитом, надалі втрачає мітохондрії і рибосоми і перетворюється на еритроцит. Втрату ядра еритробластом можна розглядати як особливу форму ядерного апоптозу. З'ясування його механізму дозволило б застосувати його для знешкодження пухлинних клітин.

Механізм апоптозу. Другий етап активація генів, а потім кінець.

На другому етапі запрограмованої смерті клітин внутрішньоклітинні регулятори, отримавши важливі інструкції, вносять поправки в роботу окремих генів. Робота ця полягає в утворенні РНК, а потім і білків. Таким чином, в результаті спрацьовування генетичної



програми, спочатку запущеної сигналом з рецептора, відбувається зміна набору внутрішньоклітинних РНК і білків. Кінець кінцем з'являються або активуються ферменти-протеази і нуклеази, які розщеплюють вміст клітини, який потім поглинається фагоцитами.

Рис. 9.16. Фінальна стадія апоптозу.

Апоптоз і старіння.

Відомий американський вчений Л.Хейфлик уперше довів, що природна тривалість життя людини обумовлена числом мітозів, яке можуть вчинити клітини цього організму. Він брав шматочки шкіри від ембріона, новонародженої і дорослої людини, розбивав їх на окремі клітини і культивував в спеціальному поживному середовищі. Виявилось, що клітини ембріона можуть вчинити близько 50 ділень, а потім в них спостерігаються усі ознаки апоптотичної смерті. У дорослої людини клітини можуть дати не 50 а значно менше ділень, залежно від віку обстежуваного пацієнта. Згодом було показано, що механізм старечого апоптозу запускається і знаходиться в ядрі. Нині для пояснення молекулярно-генетичних механізмів старіння організму запропоновано три гіпотези.

Перша гіпотеза розвинена в працях професора Ж.Медведева, а також Л. Орджелом. Ці дослідники вважають, що старіння це процес накопичення помилок в процесах транскрипції і трансляції і виникненні ферментів з дефектним функціонуванням і послабленням репарації.

Згідно з другою гіпотезою, запропонованою також Ж.Медведевим 0,4% інформації, що міститься в ДНК клітинного ядра, використовується клітиною постійно упродовж її життя. Крім того, багато генів в молекулі ДНК повторюються, роблячи генетичну інформацію у високому ступені надмірною. Ж.Медведев припустив, що послідовності, що повторюються, зазвичай репресовані, але у разі значного ушкодження активного гена вони замінюються одним з ідентичних резервних генів. Надмірність ДНК може служити гарантією проти внутрішньо властивої схильності системи випадковим молекулярним ушкодженням. Проте поступово увесь резерв генів буде вичерпаний і тоді починають виникати зміни, які приведуть до загибелі клітини. Таким чином, чим більше надмірної ДНК, тим більша тривалість життя цього виду.

Третя гіпотеза постулювала, що вікові зміни є продовженням нормальних генетичних сигналів, що регулюють розвиток тварини від моменту його зачаття до статевого дозрівання. Можливо навіть є «гени старіння» які уповільнюють або навіть закривають біохімічні шляхи один за іншим і ведуть до передбачуваних вікових змін. При цьому знижуються функціональні можливості клітин. Старіння організму - це по суті старіння і апоптоз ключових

клітин, загибель яких здатна вплинути на фізіологію усього організму.

В процесі старіння відбувається постійне зменшення числа клітин, що не діляться, наприклад нейронів. Згідно однієї з теорій старіння, в організмі відбувається накопичення «поломок» - поломки ДНК, накопичення токсичних продуктів і так далі. В результаті цього клітини гинуть. У 1982 році С.Р.Уманський запропонував гіпотезу, згідно якої старіння може бути наслідком плейотропного ефекту групи генів, що програмовані на загибель клітини (апоптоз). З одного боку, ця програма потрібна для розвитку і функціонування багатоклітинного організму, в той же час вона робить неминучою загибель клітин у дорослому організмі. У такому разі старіння є наслідком поступового спаду функціональної активності клітин. Досі йдуть дискусії про роль апоптозу в процесі старіння. Частина дослідників на чолі з академіком В.П.Скулачевим є прибічниками теорії клітинного апоптозу. Старіння – результат того, що в організмі гине більше клітин, ніж народжується, а відмираючи функціональні клітини замінюються сполучною тканиною. Суть його роботи – пошук методів протидії руйнуванню клітинних структур вільними радикалами. На думку вченого, старість – це хвороба, яку можна і треба лікувати - вимкнути механізм, що скорочує наше життя.

Інтенсивні дослідження механізмів клітинної проліферації і апоптозу тривають. В основному це пов'язано з онкологією - індукція апоптозу ракових клітин. Нині йде розробка методів пригнічення апоптозу залежного від віку в постмітотичних і слабoproліферуючих тканинах.

На першому місці серед причин смерті у більшості країн стоять серцево-судинні захворювання. Серцева недостатність, що є кінцевим етапом серцево-судинних захворювань, призводить до недостатнього кровопостачання органів, патологічних змін в них, тобто зрештою, до прискорення процесу зносу організму – до прискорення процесу старіння. При ішемії міокарду і його подальшої реперфузії кардіоміоцити гинуть апоптозом. Китайські учені Li X., Wan J., Yang J. та ін. провели дослідження, в результаті яких було визначено, що селективні інгібітори цитохром Р450-омега гідроксилази, які індукують апоптоз кардіоміоцитів, знижують загибель кардіоміоцитів після ішемії і подальшої реперфузії. Подібні дослідження були проведені відносно DIPS (4.4'-диізотиоцианостильбен-2,2'-дисульфонова кислота), який знижує Staurosporine-індукований апоптоз кардіоміоцитів, що проходить через PI3K/Akt, - сигнальний шлях апоптозу за допомогою активації NO-синтетази і пригнічення транслокації BAX.

Проводяться дослідження на клітинах ендотелію в умовах гіпоксії і гіперхолістеринемії, нейронах, хондроцитах та ін. в умовах, близьких до вікових змін в людському організмі. Інші дослідження присвячені можливості індукції апоптозу клітин, які не здатні до репарації, на ранніх стадіях розвитку спільно з компенсаторною проліферацією для уповільнення подальшого старіння тканин. Перспективи цих досліджень - продовження активних років, віку і поліпшення якості життя.

Онкогенетика. Генетичні механізми канцерогенезу

Загальна характеристика генів, що беруть участь у канцерогенезі: вірусні онкогени, протоонкогени, гени-супресори пухлин, гени-мутатори. Канцерогенні фактори.

Онкогенетика (онко+генетика) - розділ онкології, який вивчає роль генетичних чинників в етіології і патогенезі пухлин. Одночасно онкогенетика є також розділом медичної генетики і молекулярної біології.

За статистикою у світі щорічно виявляють більше 10 млн. випадків захворювань раком (легенів, шлунку, грудей, прямої кишки, шийки матки), а в 2020 очікується близько 16 млн. захворювань. Кожен п'ятий житель розвинених країн помирає від онкологічних захворювань (від греч. «онкос» – пухлина). Тому дуже важливий інтерес фахівців-онкологів, медиків, та і

кожної людини до встановлення першопричин канцерогенезу і реальних можливостей лікування онкологічних захворювань. Дослідження змін у функціонуванні клітин, що виникають при злоякісному переродженні, мають фундаментальне теоретичне і практичне значення.

Число клітин в кожній тканині, також як і об'єм тканини приблизно постійні. Природний спад клітин поповнюється з молодих відділів тканини, які містять низько спеціалізовані клітини, що діляться. Темп заповнення втрачених клітин контролюється ростовими чинниками. Якщо баланс спад-поповнення з деяких причин порушується на користь поповнення, виникає надлишкова маса клітин і в місці порушення балансу утворюється пухлина. Пухлина може бути доброякісною і злоякісною. Доброякісною пухлина називається, якщо вона не виходить за межі своєї тканини і не вростає у сусідні тканини.

Головною ознакою злоякісної пухлини є її вихід за межі території даної тканини. Якщо пухлина вростає в прилежну тканину, відбувається інвазія пухлинних клітин - перша ознака злоякісної пухлини. Якщо пухлинні клітини відриваються від основного вогнища, розносяться лімфою або кров'ю по організму, осідають в інших, віддалених органах (найчастіше в лімфатичних вузлах, печінці, легенях), і утворюють в цих місцях вогнища пухлинного зростання, відбувається метастазування - поширення пухлинного процесу по організму (Рис. 10.1).

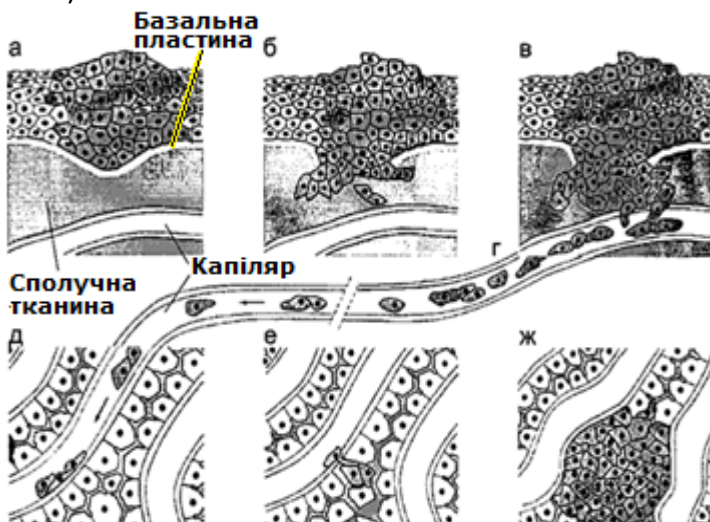


Рис. 10.1. Схема метастазування пухлини: а - доброякісна пухлина в епітелії (н., легенів). Пухлинні клітини не перетинають базальну пластину (ламину), яка відділяє епітелій від сполучної тканини, б - розрив базальної пластинки і інвазія пухлинних клітин в сполучну тканину в - попадання пухлинних клітин у кровеносний капіляр, г - міграція клітин по кровеносних судинах (виживає і утворює метастази менш однієї клітини з кожної тисячі пухлинних клітин), д - клітини, що вижили, прилипають до стінки кровеносної судини (н., печінки); е, ж - перехід пухлинної клітини з судини в тканину органу і утворення метастаза.

Невід'ємними властивостями злоякісної пухлини є автономність розвитку і безсмертя її клітин. Нормальні клітини смертні, їх життєвий цикл включає апоптоз. Клітини пухлини не знають межі для розмноження. Дуже важливою і обов'язковою ознакою злоякісної пухлини є її моноклональність - розвиток з однієї генетично зміненої клітини. У цьому сенсі вона є клоном - потомство генетично однорідних клітин, у яких поступово зникають ознаки початкової тканини (але не до кінця).

Причини виникнення пухлин. Добре відомі чинники, які можуть індукувати пухлини. Проте, основна частина пухлин виникає спонтанно.

1. Канцерогенні речовини дуже різноманітні - від таких простих, як чотирихлористий вуглець (CCl₄) до дуже складних поліциклічних гетероциклічних з'єднань як метихолантрен або бензантрацен. Найчастіше вони викликають схожі біологічні ефекти - стимулюють розмноження клітин-попередниць пухлини.

До канцерогенних речовин відносять речовини, які сприяють зростанню виниклих поодиноких пухлинних клітин, - це так звані промотори канцерогенезу. Ці речовини є надзвичайно важливим компонентом хімічного канцерогенезу, оскільки поодинокі пухлинні клітини, знаходячись в оточенні нормальної тканини, як правило, не в змозі здолати її стримуючого впливу і роками здатні зберігатися в латентному стані, не проявляючись у вигляді пухлини. Промотори знімають цей вплив, що зовні виглядає як сильний

канцерогенний ефект.

Канцерогенні речовини (включаючи промотори) є причиною багатьох пухлин людини, н., кам'яновугільний дьоготь викликає так званий «рак сажотрусів», анілін викликає у працівників анілінової промисловості рак сечового, пухиря, куріння - рак легенів.

2. Віруси, які спричиняють пухлини (пухлиноутворюючі). Це можуть бути великі віруси або РНК-вмісні ДНК-вмісні ретровіруси. Усі вони мають унікальну здатність до інтеграції з геномом клітини-хазяїна. Ця дивна особливість пухлинних вірусів була передбачена вірусологом Л. А. Зильбером.

Перший пухлиноутворюючий вірус був відкритий в 1910 році Ф.П. Раусом у курей. Інфекції ним викликали саркому, тому його назвали вірусом саркоми Раусу. Це РНК-вмісний ретровірус, по матриці РНК синтезується ДНК за допомогою зворотної транскриптази, яка вбудовується в геном клітини-хазяїна.

3. Променевий канцерогенез. Це одна з форм канцерогенезу, яка супроводжувала перших радіологів, що працювали з радієм і променями Рентгена без захисту від опромінення. Звичайно це був рак шкіри. Найбільш частим при загальному опроміненні організму є лейкоз, тобто різні форми пухлин кровотворної системи.

4. Роль генотипу. Ще одна важлива причина раку - генетична. У мишей шляхом відбору отримані чисті лінії з 100% вірогідністю виникнення певних форм пухлин - лейкозу, раку молочних залоз і раку легенів. В перших двох випадках має місце поєднання генотипу тварин і вірусу, а у разі спадкового раку легенів йдеться про поєднання канцерогенної дії і генома тварини. У людини чисто генетично обумовлено формування дитячої пухлини сітківки ока (ретинобластоми), що виникає у дитини, якщо мутації є хоч би у одного з батьків.

Онкогени. На користь генетичної природи злаякісності свідчили два факти:

1. Кореляції між існуванням успадкованих пухлин і наявністю специфічних хромосомних транслокацій в клітинах пухлини.

2. Стабільність злаякісних властивостей в трансформованих клітинах і їх передача з одного клітинного покоління. При вивченні термочутливих мутацій у вірусів на початку 70-х років були отримані мутанти вірусу саркоми, які трансформували нормальні клітини в ракові тільки при певній температурі. При певній температурі відбувається мутація тільки одного гена, і цього вистачає для того, щоб викликати пухлинну трансформацію. Інактивація цієї мутації при іншій температурі повертала клітину в нормальний стан. Таким чином, у вірусі саркоми знаходиться один ген, що викликає і підтримує злаякісність - онкоген. З вірусу саркоми курки був виділений перший онкоген - src (рис. 10.1, 10.2).

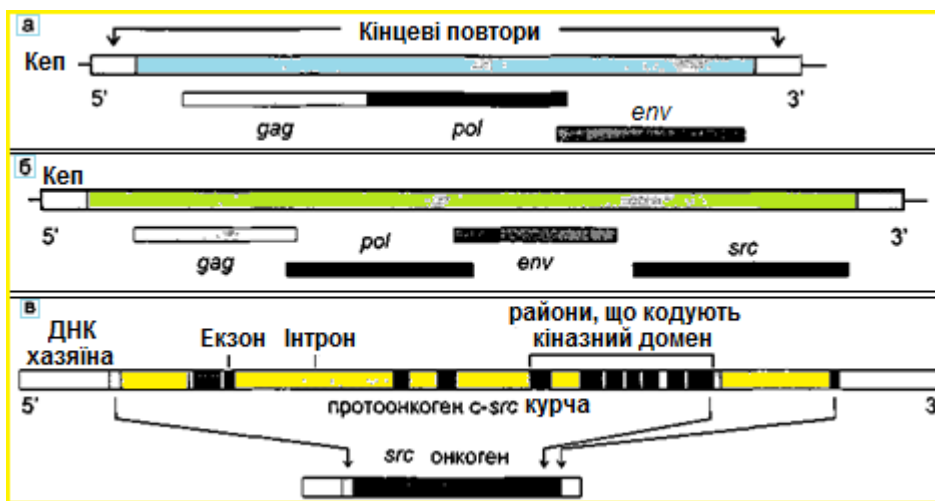


Рис. 10.2. Структура вірусів лейкемії миші (а), саркоми Раусу (б) і онкогена src (в); gag - ген, що кодує білок капсиди вірусу; pol - ген зворотної транскриптази; env - ген, що кодує глікопротеїнову оболонку вірусу; src - онкоген. (Alberts et al., 1994).

LTR (довгі кінцеві повтори) вірусів містять багато з

регуляторних сигналів транскрипції: сайти ініціації транскрипції, поліаденілування (рис. 10.2,10.3). Було показано, що штучне введення гена src в генетичний апарат клітини

трансформує її без вірусу. Після цього були відкриті вірусні онкогени: *myc*, *ras*, *abl* і інші. Стало відомо, що віруси викликають пухлини не самі, а тому, що вносять онкоген до генетичного апарату клітини і закріплюють його там. Якщо видалити онкоген з НК вірусу, то він, здатний розмножуватися і інтегруватися в геном клітини, але не зможе викликати формування злоякісних пухлин.

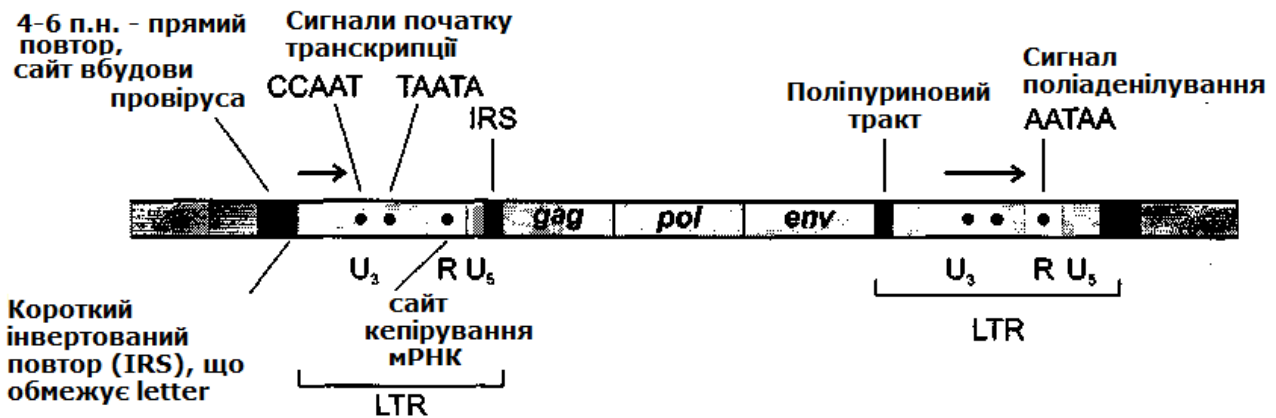
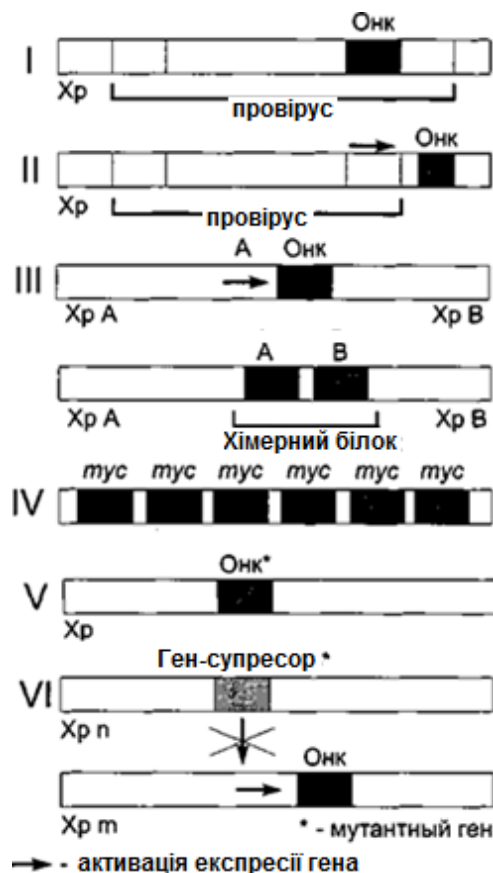


Рис. 10.3. Особливості організації довгих кінцевих повторів (LTR) у ретровірусів (Russell, 1998).

Геноми нормальних клітин хребетних містять схожі, але не повністю ідентичні послідовності. Тому їх називають по іншому: *v-src* – вірусний (онкоген), *c-src* – клітинний (протоонкоген). На рис. 10.3. показана схема організації онкогена *src* і протоонкогена *c-src*. Пізніше було встановлено, що в усіх нормальних клітинах є гени, дуже близькі по структурі до

відомих вірусних онкогенів.



На сьогодні «раковий геном» вже значною мірою розкритий. В той же час, нові відомості, отримані в ході глобального дослідження ДНК у черговий раз змусили онкогенетиків переглянути деякі уявлення відносно молекулярно-генетичних механізмів канцерогенезу. В ході останніх досліджень генома було встановлено, що мутації, які викликають різноманітні форми раку, куди численніші, ніж вважалося раніше.

Рис. 10.4. Походження і активація онкогенів.

I - вірусний онкоген: частина вірусного генома, інтегрованого в хромосому хазяїна (провірус). РНК - онкогени ретровірусів: *src*, *myc*, *ras*, *erb*. Хр - хромосома хазяїна.

II - активація клітинного онкогена вбудованим провірусом (онкоген *Int-1* при раку молочних залоз мишей).

III - Хромосомні транслокації - розриви і возз'єднання фрагментів різних хромосом в єдину нову хромосому можуть привести до активації онкогена або утворення нового онкогена. У першому випадку ген, що мовчить, потрапляє під контроль працюючого клітинного гена і активується (ген *myc* при лімфомі Беркитта). У другому випадку в місці розриву-з'єднання утворюється новий химерний ген, що кодує химерний білок гена *bcr*, - *abl* при хронічному мієлолейкозі.

IV - ампліфікація протоонкогена, що веде до пухлинної трансформації (н., ампліфікація гена *myc* при пухлинах нервової системи).

V - мутація протоонкогена - синтез мутанта онкобілка (*c-ras*, при спонтанних і канцерогенних пухлинах).

VI - інактивація або втрата гена супресора пухлинного зростання, що веде до активації онкогена (Абелев, 1997).

Якщо до останнього часу «геном раку» складали приблизно 350 генів, включаючи відповідні мутації в них, то в результаті останніх досліджень було виявлено близько 1000 мутацій. Близько 150 з них були визнані ведучими, які безпосередньо провокують розвиток захворювання.

Протоонкогени знаходяться під контролем інших генів. Мутації протоонкогенів виводять їх з-під дії контролюючих генів і внаслідок чого вони стають автономними (рис. 10.4.). Дія різних канцерогенних чинників призводить до постійної активності протоонкогена. Так, хромосомні транслокації можуть перенести протоонкоген під контроль постійно активного промотора (рис. 10.5).

Антионкогени або супресори пухлин.

С частотою 1 : 20 000 у дітей встановлена ретинобластома - пухлина, сітківки ока, яка виникає з попередників клітин. Відомі дві форми захворювання - спадкове і неспадкове. У разі спадкової форми множинні пухлини зазвичай виникають незалежно в обох очах. При неспадковій формі - тільки одна пухлина виникає в одному оці.

Механізм ретинобластоми (Rb) подвійний: одна мутація спадкова, інша - соматична. У дослідженнях було встановлено, що втрата активності гена Rb викликає різноманітні форми пухлин, і не лише ретинобластоми. Ген Rb був клонований, він займає 180 тис.п.н. ДНК і кодує білок з молекулярною масою 110 кДа. Ген активно функціонує в більшості нормальних клітин тіла, і його продукт діє як одне з головних "гальм" в клітинних діленнях. У кожному циклі білок Rb може бути у фосфорилованому або нефосфорилованому стані. Коли він не фосфорилований, то зв'язується з чинниками транскрипції DP1/E2F, запобігаючи таким чином дії цих чинників в процесі реплікації ДНК (рис. 10.6 а) і в переході від стадії G1 до S.

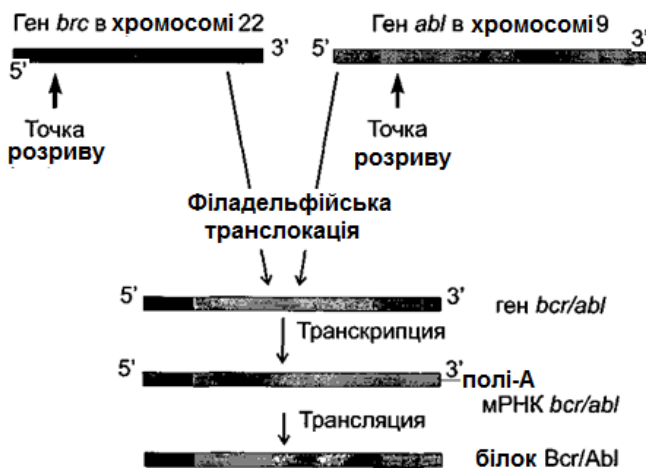


Рис. 10.5. Перетворення протоонкогена *abl* на онкоген у пацієнтів з хронічною мієлогенною лейкемією. В результаті транслокації 22 і 9 хромосом (Філадельфійська хромосома) ген *bcr* з'єднується з геном *abl* тирозинової протеїнкінази, внаслідок чого цей ген функціонує не за своїм розкладом (Alberts et al. 1994).

У випадку якщо білок pRb фосфорилований, він більше не зв'язується з комплексом DP1/E2F. Звільнена молекула E2F зв'язується з регуляторними ділянками генів, що зв'язують цей чинник транскрипції, і включаються гени переходу в S-фазу.

Якщо обидва гени в клітині знаходяться в мутантному стані, білок Rb нефункціональний. В результаті ділення клітин йде значно частіше, ніж це заплановано (рис. 10.6 б).

Деякі онкогенні віруси (н., аденовіруси, вірус SV40) здійснюють онкогенну дію через те, що їх онкогени кодують білки, які утворюють комплекси з Rb-білком, що також запобігає його зв'язуванню з чинником транскрипції E2F (рис. 10.6 в). Інший ген-супресор пухлиноутворення – p53 (p – protein). Дія мутантних алелів цього гена залучена в розвиток приблизно 50% усіх типів пухлин у людини.

Для онкогенної дії клітина має бути гомозиготною по мутантам алелям гена p53. На сьогоднішній час виділено понад 3400 мутацій гена p53. Білок гена p53, здатний зв'язуватися з ДНК і діє як чинник транскрипції (рис. 10.7.).

Білок p21 зв'язується з білками cyclin і cyclin dependent kinase (Cdk), що блокує кіназну активність, необхідну для переходу з G1 в S-фазу (Russell, 1998). Як вже показано, промотори декількох генів зв'язують білок p53, один з яких - WAF1 специфічно активується нормальним

білком p53. У свою чергу, продукт гена WAF1 – це білок з молекулярною масою 21кДа, має назву p21. Коли білок P21 синтезується в надлишку, це блокує перехід клітини з фази G1 в S. Затримка виникає через те, що p21 зв'язується з комплексом Cdk/сус, який блокує кіназну активність, необхідну для активування генів, потрібних для переведення клітини з фази G1 у фазу S.

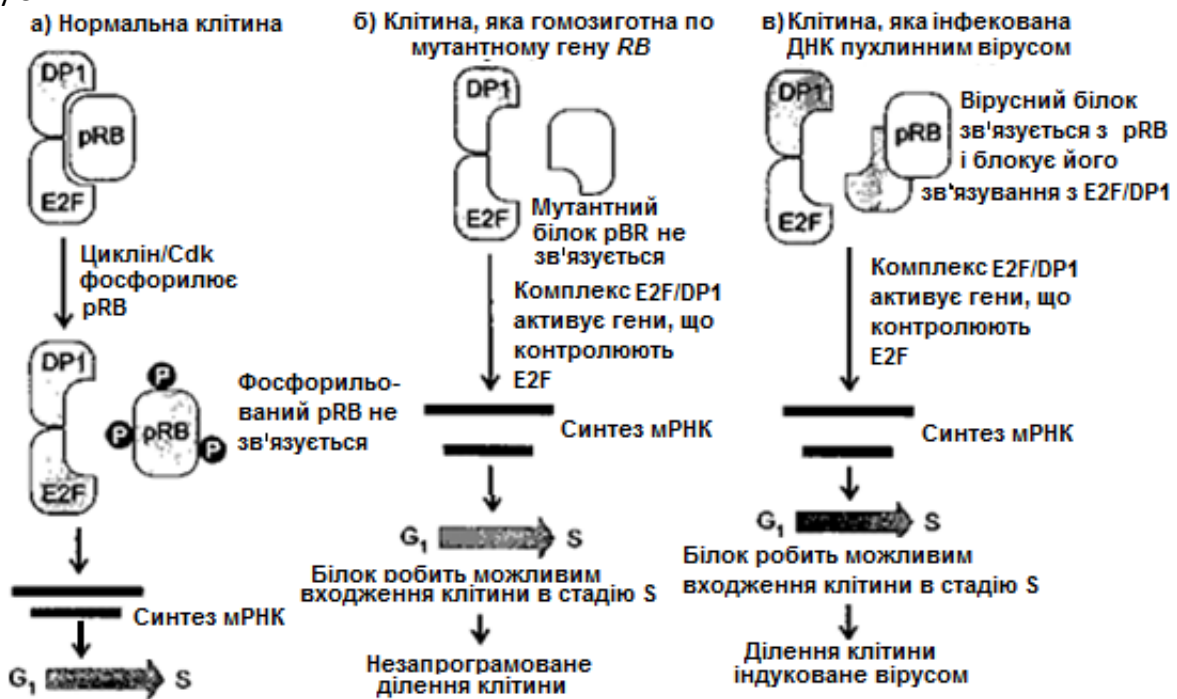
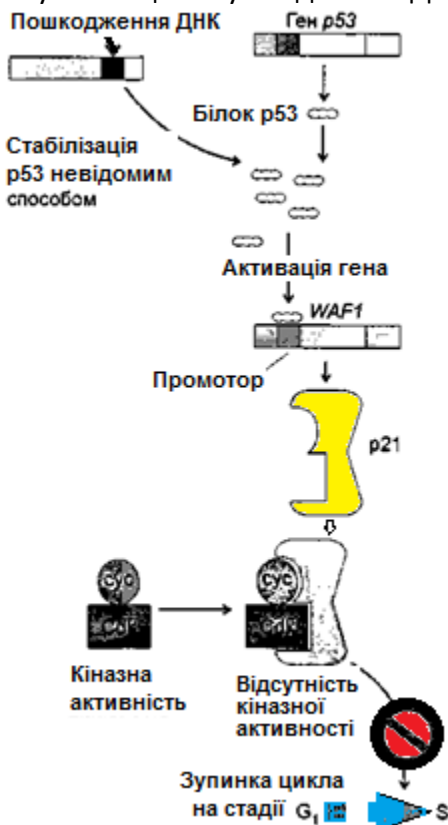


Рис. 10.6. Роль білка Rb в переході клітин з G1-періода в S-період.

У нормальній клітині найпростішим способом викликати каскад генної активності, яка веде до зупинки в G1, є індукція ушкоджень в молекулі ДНК, н., опроміненням клітини. В результаті цього ушкодження ДНК призводять до стабілізації білку p53 і починається каскад подій, зображений на рис. 10.7.



Затримка клітини в G1 дає час індукувати систему репарації ДНК. Якщо розміри ушкоджень ДНК занадто великі і не можуть бути ліквідовані/відновлені, клітинний цикл не відновлюється, а клітина переходить на режим апоптозу. Індукція апоптозу є найважливішою функцією гена p53.

У клітин-гомозигот по мутації гена p53, не активується ген WAF1 і немає білку p21, щоб блокувати активність Cdk, в результаті клітина не затримується у фазі G1, і апоптоз у них не відбувається. Клітина прискорено вступає в S-фазу, хоч і обтяжена генетичними ушкодженнями. Усе це посилює можливість виникнення раку.

Рис. 10.7. Каскад подій, в результаті яких порушення структури ДНК обумовлюють зупинку клітинного циклу у фазі G1. Ушкодження ДНК стабілізують білок p53, який активує ген WAF1, кодує білок p21.

Таблиця 10.1 Деякі зміни протоонкогенів, які характерні для новоутворень людини.

| Прото-онкоген | Функція білку | Зміни | Новоутворення* |
|----------------------------|--|---|--|
| RET (GDNF - R) | рецепторнатирозин кіназа | а) точкові активуючі мутації; б) рекомбінації, що утворюють химерні гени Ret/ptc, які кодують постійно активований рецептор | синдроми множинних ендокринних неоплазій (MEN2a, MEN2b), медулярний і папілярний рак щитовидної залози |
| ERBB1 (EGF - R) | рецепторнатирозин кіназа | ампліфікація і гіперекспресія гена | гліобластоми і інші нейрогенні пухлини |
| ERBB2 (HER2) | рецепторнатирозин кіназа | ампліфікація і/або гіперекспресія гена | рак молочної залози |
| PDGF - Rb | рецепторнатирозин кіназа | хромосомні транслокації, що утворюють химерні гени TEL/PDGF, - Rb, CVE6/PDGF - Rb, активовані рецептори, які постійно кодують | хронічний мієломоноцитарний лейкоз, гострий мієлобластний лейкоз |
| SRC | Нерецепторнатирозинкіназа | мутації в кодоні 531, що відмінюють негативну регуляцію кіназної активності | частина пухлин товстого кишковика на пізніх стадіях |
| K - RAS, N - RAS H - RAS | бере участь у передачі мітогенних сигналів і регуляції морфогенетичних реакцій | мутації в кодонах 12,13,61, що викликають утворення постійно активованою GTP-зв'язаної форми Ras | 60-80% випадків раку підшлункової залози; 25-30% різних значних пухлин і лейкозів |
| PRAD1/цикл іnD1 | регулює клітинний цикл | ампліфікація і/або гіперекспресія гена | рак молочної і слинних залоз |
| C - MYC | чинник транскрипції, регулює клітинний цикл і активність теломерази | а) хромосомні транслокації, що переміщують ген під контроль регуляторних елементів генів імуноглобулінів; б) ампліфікація і гіперекспресія гена; мутації, що стабілізують білок | а) лімфома Беркита б) багато форм новоутворень |
| CTNNB1(b - катенін) | а)чинник транскрипції, регулює c-MYC і циклін- D1; б) зв'язуючись з кадхерином, бере участь в утворенні адгезійних контактів | мутації, які збільшують кількість незв'язаного з E-кадхерином b - катеніна, що функціонує як чинник транскрипції | спадковий аденоматозний поліпоз товстої кишки; різні форми спорадичних пухлин |
| BCL2 | пригнічує апоптоз, регулюючи проникність мітохондріальних і ядерних мембран | хромосомні транслокації, які переміщують ген під контроль регуляторних елементів генів імуноглобулінів | фолікулярна лімфома |
| ABL | регулює клітинний цикл і апоптоз | Хромосомні транслокації, які ведуть до утворення химерних генів BCR/ABL, продукти яких стимулюють проліферацію клітин і пригнічують апоптоз | хронічний мієлоїдний лейкоз, частина гострого лімфобластного лейкозу |
| інактиватор p53 і pRb MDM2 | ампліфікація і/або гіперекспресія гена | Частина остеосарком і сарком м'яких тканин | інактивує p53 і pRb |

**Підкреслені спадкові форми захворювань, що виникають при мутаціях в статевих клітинах. У інших випадках мутації відбуваються в соматичних клітинах, які утворюють пухлини.

Таблиця 10.2 Форми пухлин людини, що виникають при інактивації деяких пухлинних супресорів і мутаторних генів.

| Ген | Функція білку | Новоутворення* |
|------------------------|---|---|
| p53 | чинник транскрипції; регулює клітинний цикл і апоптоз, контролює цілісність генома | синдром Ли-Фраумени і більшість форм спорадичних пухлин |
| INK4a - ARF | інгібування Cdk4**, активація p53** | спадкові меланоми і багато спорадичних пухлин |
| Rb | контролює вхід в S -фазу, регулюючи активність чинника транскрипції E2F | спадкові ретинобластоми і багато форм спорадичних пухлин |
| TbR - II | рецептор другого типу для цитокіна TGF - b | спадкові і спорадичні форми раку товстої кишки |
| SMAD2, SMAD3 | передають сигнал від активованих рецепторів TGF - b до Smad4 | рак товстої кишки, легень, підшлункової залози |
| SMAD4/DPC4 | чинник транскрипції; опосередкує дію цитокіна TGF - b, що призводить до активації інгібіторів Cdk, - p21WAF1, p27KIP1, p15INK4b | ювенільний гамартоматозний поліпоз шлунку і кишковика; різні форми спорадичних пухлин |
| E-кадхерин | бере участь в міжклітинних взаємодіях; ініціює передачу сигналів, активуючих p53, p27KIP1 | спадковий рак шлунку і багато форм спорадичних пухлин |
| APC | зв'язує і руйнує цитоплазматичний b -катенін, перешкоджає утворенню комплексів транскрипцій b -катенін/Tcf | спадковий аденоматозний поліпоз і спорадичні пухлини товстої кишки |
| VHL | пригнічує експресію гена VEGF (чинника зростання ендотелію судин) і інших генів, що активуються при гіпоксії | синдром фон Хіппеля-Ліндау (множинні гемангіоми); світлоклітинні карциноми нирки |
| WT1 | чинник транскрипції; зв'язуючись з p53, модулює експресію p53-респонсивних генів | спадкові нефробластоми (пухлина Вилмса) |
| PTEN/MMAC1 | фосфатаза; стимулює апоптоз, пригнічуючи активність PI3K - PKB/Akt сигнального шляху | хвороба Коудена (множинні гамартоми); багато спорадичних пухлин |
| NF1 (нейрон-фібромін) | білок родини GAP; переводить онкоген gas з активної в неактивну форму | нейрофіброматоз першого типу |
| NF2(мерлін) | бере участь у взаємодіях мембрани з цитоскелетом | нейрофіброматоз другого типу; спорадичні менінгіоми, мезотеліоми та ін. пухлини |
| BRCA1 | підвищує активність p53 і інших чинників транскрипції, зв'язуючись з RAD51 бере участь в пізнаванні і/або репарації ушкоджень ДНК | спадкові пухлини молочної залози і яєчників; різні форми спорадичних пухлин |
| BRCA2 | траскрипційний чинник з активностями гістонової ацетилтрансферази; зв'язуючись з RAD51 бере участь в репарації ДНК | спадкові пухлини молочної залози і яєчників; різні форми спорадичних пухлин |
| MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 | репарація неспарених ділянок ДНК (mismatch repair) | неполипозний рак товстої кишки і яєчників; спорадичні пухлини |
| BRCA1 | підвищує активність p53 і інших чинників транскрипції, зв'язуючись з RAD51 бере участь в пізнаванні і/або репарації ушкоджень ДНК | спадкові пухлини молочної залози і яєчників; різні форми спорадичних пухлин |
| BRCA2 | траскрипційний чинник з активностями гістонової ацетилтрансферази; зв'язуючись з RAD51 бере участь в репарації ДНК | спадкові пухлини молочної залози і яєчників; різні форми спорадичних пухлин |
| MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 | репарація неспарених ділянок ДНК (mismatch repair) | неполипозний рак товстої кишки і яєчників; багато спорадичних пухлин |

Підкреслені спадкові форми захворювань, що виникають при мутаціях в гаметах. Локус INK4a/ARF кодує два білки: p16INK4a - інгібітор циклінзалежних кіназ Cdk4/6 і p19ARF (Alternative Reading Frame) - продукт альтернативної рамки читування, який, зв'язуючи p53 і Mdm2, блокує їх взаємодію і перешкоджає деградації p53. Делеції і багато точкових мутацій в локусі INK4a/ARF викликають одночасно інактивацію супресорної активності обох цих білків.

Механізми канцерогенезу.

Канцерогенез – багатоетапний процес накопичення мутацій і інших генетичних змін, який призводять до порушень регуляції проліферації і диференціювання, природної загибелі клітин (апоптоз), морфогенетичних реакцій клітини, а також, ймовірно, до неефективного функціонування чинників специфічного і неспецифічного протипухлинного імунітету. Сукупність таких змін, які надбані, як правило, в результаті досить тривалої еволюції неопластичних клонів, в ході якої відбувається відбір клітин з необхідними ознаками, може забезпечити розвиток злякисного новоутворення. Вірогідність виникнення в одній клітині декількох генетичних змін різко підвищується при порушеннях роботи систем, контролюючих цілісність генома. Тому мутації, які ведуть до генетичної нестабільності, також є невід'ємним етапом пухлинної прогресії. Деякі природжені аномалії систем генетичного контролю також є чинниками, які збільшують частоту і вірогідність виникнення онкогенних мутацій і новоутворень.

Значний прогрес в розумінні механізмів канцерогенезу пов'язаний з відкриттям спочатку онкогенів і протонкогенів, а потім - пухлинних супресорів і мутаторних генів. Онкогени - це клітинні або вірусні гени, експресія яких може привести до канцерогенезу. Протоонкогени – нормальні клітинні гени, посилення або модифікація функції яких перетворює їх на онкогени. Пухлинні супресори (антионкогени, рецесивні пухлинні гени) – клітинні гени, інактивація яких різко збільшує вірогідність виникнення новоутворень, а відновлення функції, навпаки, може подавити ріст пухлинних клітин. "Мутаторні" гени, що зараховуються до пухлинних супресорів, збільшують темп виникнення генетичних змін, не впливають на зростання неопластичних клітин, але їх інактивація сильно збільшує вірогідність появи різних онкогенних мутацій.

Належність до онкогенів або пухлинних супресорів визначається декількома критеріями: а) закономірним характером змін структури або експресії цього гена в клітинах новоутворень; б) виникненням в юному або молодому віці певних форм пухлин у індивідів з гамеопатіями; в) різким підвищенням частоти появи пухлин у трансгенних тварин, або що експресують активовану форму цього гена - у разі онкогенів, або носіїв інактивуючої мутації ("нокаут") цього гена - у разі пухлинних супресорів; г) здатністю викликати в культивованих *in vitro* клітинах морфологічну трансформацію або необмежений ріст (онкогени), пригнічувати клітинне зростання або трансформацію (пухлинні супресори).

До теперішнього часу відомо більше 150 потенційних клітинних і вірусних онкогенів і більше двох десятків пухлинних супресорів. Виявлено, що механізм дії вірусних онкогенів пов'язаний з активацією клітинних протоонкогенів (ретровірусів) або інактивацією пухлинних супресорів (ДНК-вмісні віруси). Виявлені характерні форми новоутворень людини і зміни онкогенів і пухлинних супресорів, які можна використовувати для постановки діагнозу (табл. 10.1,10.2). Останніми роками стала вимальовуватися загальна картина, яка показує, що протоонкогени і пухлинні супресорів є компонентами декількох загальних сигнальних шляхів, контролюючих клітинний цикл, апоптоз, цілісність генома, морфогенетичні реакції і диференціювання клітин.

Онкогени і пухлинні супресори в регуляції клітинного циклу.

В основі утворення пухлини лежить надлишкове розмноження клітин. Абсолютно природньо тому, що порушення регуляції клітинного циклу є невід'ємною і однією з провідних ознак неопластичної клітини. «Двигуном» клітинного циклу, як відомо є активність циклінзалежних кіназ, які послідовно змінюють один одного. Кожна циклінзалежна кіназа (CDK) є каталітичною субодиницею холоферментного комплексу, для активності якої вимагається присутність активаторної субодиниці - цикліна. Регуляція активності Cdk здійснюється за рахунок спрямованої зміни рівня певних циклінів в різні фази клітинного циклу. Крім того, активність Cdk регулюється змінами фосфорилування їх певних

амінокислотних залишків. У активній формі комплекси циклін-Cdk фосфорилують регуляторні білки, контролюючи протікання цієї фази (рис. 10.8)

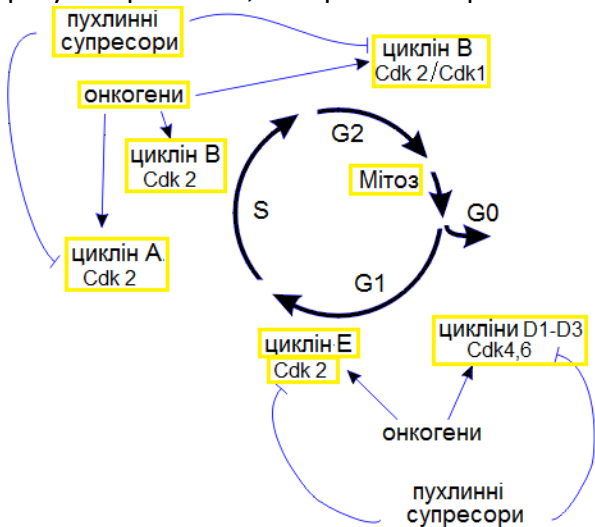


Рис. 10.8. Рух по клітинному циклу визначається послідовною активацією різних комплексів циклін-Cdk. Більшість з них - мішені активуючої дії онкогенів або дії пухлинних супресорів, які інгібують.

Виявилось, що дія багатьох протоонкогенів і пухлинних супресорів спрямована на регуляцію різних комплексів циклін- Cdk. Білки більшості з них підвищують активність циклінозалежних кіназ, відповідальних за початкові етапи G1 періоду (комплекси циклінів D1-D3 с Cdk4 або Cdk6 залежно від типу клітин) і перехід з G1 в S фазу (рис. 10.1). Крім того, деякі протоонкогени і пухлинні супресори регулюють активність

комплексів циклін A-Cdk2 (реплікація ДНК) і циклін B - Cdk1 (перехід з G2 в мітоз). Основним субстратом комплексів циклін D - Cdk4 і циклін D - Cdk6 є пухлинний супресор pRb і Rb-подібні білки p105 і p130. pRb і його гомологи дефосфорилувані в клітинах, які не діляться, і в клітинах, які діляться, знаходяться в ранній G1-фазі. У такому стані вони зв'язують і блокують комплекси транскрипцій E2F - DP (E2F - 1, - 2, - 3, - 4, - 5 і DP - 1, - 2, - 3), регулюючи активність генів, продукти яких потрібні спершу і проходження S -фази. Зокрема, E2F - DP регулюють експресію генів тимидинкінази, дигідрофолатредуктази, цикліна E, цикліна A, PCNA, ДНК-полімерази α та ін. Зв'язування білків родини E2F с pRb інгібує їх активність транскрипції. При мітогенних сигналах, що викликаються ростовими чинниками, pRb в середині G1-фази фосфорилує комплексом циклін D-Cdk4 (чи циклін D-Cdk6), який викликає вивільнення чинників транскрипцій E2F - DP з комплексу з pRb і їх активацію. Внаслідок цього стимулюється транскрипція гена цикліна E, активуються комплекси циклін E-Cdk2, pRb, які фосфорилуються. Таким чином, виникає регуляторна петля, яка підтримує активність чинників транскрипцій E2F-DP і контрольованих ними генів, які забезпечують реплікацію ДНК (рис. 10.2). Після завершення S-фази pRb переходить в дефосфорильований стан і блокує активність E2F-DP і вхід в S-фазу (для ініціації потрібний новий мітогенний стимул, який активує комплекси циклін D-Cdk4, 6). Таким чином, пухлинний супресор pRb відіграє ключову роль в регуляції входження клітини в S-фазу.

Продукти багатьох протоонкогенів є компонентами сигнальних шляхів, відповідальних за активацію комплексів циклін D-CDK4(6) і циклін E - CDK2 у відповідь на дію ростових чинників або адгезію клітин до білок позаклітинного матриксу (Рис. 10.10.). Так, зв'язування рецепторів ростових чинників зі своїми лігандами індукує димеризацію і аутофосфорилування рецепторів (одна субодиноця димера фосфорилує іншу по тирозинам). Це, у свою чергу, викликає взаємодію рецепторних тирозинкіназ з багатьма сигнальними білками, SH2, які містять, домени і зв'язують фосфотирозин. Н., активовані рецептори чинника зростання з тромбоцитів (PDGF - Rb) взаємодіють з SH2 -доменами таких білків, як фосфатидилінозитол- 3'- кіназа (PI3K), фосфоліпаза 3 (PLC) - g1, латентні форми чинників транскрипцій STAT і адаптерний білок Grb2, передавальний сигнал до білка Ras. Зв'язування кожного з цих білків з фосфотирозинами рецептора викликає активацію сигнальних шляхів, які перетинаються, що завершується активацією в ядрі набору чинників транскрипцій і експресією специфічних генів. Зокрема, індукований Grb2 перехід білків Ras в активований (GTP зв'язаний) стан веде до стимуляції ряду його ефекторів, у тому числі серин-треонінових кіназ Raf* і MEKK, запускаючої MAPK (Mitogen Activated Protein) кіназние

каскади. Кінцеві продукти цих каскадів, ERK (MAPK), p38 і JNK (SAPK), транслюкуються з цитоплазми в ядро, де вони фосфорилують і активують безліч субстратів, у тому числі чинники транскрипції такі як: Elk1, Ets1*, Ets2*, Jun*, ATF2, Tcf та ін. Це викликає активацію інших чинників транскрипції. Так, Elk1, формуючи комплекс з SRF (Serum Response Factor), ініціює транскрипцію генів, які містять у своєму промоторі SRE елементи (н., ген FOS*).

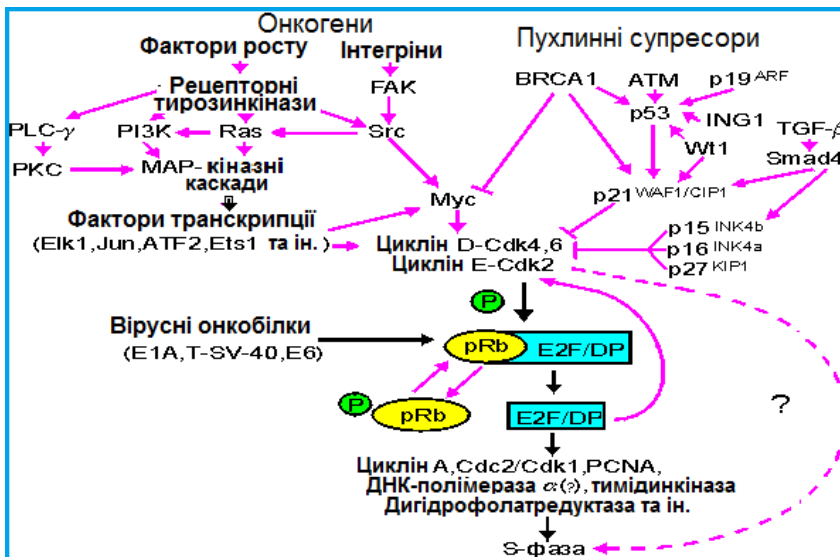


Рис. 10.9. Продукти багатьох протоонкогенів і пухлинних супресорів регулюють активність циклінзалежних кіназ, pRb, які фосфорилують. Фосфорилування pRb, як і його зв'язування, з рядом вірусних онкобілків викликає вивільнення і активацію комплексів транскрипції E2F-DP, генів, які посилюють експресію продуктів, потрібних для проходження S-фази.

Схожі реакції спостерігаються при зв'язуванні інтегринів (рецепторів, що опосередковують адгезію

клітини) з білками позаклітинного матриксу. Така взаємодія викликає активацію і аутофосфорилування кінрази FAK (Focal Adhesion Kinase), внаслідок чого вона зв'язується з SH2-доменом протоонкобілка Src і викликає рекрутування адаптерного білку Grb2, активацію Ras і MAPK кіназних каскадів (рис. 10.7).

Наслідком змін активності ряду чинників транскрипції, індукованих активацією Мар-кіназ, є підвищення експресії гена цикліна D1 (за це відповідальні білки Jun, Ets1, Ets2). Крім того, мітогенні сигнали підвищують експресію Мус, що також викликає збільшення активності циклінзалежних кіназ G1 періоду (циклін D-Cdk4 і циклін E-Cdk2). Мус, по-перше, трансактивує ген Cdc 25a-фосфатази, що знімає інгібіторне фосфорилування Cdk2 і Cdk4 по Thr-14 і Tyr-15, а по-друге, знижує експресію інгібітору Cdk2, p27 KIP1a. Механізми активації Мус при дії ростових чинників мало вивчені. Багато учасників сигнальних шляхів, які у відповідь на дію ростових чинників викликають активацію циклінзалежних кіназ і стимуляцію клітинного ділення, є протоонкогенами. Їх мутації, що призводять до вислизання від дії негативних регуляторних чинників або підвищення експресії, перетворюють ці протоонкогени на онкогени.

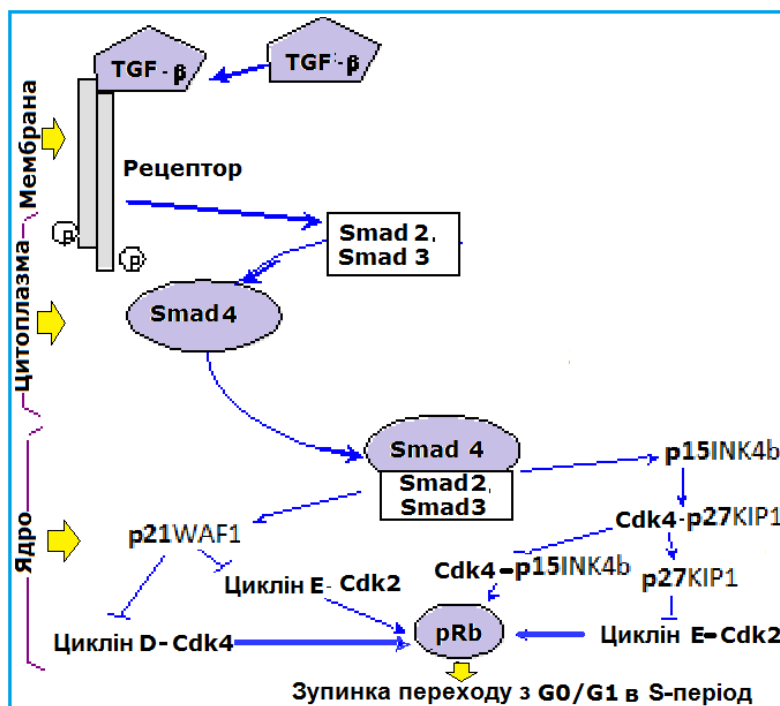
Продукти ідентифікованих онкогенів представляють усі поверхи регуляції мітогенного сигналу: ростові чинники - PDGF-b (Sis), FGF1 та ін.; рецепторні тирозинкінази – EGF-R (ErbB), HGF-R (Met), Ret та ін.; білки родини Ras-K-Ras, H-Ras і N-Ras; ефектори Ras – серин-треонінові кінрази Raf і Mos; чинники транскрипції - Jun, Ets1, Мус та ін.; і, нарешті, циклін D1 (Prad1). При детальному аналізі в кожному новоутворенні виявляються зміни хоч би одного з компонентів сигнальних шляхів (протоонкогенів), що підвищують активність циклінзалежних кіназ і ініціацію мітозу незалежно від дії ростових чинників.

Цікаво, що сигнальний шлях Cdk-Rb-E2F контролюється не лише pRB, але і багатьма іншими супресорними білками (рис. 10.12). Деякі з них є інгібіторними субодиницями Cdk (CKIs-Cdk Inhibitors), що викликають зупинку клітинного циклу у відповідь на різні позаклітинні і внутрішньоклітинні сигнали. Ідентифіковано дві родини CKIs : Ink4 і Cip/Kip. Перша включає чотири представника, у тому числі пухлинні супресори p15INK4b (p15) і p16INK4a (p16). Білки Ink4 мають досить вузьку специфічність: зв'язуючи Cdk4 і Cdk6, вони перешкоджають утворенню їх комплексів з циклінами D. Родина Cip/Kip складається з трьох

членів: p21WAF1/CIP1 (p21), p27KIP1a (p27) і p57KIP2 (p57). Ці білки зв'язують і інгібують вже сформовані комплекси циклін D-Cdk4(6), циклін E-Cdk2 і циклін A-Cdk2. Крім того, p21 здатний блокувати і комплекс циклін B-Cdc2, відповідальний за просування по G2-фазі і вхід в мітоз. p21, і p27 опосередковують вплив інших супресорних білків, p27 (як і p15) є ключовим компонентом передачі інгібіторних сигналів, які індукуються зв'язуванням TGF-b зі своїми рецепторами.

Виявлено, що активовані рецептори TGF-b фосфорилують специфічні сигнальні ефектори, білки Smad2 і Smad3, викликаючи їх зв'язування з пухлинним супресором Smad4. Комплекси що утворюються, транслокуються з цитоплазми в ядро, де вони регулюють транскрипцію специфічних генів, зокрема інгібіторів Cdk. В результаті активуються p21 і p15. Останній витісняє p27 з комплексу Cdk4/6 і пригнічує утворення їх комплексів з циклінами D, необхідними для просування по G1 (рис. 10.11). Вивільнений p27, у свою чергу, зв'язує і інгібує комплекси циклін E-Cdk2, відповідальні за початок S-фази. Підвищення експресії p21 також веде до пригнічення активності комплексів циклін D-Cdk4, 6 і циклін E-Cdk2. В результаті клітина зупиняється в G0/G1 і не входить в S-фазу (рис. 10.10).

Інгібіторний ефект TGF-β долається гіперекспресією онкогенів MYC або MDM2. І якщо дія Мус пов'язана з активацією різних Cdk шляхом підвищення експресії Cdc25A і стимуляції



деградації p27, то білок Mdm2 окрім деградації p53 викликає інактивацію pRb, вивільняючи активні комплекси транскрипцій E2F-DP.

Рис. 10.10. Зв'язування TGF-β зі своїм рецептором викликає утворення комплексів транскрипцій Smad4 – Smad2,3, які надходять з цитоплазми в ядро. Це призводить до активації ряду мішеней, у тому числі і інгібіторів циклін-залежних кіназ p21, p15, p27, пригніченню активності Cdk4, 6 і Cdk2, відповідальних за рух по G1 і вхід в S-період.

Отже, і гіперекспресія протоонкогенів MYC або MDM2, і інактивуючи мутації в пухлинних супресорах Smad4, p15INK4b, pRb

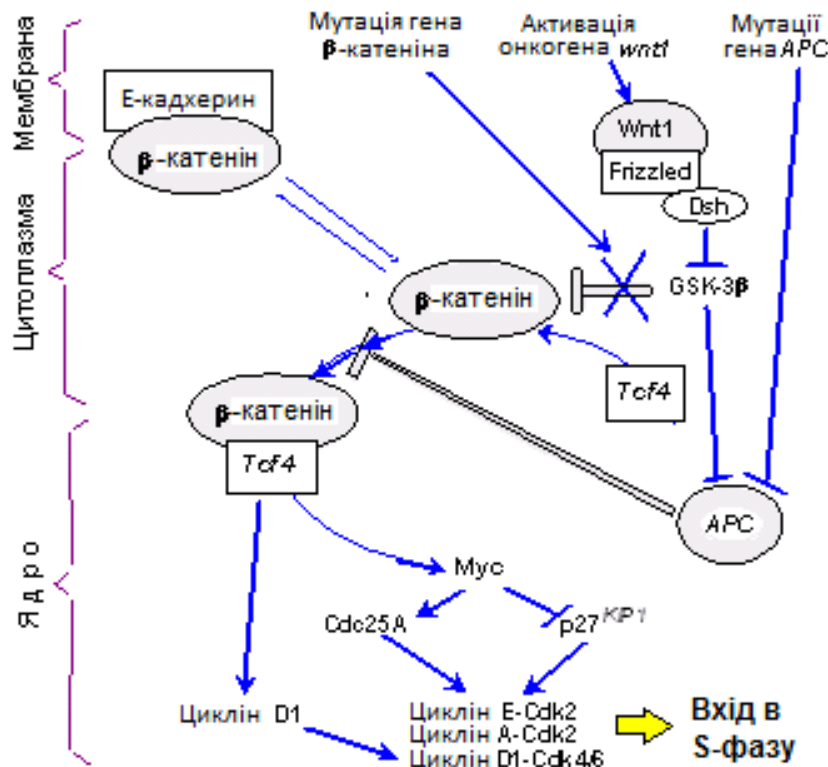
мають один загальний наслідок – клітини вислизають від інгібіторної дії TGF-β, що стимулює розвиток епітеліальних пухлин, зокрема раку кишковика і підшлункової залози.

Одним з найбільш яскравих досягнень стала ідентифікація ще одного найважливішого сигнального шляху, що часто порушується при різних новоутвореннях людини і клітинного циклу, який здійснює регуляцію, залежно від стану мембранних і підмембранних структур клітини (рис. 10.14). Виявилось, що в незв'язаному з E-кадхерином стані b-катенін може функціонувати як чинник транскрипції. У цитоплазмі він зв'язується з іншим чинником транскрипції Tcf4, після чого комплекси b-катенін-Tcf4 транслокуються в ядро і активують гени, які мають у своєму складі специфічні респонсивні елементи. Одними з основних мішеней трансактиваційної дії комплексу b-катенін-Tcf4 є гени цикліна D1 і MYC.

Пухлинний супресор APC, мутації якого викликають розвиток аденоматозного поліпозу кишковика, зв'язує вільний цитоплазматичний b-катенін, який викликає деградацію останнього. Таким чином, інактивація APC стимулюючи утворення комплексів b-катенін - Tcf4, підвищує транскрипцію генів цикліна D1, MYC і, як наслідок, веде до активації

циклінзалежних кіназ, відповідальних за просування по G1 і вхід в S фазу (рис. 10.11). До таких же наслідків приводить і мутації β -катеніна, які збільшують стабільність його в цитоплазмі (такі мутації виявляються у пацієнтів з сімейним поліпозом, мутацій APC, більшість з них вражає сайти β -катеніна, гликогенсинтетазою-кіназою-3b, які фосфорилують, GSK-3b).

Схожа картина спостерігається також і при активації протоонкогена WNT1 (рис. 10.11). Зв'язування його продукту Wnt1 (член родини цистеїн-багатих глікозилюваних сигнальних протеїнів) зі своїм рецептором (Frizzled) викликає переміщення цитоплазматичного білку Dsh до мембрани, де він інгібує кіназну активність GSK-3b, стимулює зв'язування і деградацію β -катеніна.



Тому, індуковане Wnt1 пригнічення активності GSK-3b призводить до стабілізації і підвищення внутрішньоклітинної концентрації цитоплазматичного β -катеніна, що підвищує вірогідність утворення активних комплексів транскрипції β -катеніна з чинниками родини Tcf/Lef1.

Рис. 10.11. Мутації пухлинних супресорів APC і β -катеніна, як і активація онкогена wnt1, стимулюють утворення комплексів транскрипції β -катенін-Tcf4, які регулюють гени MYC і цикліна D1. В результаті підвищується активність комплексів циклін-Cdk.

Таким чином, більшість відомих протоонкогенів і пухлинних супресорів регулюють активність циклінзалежних кіназ, відповідальних за вхід в S-період клітинного циклу. Продукти деяких клітинних (Mdm2) або вірусних (Т-антиген вірусу SV40, E1A аденовірусів, E7 HPV та ін.) онкогенів зв'язують і інактивують основний субстрат Cdk-pRb. А порушення в сигнальних шляхах $Cdk2, 4/6 > pRb > E2F/DP$ призводять до появи постійно проліферуючих неопластичних клітин.

Онкогени і пухлинні супресори в регуляції апоптозу.

Іншою найважливішою точкою дотику активностей онкогенів і пухлинних супресорів є регуляція апоптозу. Апоптоз викликається різними сигналами: зв'язуванням з рецепторами специфічних кілерних лігандов, нестачею чинників зростання/виживання, ушкодженнями ДНК і руйнуваннями цитоскелета, гіпоксією і іншими умовами. У регуляції апоптозу виділяють два основні етапи: фазу індукції (ухвалення рішення) і фазу екзекуції (виконання вироку). Остання здійснюється шляхом активації каспаз - родини цистеїнових протеїназ, що розщепляють свої субстрати до залишків аспартагової кислоти. Розщеплення каспазами 3,6,7 (так звані "ефекторні" або каспази, які "страчують") ряду ключових субстратів, зокрема DFF45/ICAD - інгібітору нуклеази DFF40/CAD (здійснюється каспазою 3, ламінов - каспазою 6), призводить до фрагментації ДНК і деструкції клітини. Каспази присутні в цитоплазмі у вигляді проензимів і активуються шляхом розщеплення на велику і малу субодиноці, потім субодиноці збираються в тетрамер з двома активними центрами.

Передбачається, що існує щонайменше два принципово різних сигнальних шляхів, які призводять до активації каспаз 3,6,7 (рис. 10.12). Один з них ініціюється зв'язуванням специфічних кілерних молекул (Fas-ліганд, TNF α та ін.) зі своїми рецепторами, що викликає рекрутування адаптерних білків і прокаспаз, зокрема прокаспазу 8. Агрегація молекул прокаспазу 8 ініціює розщеплення і утворення активних форм каспази 8, яка процесує ефекторні каспази.

При альтернативному механізмі розщеплення каспаз 3, 6, 7, що здійснюється каспазою 9, її активація ініціюється виходом з мітохондрій протеази AIF (Apoptosis Inducing Factor) або цитохрому C, який що стимулює зв'язування прокаспазу 9 з білком Araf1, утворення агрегатів прокаспазу 9 і її активної форми (каспазу 9). Проникність мітохондріальної мембрани для AIF і цитохрому C регулюється білками родини Bcl2, яка включає більше двох десятків білків, у тому числі продукти протоонкогенів bcl2 і bcl-x, здатних блокувати апоптоз, і пухлинний супресор Вах, який індукуює апоптоз.

Антиапоптогенні молекули Bcl2 і Bcl-x, які локалізуються в мембранах мітохондрій, закривають канали, через які здійснюється викид цитохрому C і AIF. Вах, що в нормі знаходиться в цитозолі, при апоптогенних сигналах переміщується в мітохондріальні мембрани, де він, взаємодіючи з інтегральним білком зовнішньої мітохондріальної мембрани VDAC, стимулює відкриття каналу, через який секретується цитохром C. Також Вах утворює гетеромерні комплекси з білками Bcl2, Bcl-x і, можливо, відкриває закриті до цього канали. Інші проапоптичні білки родини Bcl2 (Bak, Bad, Bid і так далі) мають схожу дію.

Якщо Bcl2, Bcl-x і Вах безпосередньо контролюють викид з мітохондрій апоптогенних молекул, то інші протоонкогени і пухлинні супресори регулюють активність цих і інших білків родини Bcl2 (рис. 10.15). Одним з найбільш потужних таких регулювальників є пухлинний супресор p53, який активується у відповідь на різні дії: ушкодження ДНК, гіпоксію, втрату контактів клітини з субстратом, перманентну нерегульовану стимуляцію мітогенного сигналу і інші. p53 здійснює активацію транскрипції, гена Вах і репресію гена bcl2. Крім того, p53 підвищує експресію ряду генів PIG, продукти яких викликають оксидативний стрес \rightarrow порушення проникності мітохондріальної і ядерної мембран \rightarrow трансактивацію деяких кілерних рецепторів, зокрема Fas і KILLER/DR5. Таким чином, активація p53 дає потужний апоптогенний сигнал, в реалізації якого задіяні різні механізми індукції каспаз, що «страчують». p53-залежний апоптоз елімінує не лише пошкоджені клітини, але і клітини з нерегульованою проліферацією, якщо викликається, н., активацією онкогену MYC або чинника транскрипції E2F.

Стабілізація p53 при активації онкогенів пов'язана з індукованим E2F підвищенням транскрипції гена p19ARF, продукт якого перешкоджає Mdm2-залежній деградації p53. Природно, що інактивуючі мутації p53 або p19ARF порушують роботу цього захисного механізму і різко збільшуватимуть вірогідність появи клітинних клонів, які постійно діляться, і розвитку з них злоякісних пухлин.

Цікаво, що конститутивна експресія онкогенів Ras ініціює одночасно і апоптогенні і антиапоптогенні сигнали. Перші обумовлені активацією сигнального шляху Ras - Raf -MAPK- E2F - p19ARF - p53. Другі пов'язані як із здатністю одного з ефекторів Ras – білка Raf - прямо фосфорилувати і інактивувати проапоптичний білок Bad (родина Bcl2), так і з дією іншого ефектора Ras - PI3K (фосфоінозитол-3-кінази).

Антиапоптичні ефекти PI3K обумовлені її здатністю активувати серин-треонінову протеїнкіназу PKB/Akt (уперше була ідентифікована як онкоген ретровірусу АКТ8, що викликає Т-клітинні лімфоми у мишей), яка блокує апоптоз декількома шляхами. По-перше, протеїнкіназа PKB/Akt, як і Raf, має здатність фосфорилувати і інактивувати білок Bad. Крім того, пригноблюючи функцію білка DAF-16 – чинника транскрипції родини Forkhead - PKB/Akt, може інгібувати продукцію кілерних молекул (н., Fas -ліганда).

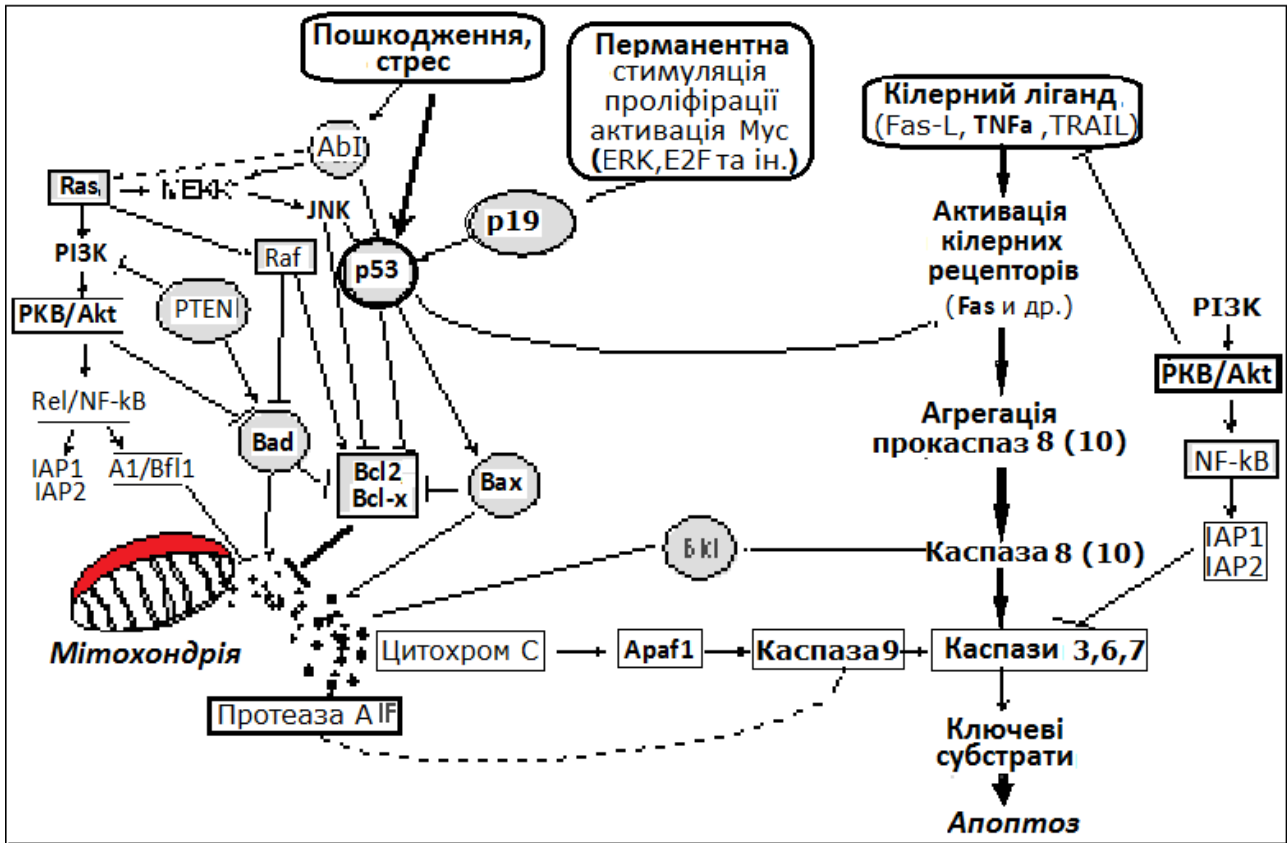


Рис. 10.12. Участь онкогенів і пухлинних супресорів в регуляції апоптозу.

Виявлено, що PKB/Akt активує функцію чинників транскрипції родини Rel/NF-kB (гомологи вірусного онкобілка v-Rel); ампліфікація і перебудови їх генів характерні для багатьох новоутворень людини, які інгібують апоптоз декількома шляхами (рис. 10.12). Зокрема, він трансактивує ген, що кодує білок A1/Bfl1 - член родини білків Bcl2, який інгібує викид цитохрому С і/або AIF. Разом з цим, NF-kB збільшує експресію інгібіторів апоптозу IAP1 і IAP2, членів родини білків IAP (Inhibitors of Apoptosis), блокуючих функцію каспаз 3, 6, 7, 8, 9. У зв'язку з викладеним стає зрозумілою одна із захисних функцій пухлинного супресора PTEN (його інактивація закономірно виявляється в гліомах, раках молочної залози і простати, а природжені мутації ведуть до розвитку синдрому множинних гамартом): білок PTEN пригнічує антиапоптогенні ефекти сигналу PI3K – PKB/Akt.

Для неопластичних клітин характерні порушення функції і інших пухлинних супресорів, які здійснюють позитивну регуляцію апоптозу. Так, розвиток хронічного мієлоїдного лейкозу обумовлюється хромосомною транслокацією t(9;22), в результаті якої утворюється химерний ген BCR/ABL. Така перебудова викликає одночасно два важливих наслідки: а) різке збільшення тирозинкіназної активності білка Abl, який стимулює мітогенний і антиапоптичний сигнали, що опосередковуються Ras-регульованими сигнальними шляхами, а також збільшенням синтезу інтегринів, який забезпечує краще прикріплення до позаклітинного матриксу; б) інактивацію апоптогенної активності Abl, яка обумовлена його участю в позитивній регуляції JNK (SAPK - Stress Activated Protein Kinase), що пригнічує активність Bcl2 і, можливо, активує p53 (рис. 10.15). Білок Abl також може безпосередньо зв'язуватися з p53 і модифікувати його про апоптичну функцію.

Результатом хромосомної транслокації t(15;17), у випадках гострого промієлоцитарного лейкозу, є з'єднання гена рецептора ретиноевої кислоти (RAR - а) с геном пухлинного супресора PML, продукт якого утворює в ядрі специфічні матрикс-асоційовані тільця. Химерний білок PML/RAR-а інактивує за домінантно-негативним механізмом

апоптогенну функцію нормального білку PML, утворюючи з ним гетеродимери. Механізми індукції апоптозу при гіперекспресії PML доки не зовсім ясні. Отримані дані про його участь в активації каспаз 1, 3 і рекрутуванні білка Вах при апоптозі, індукованому TNF-а, інтерферонами 1 і 2, активацією Fas і ушкодженнями ДНК.

Окрім регуляції апоптозу ген PML контролює також розмноження і, ймовірно, диференціювання мієлоїдних попередників. Показано, що трансактивация p21, відповідальна за зупинку клітинного циклу під впливом ретиноевої кислоти, опосередкує PML. Таким чином, експресія химерного білку PML/RAR - а, що викликає інактивацію нормальної функції білка PML, як і перебудова BCR/ABL, веде і до змін регуляції клітинного циклу, і до часткового блокування індукції апоптозу.

В результаті дії гібридних молекул з'являються клітини з підвищеним проліферативним потенціалом і стійкі до негативних регуляторних сигналів зовнішнього середовища. Цих змін може вистачати для розвитку гемобластозів. Перебудови BCR/ABL або PML/RAR-а часто є єдиними генетичними змінами, що виявляються при лейкозі.

Проте для розвитку злоякісних форм важких пухлин (рак, саркома та ін.), безумовно, необхідні і інші зміни: порушення взаємодії між клітинами і позаклітинним матриксом; втрата залежності від субстрату і контактного гальмування; підвищення інвазивної активності в навколишні тканини; здатність стимулювати проростання судин (неоангіогенезу) в тканині пухлини для забезпечення її живлення. Тому в клітинах важких пухлин мутацій і інших генетичних змін значно більше, ніж при лейкозі.

Протоонкогени і пухлинні супресори в контролі генетичної стабільності

У клітині існують і інші системи контролю цілісності генома, порушення роботи яких також характерні для пухлинних клітин. Системи контролю цілісності генома умовно можна розділити на дві групи:

- 1) репараційні системи;
- 2) системи контролю клітинного циклу, які припиняють ділення клітин з порушеннями структури і числа хромосом.

Зміни систем репарації характерні для невеликої частини новоутворень, але при розвитку деяких форм пухлин вони можуть відігравати значну роль. Так, природжені дефекти генів, продукти яких відповідальні за ексцизійну репарацію ДНК, викликають пігментну ксеродерму (множинні пухлини шкіри в місцях, що піддаються сонячному опроміненню). Цікаво, що, незважаючи на участь ексцизійної репарації у виправленні дефектів, викликаних різноманітними мутагенами і канцерогенами, частота виникнення інших форм пухлин при пігментній ксеродермі майже не збільшується.

Природжені дефекти іншої репараційної системи, яка виправляє помилки реплікації ДНК – утворенню неспарених основ ("mismatch repair"), викликають синдром Лінча (синдром пухлин товстого кишківника і пухлин яєчника.) Відомо 4 гени: MSH2, MLH1, PMS1 і PMS2, мутації в яких призводять до цього стану.

Порушення в системі репарації неспарених основ характерні і для деяких форм спорадичних (неспадкових) пухлин: вони виявляються в 13-15% пухлин товстої кишки, раку шлунку і ендометрію, рідше (<2%) за інших.

Порушення в системі репарації розривів ДНК шляхом гомологічної рекомбінації, також можуть призводити до розвитку певних форм пухлин. Супресорні білки BRCA1 і BRCA2, гермінальні мутації яких відповідальні за спадкові форми раку молочної залози і яєчників, мають здатність утворювати комплекс з білком RAD51 – гомологом бактерійного білку RecA, відповідальним за гомологічну рекомбінацію, а інактивація («нокаут») генів BRCA1 і BRCA2 призводить до різкого підвищення чутливості до g-випромінювання.

Для більшості важких пухлин характерна «хромосомна нестабільність». У клітинному циклі існують «точки зв'язки» (checkpoints), проходження яких можливе лише у разі

нормального завершення попередніх етапів і відсутності порушень. Виділяють такі точки: в G1, S, G2 і «точку перевірки збірки веретена ділення» в мітозі.

Точка звірювання в G1. Основна вимога до клітини, яка вступає в S-фазу, - інтактність ДНК. Тому клітини, що піддалися мутагенним діям з розривами ДНК (УФ- і g -опромінення, алкілізуюче з'єднання та ін.), зупиняються в G1 і не входять в S-фазу. Зупинка в G1 спостерігається також при незавершеності попереднього клітинного циклу мітозом (нерозходження хромосом), при неправильній сегрегації хромосом під час мітозу, що привела до утворення мікроядер, при руйнуванні мікротрубочок. Зупинка в G1 може бути необерненою (g-опромінення) або оберненою, при закінченні дії чинника, який її викликав (відновлення нормального пулу нуклеотидів або системи мікротрубочок).

Точка звірювання в S-фазі контролює правильність реплікації ДНК. Зупинка в певному періоді S-фази спостерігається при нестачі нуклеотидів в клітинах, які не зупинилися з різних причин в G1-періоді. Точка звірювання в G2:у G2-фазі перевіряється повнота реплікації ДНК і клітини; клітини в якій ДНК недореплікована, не входять в мітоз.

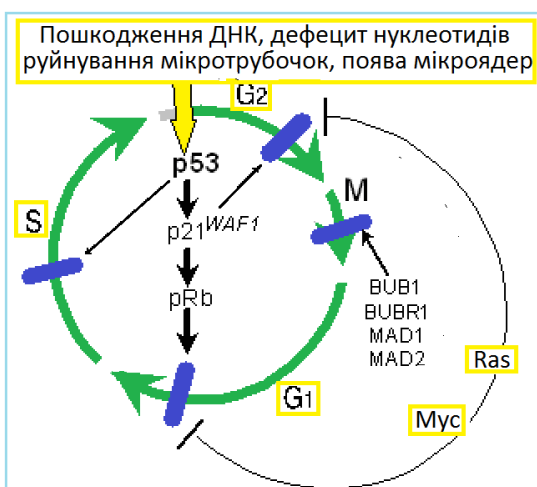


Рис. 10.13. "Точки звірювання" (checkpoints) клітинного циклу і участь в їх регуляції деяких пухлинних супресорів і онкогенів.

Точка звірювання зборки веретена ділення (spindle - assembly checkpoint). Щоб уникнути неправильного розподілу хромосом клітини затримуються в метафазі до тих пір, поки усі кінетохори не будуть прикріплені до мікротрубочок. Руйнування неприкріплених кінетохорів лазерним пучком ініціює початок анафази, в ході якої відбуваються відставання хромосом, не прикріплених до веретена ділення, і

утворення з них мікроядер. Визначальну роль в індукції зупинки в метафазі відіграють зміни взаємодій асоційованих з кінетохорами білків BUB1, BUBR1, MAD1 і MAD2.

У пухлинних клітинах характерні зміни компонентів точок звірювання клітинного циклу викликають зупинку. Так, інактивація точки звірювання зборки веретена ділення, пов'язана з порушенням функції MAD1 або MAD2, спостерігається у випадках раку молочної залози і Т-клітинному лейкозі, викликаному вірусом HTLV-1 (MAD1 є прямою мішенню онкобілка Tax цього вірусу), а мутації генів BUB1 і BUBR1 виявляються в деяких випадках раку товстого кишечника. Істотно велике значення для інактивації точок звірювання КЦ має дисфункція деяких пухлинних супресорів і протоонкогенів, зокрема p53, pRb, Myc і Ras (рис. 10.14).

Білок p53 є ключовим компонентом деяких точок звірювання, він активується у відповідь на розриви ДНК, нестачі нуклеотидів, руйнування мікротрубочок, відсутність сегрегації хромосом в мітозі або її неправильне завершення. При цьому сенсорами ушкоджень ДНК є, ймовірно, ДНК-протеїніназа або білок ATM (Ataxia-Teleangiectasia Mutated), які мають здатність розпізнавати вільні кінці ДНК, а також - фосфорилувати p53 по Ser-15, перешкоджаючи його зв'язуванню з білком Mdm2, наступному транспорту з ядра і деградацію.

Одним з наслідків активації p53 є зміна експресії генів, які контролюють апоптоз (BAX, BCL2 та ін.), і p21, GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage - induced), що зупинює клітинний цикл. В результаті генетично змінена клітина або гине в результаті індукції апоптозу, або зупиняється в G1 - або G2-фазі, а іноді в S-періоді клітинного циклу. Вибір на активацію p53 між апоптозом і зупинкою клітинного циклу залежить від безлічі чинників: типу клітин (н., у фібробластах спостерігається зупинка клітинного циклу, а в лімфоцитах - апоптоз), міри

активації p53 (із збільшенням рівня його експресії підвищується вірогідність апоптозу), активності сигнального шляху p21 - pRb - E2F (зупинка в G1, у фібробластах з інактивацією p21 або pRb викликає апоптоз), а точка зупинки клітинного циклу визначається тим, в якій фазі клітинного циклу знаходиться клітина у момент підвищення експресії p53 і яким чинником викликана його активація. Порушення функції p53, характерні для більшості різних новоутворень людини, значно послабляють контрольні функції точок зв'язування клітинного циклу і одночасно інгібують індукцію апоптозу, що різко збільшує вірогідність появи проліферативних клітин із спонтанними або індукованими порушеннями числа хромосом, розривами і рекомбінаціями хромосом або ампліфікацією окремих генів. Відновлення функції p53 в клітинах зменшує темп виникнення генетичних порушень.

Дестабілізація генома спостерігається і при порушеннях функції інших пухлинних супресорів, зокрема pRb. Але в цьому випадку частота появи і спектр генетичних змін в клітинах, які діляться, значно менші, ніж в клітинах з дисфункцією p53. (інактивація pRb послабляє тільки роботу точки зв'язування в G1 (рис. 10.16) і не блокує p53-залежний апоптоз в аномальних клітинах.

Активація деяких протоонкогенів також може послабляти роботу точок зв'язування КЦ і збільшувати генетичну нестабільність. Так, гіперекспресія Мус зменшує інгібіторну дію p21 на комплекси циклін D-Cdk4 і циклін E-Cdk2, відмінюючи зупинку в G1, що викликається активацією p53. Гіперфункція Ras послабляє роботу точок зв'язування, індукує генетичну нестабільність в клітинах, з аномаліями p53-регулюємих сигнальних шляхів.

Отже, зміни пухлинних супресорів (інактивація p53, pRb і, можливо, p16 - p19ARF) і протоонкогенів (активація Мус, Ras та ін.) приводять до дисфункції точок зв'язування клітинного циклу і нестабільності генома. Мутації і порушення генів репараційних систем призводять до розвитку гетерогенних клітинних популяцій, генетичній нестабільності і до появи автономних і агресивних клітин.

Онкогени, пухлинні супресори і порушення морфогенетичних реакцій клітини.

Відмінною властивістю неопластичних клітин є "асоціальний" тип їх поведінки, пов'язаний з порушеннями нормальних морфогенетичних реакцій – втратою контактного гальмування, активним діленням незалежно від прикріплення до субстрату, змінами адгезійних взаємодій, форми і рухливості клітин і так далі. Ці порушення разом із здатністю секретувати протеолітичні ензими і ангіогенні чинники, визначають інвазійний характер зростання і метастазування. Первинну роль у виникненні вказаних вище порушень морфогенетичних реакцій грають зміни функції протоонкогенів і пухлинних супресорів (рис. 10.15, 10.16). Контактне гальмування проліферації зв'язують в першу чергу з підвищенням експресії пухлинних супресорів p16 і p27, що обумовлює недофосфорилювання pRb і блокування входу в S-фазу.

Шляхи передачі сигналу від плазматичної мембрани до інгібіторів циклінзалежних кіназ доки незрозумілі. Показано тільки, що підвищення в епітеліальних клітинах експресії E-кадхерина, яке викликане трансдукцією його гена, веде до накопичення p27 і зупинці клітинного росту. У епітеліальних клітинах існує ще один шлях блокування клітинного циклу у відповідь на встановлення міжклітинних контактів. Мутації E-кадхерина або відокремлення міжклітинних контактів викликають дестабілізацію p53 і припинення пригнічення p21 комплексів циклін-Cdk.

Ймовірно, що онкогенний потенціал мутацій E-кадхерина, відповідальних за розвиток спадкових форм раку шлунку і багатьох інших новоутворень, обумовлений змінами регуляції клітинного циклу, апоптозу і контролю генетичної стабільності.

Разом з інактивацією ряду пухлинних супресорів (E-кадхерин, p53, p27KIP1, pRb), викликану мутаціями або зв'язуванням з вірусними онкобілками (pRb - с E1A, E7, T - SV40; p53 - с E1B, E6, T - SV40; p27 - с E1A), до втрати контактного гальмування розмноження може приводити і

гіперфункція протоонкогенів, які модифікують активність сигнального шляху Cdk - pRb - E2F. Зокрема, гіперфункція протоонкогенів може бути викликана підвищенням експресії Мус або активацією протоонкогена Ras (перший викликає деградацію p27 і трансактивацію Cdc25a, другий – деградацію p27 і підвищення експресії цикліна D1).

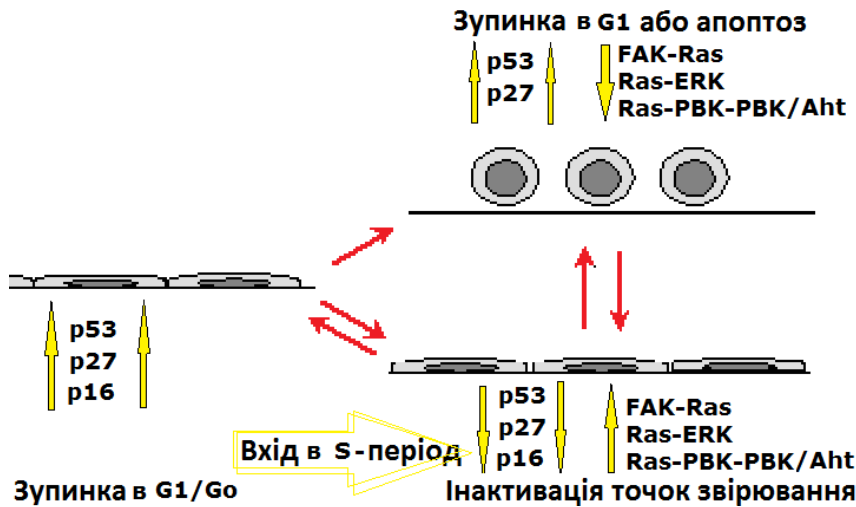


Рис. 10.14. Зміни активності супресорних білків і контрольованих протоонкогенами сигнальних шляхів, які визначають залежність клітин від прикріплення до субстрату і контактне гальмування розмноження.

Незалежність від прикріплення до позаклітинного матриксу (anchorage independence).

Нормальні клітини більшості типів мають бути прикріплені до позаклітинного матриксу. В основі цього лежать два основних чинники: нездатність ростових чинників активувати в неприкріплених клітинах комплекси циклін E - Cdk2, відповідальні за вхід в S-фазу, і індукція апоптозу в багатьох типах клітин за відсутності адгезійних взаємодій (що пов'язане з активацією p53 і акумуляція p27).

Окрім запуску механізмів негативного контролю проліферації (блокування входу в S-фазу і індукція апоптозу) у відповідь на відкріплення клітин від матриксу існують і незалежні механізми позитивної регуляції, здатності до виживаності і розмноження клітин, що ініціюються зв'язуванням інтегринів з білками позаклітинного матриксу і наступною активацією нерецепторної тирозинкінази FAK (Focal Adhesion Kinase) – ключової ділянки передачі сигналів від рецепторів інтегринів, яка фізично взаємодіє з цитоплазматичним доменом b-субодиниці інтегрину).

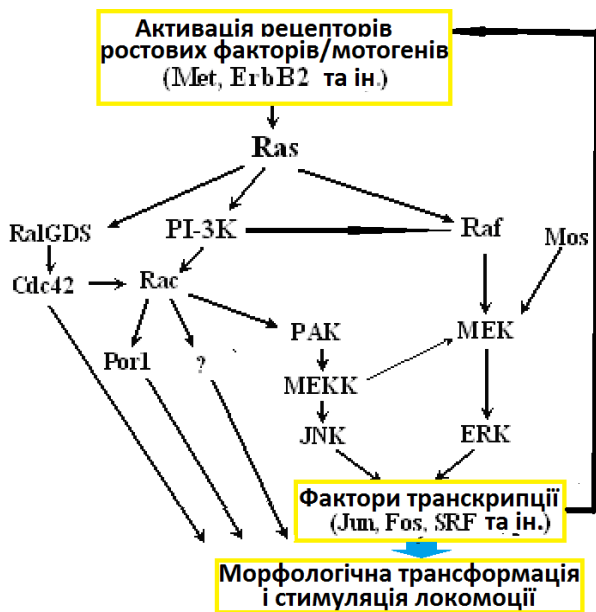
По-перше, зв'язування інтегринів з матриксом і активація FAK потрібні для проходження мітогенного сигналу від рецепторів ростових чинників (EGF, PDGF) до кінцевої МАРІ кіназ - ERK1/2.

По-друге, активуючи Ras через адаптерний білок Shc, рецептори інтегринів не лише стимулюють мітогенний сигнал, але і пригнічують апоптоз, мабуть, за рахунок активації сигнального шляху Ras - PI3K - PKB/Akt.

Якщо виходити з факту існування декількох механізмів, що визначають життєздатність і ділення клітин від їх зв'язку з матриксом, зрозуміло, що для виникнення характерної для пухлинних клітин незалежності від адгезійних взаємодій необхідно, декілька подій, які б дозволяли долати супресорні ефекти p53 (мутації/делеції цього гена, гіперекспресія онкогена MDM2 та ін.) або p27 (мутації/делеції; гіперекспресія онкогенів RAS і MYC якої призводить до деградації цього білку та ін.), а з іншою, - обходити переривання мітогенного сигналу на рівні MEK1 кінази (н., за рахунок активації білків Src або Мус, що активують комплекси циклін E-Cdk2) і блокують апоптоз за сигнальним шляхом Ras - PI3K - PKB/Akt.

Зміни форми і рухливості клітин. Зміна форми – характерна властивість пухлинних клітин. У основі морфологічних порушень лежать взаємозв'язані зміни цитоскелета, адгезійних взаємодій клітин один з одним і з позаклітинним матриксом, що порушує формування контактів і прикріплення клітин до матриксу, дезорганізації системи актинових мікрофіламентів. Це призводить до змін активності псевдоподій і характеру переміщення клітин і нагадує зміни, що виникають в нормальних клітинах при дії митогенних цитокінів.

Проте локомоторний фенотип в неопластичних клітинах, як правило, сильно змінений, що дозволяє відрізнити пухлинну клітину від рухомої нормальної клітини.



Молекулярні механізми, що визначають виникнення локомоторного фенотипу, не визначені. Виявлені лише деякі ключові вузли в складних ланцюгах передачі сигналів, відповідальних за виникнення цих змін.

Рис. 10.15. Регульовані онкогенами сигнальні шляхи, відповідальні за зміни морфології і локомоторний фенотип неопластичних клітин.

Як відомо, багато цитокінів (н., HGF/SF, EGF, FGF, PDGF, IGF - 1 та ін.) є одночасно і мітогенами, і мотогенами. Так, HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) є сильним мітогеном для гепатоцитів, але – мотогеном для епітеліальних клітин (клітин молочної залози, ендотеліоцитів). Мотогенний ефект HGF/SF залежить від стимуляції ним Ras -

Raf - MAPK сигнальних шляхів: про що свідчить його відміна при інгібуванні функції MEK1 і блокуванні передачі сигналу до ERK1/2. Проте, тільки підвищення активності Raf недостатньо для руйнування в епітеліальних клітинах E-кадхеринових міжклітинних контактів і стимуляції руху клітин – потрібна одночасна активація PI3K, яка при дії HGF/SF може індукуватися по Ras-залежному або по Ras-незалежному сигнальним шляхам. Ефектори PI3K, відповідальні за реалізацію мотогенного ефекту, невідомі.

Показано тільки, що ні PKB/Akt, ні Ras самі по собі не забезпечують перебудову цитоскелета і роз'єднання міжклітинних контактів. Важливим ефектом HGF/SF в клітинах лейоміосаркоми, є пониження експресії гена фібронектину, що може змінювати адгезійні взаємодії з матриксом і локомоцію. Мутації гена рецептора HGF/SF (протоонкогена Met), стимулюючи його тирозинкіназну активність, є онкогенними (папілярний рак нирки), а також інших захворювань людини (таблиця.10.1). Конститутивна експресія активованих онкогенів Ras викликає у фібробластах, і в епітеліальних клітинах різке підвищення локомоторної активності і стійкі морфологічні зміни, характерні для неопластичних клітин, проте ці зміни добре проявляються тільки в клітинах з аномаліями p53- і/або p16 -регульованих сигнальних шляхів. Передбачається, що декілька ефекторів Ras: Raf і GTPази родини Rho (Rac, Cdc42, Rho), відповідальні за прояв морфологічної трансформації і за стимуляцію локомоторної активності неопластичних клітин (рис. 10.15). Як і при мотогенних ефектах цитокінів, ключову роль тут, мабуть, грає активація двох сигнальних каскадів: Ras - PI3K - Rac і Ras - Raf - ERK. Для трансформації фібробластів, імовірно, досить конститутивної активації будь-якого з цих шляхів. В той же час в епітеліальних клітинах, що добре трансформуються онкогеном Ras, активації Raf - ERK -каскадів недостатньо, щоб викликати морфологічну трансформацію. Експресія активованого Ras надає епітеліальним клітинам деякі ознаки трансформованого фенотипа (в першу чергу утворення ламелоподій і рафлінг мембран, проте сильна морфологічна трансформація досягається тільки при спільній активації Ras-залежних і Raf - ERK сигнальних шляхів.

Таким чином, головну роль в морфологічній трансформації і придбанні локомоторного фенотипу грають, ймовірно, протоонкогени, зміни активності яких призводять до активації білків родини Ras або його ефекторів: PI3K, Raf і, можливо, RalGDS. Тільки сукупність змін, що викликаються ними, в регуляції активності псевдоподій,

складки/розбирання цитоскелета і фокальних контактів при одночасній зміні активності великого набору чинників транскрипцій забезпечує врешті-решт придбання клітинами так званого «повністю трансформованого» фенотипу, що визначає агресивний характер разростання.

Слід враховувати, що для прояву цих змін потрібна інактивація пухлинних супресорів (p53 p19ARF і/або p16). Тому ймовірно, що для виникнення характерних для пухлинних клітин змін морфогенетичних реакцій вимагається декілька генетичних мутацій як в пухлинних супресорах, так і в протоонкогенах.

Онкогени і пухлинні супресори в неангіогенезі

Неангіогенез - формування мережі капілярів з ендотеліальних клітин, що вистилають дрібні венули, - необхідна умова для подальшого зростання пухлинного вузлика, що досяг діаметрі 2-4 мм. Придбання неопластичними клітинами здатності стимулювати проліферацію і міграцію ендотеліальних клітин пов'язане, імовірно, з двома основними подіями: припиненням секреції ними чинників, що інгібують ангіогенез (тромбоспондини та ін.), і збільшенням продукції цитокінів, що є чинниками зростання і мотогенами для ендотеліоцитів (в першу чергу VEGF, а також FGF, EGF, TGF - а), підвищенням секреції і активності протеаз, що забезпечують протеоліз позаклітинного матриксу і інвазію ендотеліоцитів в тканині новоутворення.

Ключову роль у виникненні ангіогенного фенотипа неопластичних клітин грає інактивація функції пухлинного супресора p53, контролюючого експресію деяких інгібіторів і стимуляторів ангіогенезу. Так, гени тромбоспондинів 1 і 2 є мішенню трансактиваційної дії p53, а транскрипцію гена VEGF p53 пригнічують. Разом із здатністю p53 активуватися у відповідь на гіпоксію, це зумовлює ще один механізм, за допомогою якого нормальне функціонування p53 може захищати організм від пухлинного зростання. Гіпоксія, що виникає в центрі неопластичного вузлика, індукує p53 і, як наслідок апоптоз або зупинку клітинного циклу, яка супроводжується підвищенням секреції тромбоспондинів і зниженням експресії VEGF, що повинне запобігати неоваскуляризації вузлика. Природно тому, що інактивація p53 може бути важливим етапом в придбанні здатності стимулювати ангіогенез.

До подальшого посилення здатності стимулювати ангіогенез може призводити експресія онкогенів, зокрема онкогенів родини RAS, що викликають активацію комплексу транскрипції AP-1 і, як наслідок, з одного боку, підвищення секреції VEGF, а з іншою, - збільшення продукції ряду матриксних металопротеїназ (MMP - 9/коллагеназа IV, MMP - 1 та ін.), гени якої також регулюються AP-1 і іншими Ras-індукованими чинниками транскрипцій, зокрема Ets1.

Слід зауважити, що послідовність подій, що призводять до розвитку ангіогенного фенотипа, може бути і іншою: у фібросаркомах у трансгенних мишей поява ангіогенного фенотипа ініціювалася підвищенням експресії JunB і c-Jun компонентів комплексу AP-1 і наступним підвищенням секреції з пухлинних клітин FGFb. Отримані дані про роль і інших онкогенів і пухлинних супресорів в регуляції ангіогенезу. Так, Мус пригнічує транскрипцію тромбоспондина 1, тоді як пухлинний супресор VHL, мутації якого викликають синдром фон Хиппеля-Линдау (розвиток множинних гемангіом) і карциноми нирки, здійснює негативну регуляцію експресії гена VEGF в стромальних клітинах гемангіом і клітинах ниркового епітелію. Таким чином, імовірно, що зміни активності певних пухлинних супресорів і онкогенів грають вирішальну роль в стимуляції ангіогенезу.

Роль онкогенів і пухлинних супресорів у надбанні здатності до метастазування.

Метастазування - утворення вторинних вогнищ пухлинного зростання - найбільш небезпечний прояв прогресії новоутворень, основна причина смерті онкохворих. Щоб дати метастази, клітина повинна надбати ряд властивостей: уміння проникати в глибину навколишніх нормальних тканин (у тому числі в кровоносні або лімфатичні судини), здатність

виживати після попадання в судини, а потім пенетрувати їх і розмножуватися в невласливому для цього типу клітин мікрооточенні, даючи нове вогнище пухлинного зростання. Здатність до метастазування складається з комплексу простіших ознак - придбання локомоторного фенотипа і підвищеної протеолітичної активності, здатність стимулювати ангиогенез і створювати шляхи евакуації пухлинних клітин з первинного вогнища, виникнення незалежності від субстрату і пригнічення апоптозу.

Проте найбільш важливими представляються зміни активності генів і білків (p53, Ras і Src), які призводять до виникнення відразу декількох компонентів метастатичного фенотипу і, крім того, - до генетичної нестабільності, що полегшує появу додаткових ознак, необхідних для метастазування. Цікаво, що p53, порушення функції якого істотно збільшує здатність клітин давати метастази в модельних системах *in vivo*, окрім усього іншого прямо активує транскрипцію гена KAI1 - трансмембранного білку, що утворює комплекси з E-кадхерином. Втрата експресії білка KAI1 виявляється в різних пухлинах людини на пізніх стадіях захворювання (60-90% випадків раку передміхурової, підшлункової і молочної залоз, дрібноклітинного раку легень, гепатоцелюлярного раку та ін.), а відновлення його експресії викликає інгібування метастатичного процесу. Метастазин, білок що зв'язує кальцій, навпаки, гіперекспресується на пізніх стадіях розвитку різних новоутворень людини і має здатність надавати клітинам метастатичний потенціал. Його експресія також викликає плейотропний ефект: призводить до зменшення змісту E-кадхерина, пригніченню синтезу інгібітору металопротеїнази TIMP-1, змінам регуляції реорганізацій цитоскелета в наслідок інгібування фосфорилювання важкого ланцюга міозину і, можливо, до інактивації p53.

Інтерес являє описаний Г.И.Дейчман так званий «H 2O2CA+PGES»-фенотип, що полягає в підвищенні антиоксидантної активності, секреції простагландину E2 і, як наслідок, в набутті ще більшої стійкості до чинників природної протипухлинної резистентності і набутого імунітету. Цей фенотип індукується в культивованих *in vitro* клітинах шляхом трансдукції ізоформ онкогена v-src або виникає в процесі зростання пухлини *in vivo*.

Імовірно, в майбутньому будуть відкриті і інші механізми метастазування і встановлена роль в цих процесах пухлинних супресорів і онкогенів.

Роль онкогенів і пухлинних супресорів в іморталізації неопластичних клітин.

Щоб утворити з однієї клітини-родоначальниці спочатку пухлину, а потім і метастази, необхідно дуже велике число клітинних ділень. Існує механізм, що обмежує число ділень більшості нормальних клітин (виняток становлять стовбурові клітини). Так, в культурах *in vitro* фібробласти і епітеліальні клітини людини після 50-60 ділень («число Хейфліка») безповоротно зупиняються в G1- або G2-фазі клітинного циклу («реплікативне старіння»). У основі цього лежить прогресивне укорочення довжини теломер в результаті неповної реплікації кінцевих ділянок хромосом в кожному з мітотичних циклів. За існуючими уявленнями зупинка клітинного циклу обумовлена утворенням «липких» кінців хромосом, що викликає їх з'єднання і запуск реакцій, аналогічних тим, які спостерігаються при дії ДНК-пошкоджуючих агентів. Проте в клітинах з активною теломеразою або при активізації інших «альтернативних механізмів подовження теломер», заснованих на нереципроковій рекомбінації їх ділянок, може відбуватися відміна обмеження на число ділень - «іморталізація» (придбання безсмертя). Про це свідчать дві групи фактів: а) в клітинах більшості пухлин, як і в стовбурових клітинах, теломераза активна, б) трансдукція векторів, які експресують каталітичну субодиницю теломерази (TERT), що збільшує тривалість життя людських клітин деяких ліній ще на 20 ділень.

Виявлено, що активність теломерази контролюється онкобілком Мус, що підвищує транскрипцію гена TERT, - субодиниці, рівень експресії якої визначає активність ферменту в нормальних клітинах. Цікаво, що ряд інших клітинних і вірусних онкобілків (активовані Ras, Mdm2, циклін D1, Cdc25A, E7 HPV) не активують теломеразу, тоді як E6 HPV16 має таку

здатність, підвищуючи експресію Мус (н., в митогенах лімфоцитів, що стимулюються, в проліферативних зонах волосяних фолікулів і кишкових крипт).

Проте одній тільки активізації механізмів, що перешкоджають укороченню теломер, мабуть, недостатньо для іморталізації клітин. Так, трансдукція TERT або E6, знімаючи обмеження числа клітинних ділень в клітинах деяких ліній, не призводить до іморталізації фібробластів IMR-90, кератиноцитів і епітеліальних клітин молочної залози, хоча і викликає в них активацію теломерази і подовження теломер. Іморталізація в таких клітинах настає лише у разі додаткової інактивації функції певних пухлинних супресорів. Причому, для різних типів клітин потрібна, мабуть, інактивація різних супресорів. Так, в людських кератиноцитах і епітеліоцитах молочної залози іморталізація спостерігається при трансдукції TERT і одночасній інактивації або pRb, або p16INK4a, тоді як елімінація p53 або p19ARF не викликає такого ефекту.

У клітинах мишей, на відміну від людських, теломераза конститутивно активована, до іморталізації приводить саме інактивація p53 або p19ARF, хоча передчасне старіння в них (як і в людських клітинах) може бути викликано підвищенням активності будь-якого з пухлинних супресорів - p53, p19, p16, pRb, p21.

Конститутивна активація теломерази в багатьох типах нормальних клітин миші і більший розмір їх теломер (20 тис.п.н.), (тоді як в клітинах людини їх довжина коливається від 5-15 тис.п.н.) можуть пояснити підвищену здатність мишачих клітин іморталізуватися і трансформуватися під дією різних канцерогенних чинників.

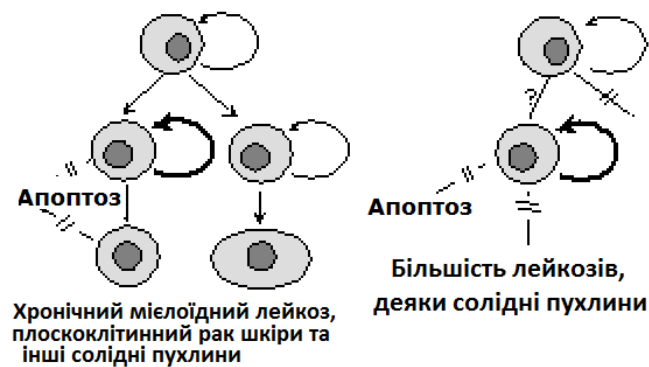
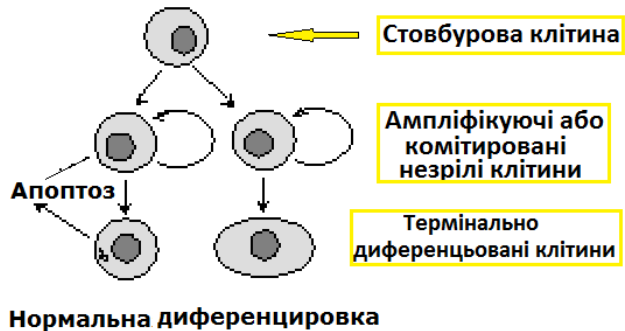
Останнім часом широко обговорювалася можливість використання потенційних інгібіторів теломерази для терапії пухлин. Проте серія робіт з трансгенними мишами, у яких нокаутує ген РНК-субодиниці теломерази, принесла несподівані результати, що ставлять під сумнів такий спосіб лікування. Як відомо, в реплікативному старінні існують дві фази: так звана «рання криза» (пов'язана з активацією p53 або інгібіторів Cdk, можливо, у відповідь на укорочення теломер до якогось критичного розміру або якісь інші сигнали) і так звана «генетична катастрофа» (повна дисфункція теломер і злипання хромосом). Виявилось, що при інактивації p53, що характерно для різних новоутворень «рання криза», незважаючи на «нокаут» теломерази і укорочення теломер, не спостерігається. В той же час блокування теломерази в таких клітинах ще більше збільшує генетичну нестабільність. При цьому «генетична катастрофа» в таких клітинах не настає, ймовірно, включаються альтернативні механізми подовження теломер. В результаті інактивація гена теломерази у мишей призводить до збільшення частоти їх виникнення. У зв'язку з цим не виключено, що блокування теломерази зможе зробити терапевтичний ефект відносно деяких пухлин, що зокрема зберегли функцію p53.

Онкогени, пухлинні супресори і порушення диференціювання клітин.

Порушення клітинного диференціювання - характерна риса пухлинних клітин, широко використовувана для діагностики новоутворень. Особливо яскраво вона проявляється в гемобластах, - клітин, що є клонами, як би «заморожених» на тій або іншій стадії дозрівання. Загальноприйнятим є уявлення, згідно з яким менша зрілість лейкозних клітин є не наслідком дедиференцировки зрілих клітин, що зазнали неопластичну трансформацію, а відбиває їх походження з незрілих клітин, в яких заблоковані процеси подальшого диференціювання (рис. 10.9). Це положення отримало дуже вагомий експериментальні докази: при трансдукції химерного гена PML/RARa, який відповідальний за розвиток гострого промієлоцитарного лейкозу (табл. 1), як і активацію інших онкогенів (MYC, MYB, v-erbA), незрілі гемопоетичні клітини-реципієнти дійсно втрачають здатність диференціюватися під впливом ретиноевої кислоти, специфічних цитокінів і інших індукторів дозрівання. При цьому цікаво, що експресія білка PML/RARa перешкоджає не лише мієлоїдному диференціюванню,

але і диференціюванню мегакаріоцитів, що індукується у відповідних клітинах-попередників тромбопоетинів.

Слід помітити, що зупинки диференціювання недостатньо, щоб розвинувся лейкоз. Про це свідчить той факт, що онкоген *v-erbA* (кодує перебудований ядерний рецептор тиреоїдних гормонів, що має домінують-негативний ефект), який зв'язується із специфічними респонсивними елементами деяких генів, повністю блокує утворення



еритроцитів з еритробластів, але не викликає розвиток еритробластозу. Це захворювання виникає лише у разі одночасної стимуляції проліферації еритробластів, що викликається, н., додатковою експресією в них онкогенів, які запускають Ras-Raf- MAP кінзні каскади або активацію комплексів транскрипції AP-1.

Рис. 10.16. Моделі, які пояснюють походження новоутворень з незрілих клітин певної стадії диференціювання, в яких або збережена, або блокована здатність до подальшого дозрівання.

некомітированій клітині, що призводить до експресії в ній химерного білку p21/ABL. Експресія цього білку стимулює проліферацію і пригнічує апоптоз, що веде до збільшення числа цілком зрілих мієлоїдних клітин. Цікаво, що нащадками клітини-родоначальниці лейкозу разом з мієлоїдними можуть бути лімфоцити і гістіоцити. Слід підкреслити, що хронічний мієлоїдний лейкоз тече досить доброякісно і набуває істинно зляюкисного характеру тільки тоді, коли в результаті додаткових генетичних змін виникає клон, в якому диференціювання блоковане («бластний криз»).

Більше того, блок диференціювання - не обов'язкова умова для пухлинного зростання, навіть у разі лейкозу. Так, хронічний мієлоїдний лейкоз є результатом хромосомної транслокації в незрілій

Збереження здатності до диференціювання спостерігається і в багатьох великих пухлинах. Прикладами цього можуть служити плоскоклітинний рак шкіри, який ороговіває і високодиференційовані аденокарциноми товстої кишки, що походять з «ампліфікуючих» клітин (нащадків стовбурових клітин, які спочатку кілька разів діляться, а потім диференціюються), або з комітированих незрілих клітин.

Якщо експресія онкогенів здатна блокувати процеси диференціювання, то активація пухлинних супресорів, навпаки, може індукувати дозрівання клітин. Так, описана залежність інтенсивності В-клітинної, еритроїдної, еритроцитарної, епідермальної, м'язової і ряду інших, диференціюватися від активності p53, p21 і pRb. Вважається, що стимуляція супресорними білками диференціювання пов'язана в першу чергу з їх здатністю викликати зупинку клітинного циклу в G0/G1, що є необхідною умовою для дозрівання багатьох типів клітин. Можна припустити, що дія онкогенів на диференціювання в основному пов'язана із змінами регуляції клітинної проліферації. Проте ефекти, що викликаються ними, не такі однозначні і сильно залежать від тканинної приналежності клітин. Так, відомо, що активований Ras або Muc стимулюють проліферацію і викликають блок диференціювання в багатьох типах клітин. Проте їх експресія в монобластах веде до інгібування розмноження і стимуляції переходу в моноцити. Конститутивна експресія Muc промотирує у трансгенних тварин і термінальне

диференціювання кератиноцитів, стимулюючи ділення і перехід стовбурових клітин в «ампліфікуючі».

По-друге, механізми дії онкогенів на диференціювання не вичерпуються їх впливом на проліферацію. Н., Sp1 (PU.1) - член родини чинників транскрипції Ets - належить до категорії так званих «генів-володарів» («master genes») диференціювання, які регулюють активність великого набору генів, що детермінують комітировання і подальше дозрівання клітин. Активність Sp1 відповідальна і за активацію супресора проліферації p21 при дії різних стимулів диференціації, зумовлює мієлоїдне диференціювання клітин, а зміна функції цього білку в некомітированих гемопоетичних клітинах призводить до розвитку еритролейкозів. Лейкозогенна дія онкобілків Myb, що викликають блокування диференціювання в незрілих мієлоїдних клітинах пов'язана з відокремленням механізмів регуляції проліферації клітин і експресії в них групи диференцированих білків. Продукт протоонкогена MYB (чинник транскрипції), безпосередньо активує транскрипцію генів мієлопероксидази, еластази нейтрофілів, CD34, CD13 і так далі. Його онкогенні похідні в результаті перебудов втрачають таку функцію, зберігаючи при цьому антиапоптичні активності (білок c- μ трансактивує ген BCL2) і здатність рухатися в S-фазу.

У завершенні потрібно відмітити, що механізми регуляції клітинного диференціювання є найменш вивченим аспектом дії онкогенів і пухлинних супресорів. І ця проблема повертатиме до себе найпильнішу увагу дослідників.

Канцерогенні чинники. Прийнято вважати, що приблизно в 90% випадків виникнення рака обумовлене дією канцерогенних речовин навколишнього середовища. Ізолювати людину від них практично неможливо: забруднення середовища носить глобальний характер. Канцерогени — це хімічні, фізичні і біологічні речовини природного і антропогенного походження здатні за певних умов індукувати рак.

Фізичні чинники. До фізичних канцерогенних чинників відносяться: корпускулярні (α -, β -промені) і іонізуючі випромінювання (рентгенівські і γ -промені), ультрафіолетові промені і деякі інертні речовини. Іонізуюче випромінювання — один з найвідоміших екзогенних канцерогенів. Воно викликає появу пухлини в опроміненій анатомічній зоні. Частота таких злоякісних пухлин зростає у міру підвищення дози опромінювання, помірно, але тривале сумарне опромінювання може бути причиною різних видів лейкозів. Відома відносно висока частота їх серед рентгенологів, у хворих, що лікувалися опромінюванням.

Ультрафіолетові промені не іонізують і проникають в тканини організму не глибше 2 мм. Вони викликають рак шкіри (80% випадків карцином і 40% випадків меланом шкіри).

Хімічні чинники. Понад 1000 хімічних речовин можуть бути потенційними канцерогенами. Вони належать до всіх хімічних класів. Першими були вивчені поліциклічні вуглеводні, після того, як в 1775 р. з'ясувалася роль сажі (кам'яновугільної смоли) у виникненні раки мошонки у сажотрусів.

Складовою частиною канцерогенних вуглеводнів є антрацен, дібензантрацен - похідний бензантрацена та інші. Існує цілий ряд канцерогенних вуглеводів, що використовуються в промисловості і побуті, в онкологічних лабораторіях (н., метілхолантрен, чотирихлористий вуглець, хлороформ, гептахлор, пестициди: ДДТ і діалдрин).

Хлорвініл - використовуваний для виробництва пластмаси може викликати рак печінки у людини і щурів. Особливо небезпечні деякі похідні азоту (н., аміни). Анілін викликає рак сечових шляхів і міхура; фенацетин (знеболюючий штучний препарат) — потенційний канцероген.

Абсорбція нітриту і деяких азотистих сполук (амінів і амідів) в шлунку, вступаючи в хімічну реакцію, утворюють нітрозаміни – сильні канцерогени.

Відомі канцерогенні властивості органічних речовин рослинного походження (дубильних речовин і деяких алкалоїдів), деякі ліки (н., резерпін сприяє захворюванню раком

молочної залози), цвілеві гриби (афлатоксин), бактерії (етіонін), Деякі мінеральні речовини також є канцерогенами: азбест, хром, нікель, кадмій, свинець, олово, залізо, миш'як.

Комбіновані канцерогени. Канцерогени можуть складатися з активної речовини з доведеною або передбачуваною канцерогенністю або нести в організм інші речовини, що є вірогідними канцерогенами. При цьому утворюються канцерогенні суміші і комбінації.

Роль тютюну в появі деяких пухлин людини повністю доведена численними дослідженнями, проведеними майже у всіх країнах. Найчастіше у курців виникає рак легень і органів травної системи. Ризик появи цього раку чітко корелює з кількістю вичурюваних сигарет. Відома безліч типів рака, виникнення яких може бути пов'язане з курінням тютюну. Вони зустрічаються з різною частотою.

Прикладом комплексних канцерогенів можуть розглядатися алкогольні напої, вони не вживаються у вигляді чистого етилового спирту, а містять в собі продукти перегонки і добавки, серед яких є поліциклічні вуглеводні, нітрозаміни, афлатоксини і так далі. Крім того, спирт — чудовий розчинник деяких з цих речовин, його роль в запаленні слизистої оболонки верхніх відділів травного тракту доведена. Пухлини, які зумовлені вживанням алкоголю, менш поширені, ніж ті, що викликаються тютюном, але різновидів їх більше. Вірогідність виявлення раку у алкоголіків (в порівнянні з непитущими) в п'ять разів більше для пухлин рота, в 10 разів більше для пухлин гортані і в 17 разів — стравоходу. Підвищення канцерогенного ризику, що викликається алкоголем, добре доведене для раку молочної та щитоподібної залоз, меланом шкіри. Вважають, алкоголь збільшує частоту виникнення раку шлунку, підшлункової і передміхурової залоз. У любителів пива підвищений ризик раку прямої кишки. Тільки зовсім недавно деякі дослідники на основі одержаних даних звинуватили каву в причетності до появи раку, зокрема сечового міхура.

На виникнення пухлин комплексну дію надають продукти живлення, в яких важко виділити відносний вплив різних якісних і кількісних факторів. Доведений зв'язок високої частоти раку, зокрема пухлин, не пов'язаних з травною системою, з ожирінням. Встановлена чітка кореляція між висококалорійною їжею і частотою раку молочної залози у жінок. Яскравим проявом даної закономірності може служити дуже висока частота раку цієї локалізації у американок і дуже низька у японок в порівнянні з середнім світовим рівнем. Щури, яким згодовували малокалорійний корм, в три рази рідше вражалися раком, ніж щури, що знаходилися на висококалорійному раціоні. Надлишок білків в кормі підвищує у щурів частоту пухлин, що викликаються хімічними канцерогенами, а мізерний, раціон зменшує у них частоту пухлин, що викликаються нітрозамінами. Вплив такого раціону може бути частково непрямим: білки, що містяться в ньому, змінюють активність ферментів печінки, здатних перетворювати на канцерогени речовини, які такими не є, і навпаки.

Деякі складові частини білків (окремі амінокислоти) виконують особливу роль: так, додавання триптофану в їжу підвищує частоту раку печінки, що викликається нітрозаміном.

Біологічні чинники. Живі організми, а саме деякі гельмінти, бактерії і віруси, можуть відігравати провідну роль в появі раку. Шистосоми — найбільш яскравий приклад гельмінта, сприяючого розвитку злоякісних новоутворень. Вони викликають різні пошкодження внутрішніх органів залежно від виду паразита. Зокрема, в Єгипті спостерігається шистосомний цистит, який дуже часто ускладнюється раком сечового міхура. І дійсно, це найбільш частий вид злоякісної пухлини серед населення даної країни: від шистосомоза і раку, що викликається ним, залежить поки що не високий (50 років) прогноз життя єгиптян. Кажучи про це, ми маємо на увазі той факт, що запалення проявляє себе як попередник раку. Запалення сечового міхура не єдиний випадок хронічного запалення, сприяючого раку. В принципі важливо виявити зв'язок між кількістю і співвідношенням різних бактерій в організмі або в деяких його органах, з одного боку, і частотою раку різної локалізації. Факти свідчать на користь можливого впливу стану кишкової флори на виникнення раку не тільки

товстої кишки, але і молочної залози. Відмічений також зв'язок між інфекцією сечових шляхів і захворюваністю раком шлунку. У першому випадку допускають, що кишкові бактерії виробляють канцерогени з харчових речовин і складових частин жовчі, в другому випадку можлива участь мікробів в перетворенні нітратів на нітрозаміни.

Екологічні спостереження послужили основою для вивчення радіаційного і хімічного канцерогенезу. В 20 сторіччі Боррелем була висловлена вірусна теорія канцерогенезу і пройшов значний час з моменту активного її розвитку, епідеміологи все ще шукають доказ участі вірусів в канцерогенезі. На даний час вже доведено, що деякі віруси тварини або людини, є сильними канцерогенами для організмів, в яких вони паразитують. Віруси відіграють основну роль в спонтанному канцерогенезі у різних тварин і не менш важливу роль в канцерогенезі у людини. Одні віруси викликають появу спонтанних пухлин в більшості випадків зляжкісних, інші — доброякісних пухлин (фібром і папілом). Одні пухлини утворюються у тварин, які не піддаються відбору по генетичних ознаках, інші головним чином у тварин чистих ліній (рак молочної залози і лейкоз у мишей). Дія вірусів була розкрита дія ультрафільтрата пухлинної тканини на здорових тваринах. Пухлини з'являються тільки після більш менш тривалого латентного періоду. В деяких випадках канцерогенний ефект не залежить від віку реципієнта. У інших же, зокрема при спонтанному лейкозі мишей, розвиток зляжкісного захворювання відбувається тільки при зараженні, негайно після народження особини. Це експериментальне спостереження дозволило припустити, що існують два типи передачі канцерогенних вірусів: горизонтальна, здійснювана різними носіями і що діє незалежно від віку реципієнта, і вертикальна, здійснювана тільки у новонароджених або плоду, її носії статеві клітини (сперматозоїди, яйцеклітина) і молоко.

ДНК- вмісні віруси здатні або зруйнувати, або змінити клітини, які вони інфікують. Як правило, в змінених клітинах ділення вірусу припиняється, а наявність вірусної інформації виражається тільки появою нових антигенів (кодованих вірусним геномом). Різний канцерогенний ДНК-вірус істотно відрізняється один від одного морфологічними ознаками.

РНК-вмісні віруси поведуться по-різному: вони не руйнують клітину, деякі з них трансформують її. Цикл розмноження вірусу може продовжуватися безперервно і незалежно від клітинного ділення і закінчуватися утворенням нових вірусних часток. Канцерогенність вірусу РНК зазвичай досить слабка. Вона яскравіше виявляється при індукції сарком і слабкіше – при розвитку лейкозу. Серед ДНК- і РНК-вмісних вірусів є і такі, які не можуть закінчувати цикл свого розвитку утворенням повних вірусних часток. Їх називають дефектними. Деякі РНК-вмісні віруси, а саме віруси лейкозу, потребують допоміжного вірусу, званого «хелпер», який забезпечує вірус саркоми деякими молекулами, які необхідні для побудови мембрани.

Серед ДНК-вірусів, виділених у людини, «кандидат номер один» в групу вірусів, що мають значення в канцерогенезі, вірус Епштейна-Барра (ЕБВ), який належить до родини вірусів герпесу. Якщо припустити, що ЕБВ є канцерогенним для людини, факт його широкого розповсюдження свідчить про те, що для виникнення пухлини під впливом цього вірусу потрібні додаткові умови. У Африці географічний збіг зон малярії і лімфоми Беркитта дозволив припустити, що додатковим фактором є малярія.

Серед інших ДНК-вірусів людини, заслуговують на розгляд три групи: аденовіруси; віруси, що викликають бородавки, і вірус гепатиту В, або «австралійський антиген». Відомо, що аденовіруси людини викликають рак у хом'яків, але пошуки самих вірусів або антитіл проти них, проведені у онкологічних хворих, не мали успіхом. Є віруси, відомі тим, що вони викликають появу бородавок, але немає даних, що дозволяють з упевненістю говорити про те, що вони викликають рак у людей. Нарешті, вірус гепатиту В був запідозрений в тому, що він викликає рак печінки тільки у жителів Африки (де його антиген частіше виявляється у хворих раком печінки). Підозрюють також, що вірус викликає і лейкоз (вважають, лейкоз

пов'язаний із вірусом, який найчастіше передається при переливанні крові). Тут необхідно нагадати, що вірусний гепатит може ускладнюватися хворобою кісткового мозку – аплазією (зникнення клітин-продуцентів крові); ця хвороба сама по собі іноді ускладнюється лейкозом.

Деякі РНК-віруси людини (н., вірус грипу), можуть підвищувати ризик захворювання дітей лейкозом, коли він інфікує плід в утробі матері. Особливо наполегливо досліджуються канцерогенні РНК-вмісні віруси пухлин людини, які відповідні трьом типам злоякісних захворювань, що викликаються вірусами у тварин: лейкозу, саркомам і раку молочної залози.

Отже, канцерогенез - багатоступінчастий процес накопичення мутацій і інших генетичних змін, що призводять до порушень регуляції клітинного циклу, апоптозу, диференціювання, морфогенетичних реакцій клітини, а також, ймовірно, до неефективного функціонування чинників специфічного і неспецифічного протипухлинного імунітету. Ключову роль в цьому грають порушення функції пухлинних супресорів і протоонкогенів. Дослідження останніх років дозволили ідентифікувати сигнальні шляхи, контрольовані більшістю цих генів, регулюють активність одних і тих же шляхів на різних поверхах передачі сигналів. Виявилось також, що деякі з таких сигнальних шляхів одночасно залучені в регуляцію декількох найважливіших фізіологічних процесів.

Н., активація Raf - MAP кіназного каскаду не лише стимулює вхід в S-фазу, але і викликає зміни форми і рухливості клітин, а в деяких клітинах – і пригнічення апоптозу. З іншого боку, продукти деяких з пухлинних супресорів і протоонкогенів є місцями перетину різних сигнальних шляхів. Так, p53, активуючись у відповідь на самі різні ушкоджувальні, стресові і нормальні регуляторні дії, взаємодіє з різними мішенями і контролює апоптоз, просування по клітинному циклу, стабільність генома, морфогенетичні реакції і диференціювання клітин. Білки Ras, активуючи свої мішені - Raf, PI3K, RalGDS, грають ключову роль в регуляції ділення, виживання і диференціювання клітин, їх взаємодії з позаклітинним матриксом і локомоцію. Звідси стає зрозумілою частота, змін генів p53 і RAS у самих різних новоутвореннях - їх мутації дозволяють за один крок здолати декілька важливих етапів пухлинної прогресії і надати неопластичній клітині відразу декілька необхідних властивостей. Для лейкозу характерні хромосомні транслокації, переміщаючи протоонкогени або пухлинні супресори в інше місце генома. Специфічність таких змін пояснюється трьома основними причинами. По-перше, в певних типах клітин може бути значно підвищена вірогідність деяких генетичних перебудов. В ході диференціювання В-лімфоцитів відбувається запрограмована перебудова генів імуноглобулінів. Закономірною помилкою таких перебудов є хромосомні транслокації, що сполучають гени імуноглобулінів з протоонкогеном MYC, які містить специфічні сигнальні послідовності, та розпізнаються рекомбіназами, що здійснюють перебудову генів імуноглобулінів. У попередниках В-лімфоцитів транслокації, які порушують нормальну регуляцію білка Myc, відбуваються частіше, ніж інші мутації, які призводять до схожих біологічних наслідків.

По-друге, тканинспецифічними можуть бути експресія або дія певних онкогенів (пухлинних супресорів). І, по-третє, для придбання злоякісного фенотипа різні типи клітин можуть потребувати різних наборів біологічних властивостей. Так, для гемопоетичних клітин, що визначають їх злоякісну трансформацію являються стимуляція проліферації, пригнічення апоптозу і блокування специфічного диференціювання. Тому при розвитку гемобластозів особливу селективну цінність мають перебудови типу PML/RARa.

Незважаючи на досягнутий останніми роками значний прогрес в розумінні базових механізмів канцерогенезу, багато питань залишаються нез'ясованими. Серед них важливе місце займають механізми тканинспецифічної дії онкогенів і пухлинних супресорів.

З усіх природничих наук найближче до з'ясування причин виникнення раку на сьогодні підійшла саме генетика і «нова генетика» з її концепцією «біоінформатики», яка базується на принципах класичної онкогенетики, творчо розвивається у напрямку розуміння складної і багаторівневої інформаційної структури ДНК. Головне завдання генетики в онкології - це не лише розшифрувати увесь «раковий геном», але і структуру ДНК і головне - сама «мову», якою написана наша «книга життя», як мова вищого біологічного програмування інформаційної структури ДНК. Це треба для того, щоб зрозуміти біоінформаційні основи раку, пов'язані із спотворенням первинної генетичної інформації. Це треба для того, щоб навчитися коректно і свідомо взаємодіяти з нашою ДНК і, по можливості, навчитися вибірково виправляти в ній «помилки» і «спотворення» сенсу. Сьогодні вже доведено, що кожен ген - це навіть не «символ», а «системний файл», що має унікальні системні властивості, виконує декілька інформаційних завдань одночасно. В цьому відношенні онкозахворювання - це унікальна здатність ДНК зберігати в пам'яті і передавати в покоління не позитивні, а негативні зміни первинної біологічної інформації. Складність лікування раку з генетичної точки зору - це неможливість сьогодні точно визначити рівень, на якому змінена важлива генетична інформація, і неможливість точно ідентифікувати цю інформацію в конкретний набір команд для її диференціації.

Дослідження нуклеїнових кислот. Методи ДНК-діагностики

Методи дослідження нуклеїнових кислот. Методи виділення ДНК з рослинних і тваринних тканин і її очищення. Ферменти, які використовують для генно-інженерних досліджень. Рестриктази. ДНК-зонди. Електрофорез ДНК. Ідентифікація фрагментів ДНК і РНК методами гібридизації. Саузерн-, Норзерн-, Вестерн-блоттинг. Клонування фрагментів нуклеїнових кислот in vitro. Полімеразна ланцюгова реакція. Секвенування ДНК. Методи ДНК-діагностики. Показання до ДНК-діагностики. Прямі і непрямі методи. ДНК-чипи. Молекулярно-генетичні методи дослідження в судовій медицині.

Методи дослідження нуклеїнових кислот. Молекулярно-генетичні методи — велика і різноманітна група методів, призначених для виявлення структурних варіацій в ДНК (генах) та розшифровки первинної послідовності основ. В основі цих методів лежать «маніпуляції» з ДНК і РНК. На сучасному етапі розвитку молекулярної генетики людини і успішного вивчення генома людини молекулярно-генетичні методи широко використовуються в медико-генетичній практиці (генотерапії, ДНК-діагностиці, судовій медицині та ін.).

Отримання зразків ДНК (РНК) є початковим етапом всіх методів. Цей етап реалізується в двох варіантах: а) виділення ДНК (тотальна або геномна) з клітин; б) накопичення певних фрагментів, які передбачається аналізувати, за допомогою ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція).

Джерелом геномної ДНК можуть бути будь-які ядровмісні клітини. Виділена з клітин ДНК є повним геномом організму, тому такі зразки називають геномні ДНК. На практиці частіше використовують периферичну кров (лейкоцити), хоріон, амніотичні клітини, культури фібробластів. Для одного аналізу необхідно мати (залежно від методу) від декількох нанограмів до декількох мікрограмів ДНК.

Виділена ДНК придатна для проведення різних варіантів методів і може довго зберігатися в замороженому вигляді.

Для виділення ДНК використовують різні методики залежно від поставлених завдань. Їх суть полягає в екстракції ДНК з біопрепарату і видаленні або нейтралізації сторонніх домішок для отримання препарату ДНК з чистотою, придатною для ПЛР.

Стандартною і класичною вважається методика отримання чистого препарату ДНК по Мармуру. Вона включає ферментативний протеоліз з подальшою депротейнізацією і

пересадженням ДНК спиртом, що дозволяє отримати чистий препарат ДНК. Одним з популярних нині є метод виділення ДНК, запропонований Воом із співавторами. Цей метод ґрунтується на використанні для лізису клітин сильного хаотропного агента – гуанідину тіоціонату (GuSCN), і подальшої сорбції ДНК носієм (скляні намиста, діатомова земля, скляне «молоко» та ін.). Після відмивань у зразку залишається ДНК, сорбована на носії, з якого вона легко знімається за допомогою елюючого буфера.

Інша група методів підготовки зразків ґрунтується на використанні іонообмінників типу Chilex, які, на відміну від скла, сорбують не ДНК, а навпаки, домішки, що заважають реакції. Як правило, ця технологія включає дві стадії: кип'ятіння зразка і сорбція домішок на іонообміннику. Метод надзвичайно привабливий простотою виконання і в більшості випадків він придатний для роботи з клінічним матеріалом.

При масовому скринінгу, коли важливо отримати статистичні дані, можливе використання простих методів із застосуванням детергентів або обробки біологічного матеріалу лугами з подальшою їх нейтралізацією. В той же час, використання подібних методів підготовки зразків для клінічної діагностики може призводити до псевдонегативних результатів, внаслідок використання в реакційній суміші неякісного препарату ДНК.

Зразки тканин, що отримують при хірургічних операціях, зазвичай фіксують формаліном і заливають в парафін. Такі фіксовані препарати також можуть використовуватися для проведення ПЛР.

Ферменти, які використовуються для генно-інженерних досліджень. Рестрикційні ендонуклеази (рестриктази).

Одним з перших і найважливіших кроків молекулярної біології стала можливість розрізати молекули ДНК, причому в чітко визначених місцях. Цей метод винайдено при вивченні в 1950-1970-х роках феномену деяких видів бактерій, які при додаванні в середовище сторонньої ДНК руйнували її, а в той час їх власна ДНК залишалася неушкодженою. Встановили, що вони для цього використовують *рестрикційні нуклеази* або рестриктази. Якщо в 1976 р. були відкриті 84 рестриктази, то зараз відомо понад 3000 рестриктаз, які мають близько 200 специфічних сайтів рестрикції. Нові ендонуклеази продовжують відкривати і до цього дня. Важливою властивістю кожного подібного ферменту є його здатність розрізати чітко визначену — цільову — послідовність нуклеотидів ДНК (рис. 11.1). Рестриктази не впливають на власну ДНК клітини, оскільки нуклеотиди в цільових послідовностях модифіковані так, що рестриктаза не може з ними працювати. Іноді, навпаки, вони можуть *розрізати* тільки модифіковані послідовності, н., для боротьби з вірусами, які модифікує ДНК, захищаючись від рестриктаз. Через те, що цільові послідовності бувають різної довжини, їх частота в молекулах ДНК варіабельна, відповідно, що й фрагменти ДНК, які утворюються при обробці різними рестриктазами матимуть різну довжину.

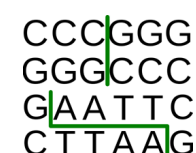


Рис. 11.1. Сайти рестрикції. Згори — цільова послідовність рестриктази *SmaI*, при роботі якої утворюються «тупі» кінці. Знизу — цільова послідовність рестриктази *EcoRI*, при роботі якої утворюються «липкі» кінці.

За виділення першої рестриктази, вивчення її властивостей і перше застосування для картировання хромосом Вернер Арбер (Werner Arber), Ден Натанс (Dan Nathans) і Гамільтон Смит (Hamilton Smith) в 1978 році отримали Нобелівську премію з фізіології і медицини.

Рестрикція ДНК. Рестрикція ДНК досягається за допомогою специфічних ферментів – рестриктаз – ендонуклеаз бактеріального походження, призначених для захисту клітин бактерій від вірусної ДНК. Рестриктази можуть здійснювати розриви фосфодієфірних зв'язків усередині полінуклеотидних ланцюгів ДНК. Вперше рестриктази були виявлені в клітинах кишкової палички (*E. coli*), заражених бактеріофагом λ . При цьому виявилось, що фагове

потомство, вирощене на двох різних штаммах цієї бактерії, з різною інтенсивністю розмножується в клітинах протилежних штамів.

Так, фаг, який вирощують на штамі С, погано розмножувався в клітинах бактерії штаму К12. Це обмеження розвитку (рестрикція) бактеріофага, як виявилось, пов'язане з ендонуклеазною деградацією його ДНК. Сама клітинна ДНК захищається від рестриктаз штам-специфічною модифікацією – метилуванням частини нуклеотидів, яке здійснюється особливим ферментом – ДНК-метилазою. Найчастіше продуктами метилування є 6-метиладенін і 5-метилцитозин.

Таким чином, присутність в клітинах бактерій двох ферментів (рестриктази і ДНК-метилази) забезпечує комплексний захист її ДНК. Ця система рестрикції-модифікації (R-M-система), ймовірно, перешкоджає схрещуванню між різними видами і штамми бактерій і тим самим забезпечує збереження їх видів в еволюції.

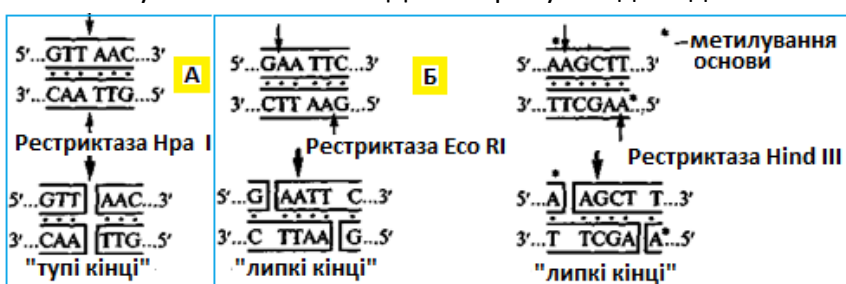
У генетичній інженерії рестриктази використовуються для фрагментації молекул ДНК при створенні рекомбінантних геномів. Починаючи з перших робіт Д.Натанса і Г.Сміта (1962), число відкритих рестриктаз швидко зростало, і в 1973 р. Сміт і Натані запропонували номенклатуру рестриктаз, яка включає наступні пункти:

- 1) назва рестриктази формується з родової і видової назви мікроорганізму-хазяїна, що містить, R-M-систему; при цьому до першої заголовної літери родової назви додаються дві перші рядкові літери виду, наприклад: *Escherichia coli* - Eco, *Haemophilus influenzae* – Hin;
- 2) за родо-видовою назвою, у разі потреби, проводиться позначення штаму (*Eco* B) або серотипу (*Hin* d);
- 3) різні R-M-системи, властиві одному виду бактерій, позначаються римськими цифрами: *Hind* I, *Hind* II, *Hind* III;
- 4) якщо R-M-система локалізована в геномі плазміді, то після родо-видової назви вказується символ плазміді: *Eco* RI.

Основою для класифікації рестриктаз служить характер їх дії на ДНК і залежність від кофакторів. Серед декількох тисяч відомих до теперішнього часу рестриктаз виділяють три класи (типи). Рестриктази типу I містять три неідентичні субодиниці з мол. масами 135, 60 і 50 кДа (α , β і γ) і масою епімолекули близько 500 кДа. Ці рестриктази специфічні для неметильованої дволанцюгової ДНК і вимагають присутності кофактора S-аденозилметіоніна (донора метильних груп в реакції метилування), а також АТР (АТФ) і Mg^{2+} .

Субодиниці рестриктаз типу I мають різні функції: α -субодиниці здійснюють розщеплення ДНК, β -субодиниці здатні метилувати ДНК, γ -субодиниці впізнають специфічні послідовності ДНК. В той же час розриви в ланцюгах ДНК під дією цих рестриктаз відбуваються випадковим чином на значній відстані від ділянки впізнавання, а продукти розщеплення виявляються дуже гетерогенними, що обмежує їх використання в генетичній інженерії.

Рестриктази типу II складаються з двох субодиниць одного виду, мають масу епімолекули близько 100 кДа і потребують для здійснення нуклеазної активності тільки іони Mg^{2+} (метилази цієї системи є самостійними ферментами).



Mg^{2+} (метилази цієї системи є самостійними ферментами).

Рис. 11.2. Дія рестриктаз типу II: А – утворення «тупих кінців»; Б – утворення «липких кінців».

Рестриктази цього типу впізнають в ДНК послідовності

з 4-8 нуклеотидів, що мають вісь симетрії другого порядку. Вони гідролізують фосфодієфірні зв'язки в двох ланцюгах ДНК, здійснюючи або симетричні, або несиметричні розриви в зоні паліндрому. В першому випадку утворюються так звані «тупі кінці» (рис. 11.2 А), а в другому

випадку дія рестриктаз призводить до утворення «липких кінців» (рис. 11.2 Б).

Висока специфічність дії, що призводить до утворення певних ділянок (сайтів) рестрикції, визначила підвищений інтерес до рестриктаз типу II, які стали найважливішим інструментом генетичної інженерії. Цілеспрямований пошук рестриктаз цього типу, які дозволяють проводити картирування геномів по різних сайтах рестрикції, а також вирізати певні ділянки, розташовані між цими сайтами (рестрикційні фрагменти), і комбінувати ці ділянки, привів до того, що число відомих рестриктаз типу II стало швидко зростати.

Рестриктази виділені з різних джерел, які мають однакову специфічність стали називати ізошимеразами. В таблиці наведені назви деяких широко використовуваних рестриктаз і позначення відповідних сайтів рестрикції:

Останнім часом серед рестриктаз типу II відкриті ферменти, що розпізнають не паліндромні структури і розщеплюють ДНК на чітко фіксованій відстані від ділянки впізнавання з утворенням як «тупих», так і «липких кінців». Їх відносять до підкласу IIS (shift - перестановка, зрушення). З них особливо цікаві експериментаторам ті, які утворюють досить довгі «липкі кінці». У кожному місці гідролізу молекули ДНК, що вивчається, такі «липкі кінці» мають унікальну послідовність. Це дозволяє направлено об'єднувати утворені цими рестриктазами фрагменти з відновленням початкової структури ДНК, як, наприклад, це було зроблено відносно фага *f1* з використанням рестриктази *Hpa I*. Ще один фермент цього підкласу – *Bbu I* (з *Bacillus brevis*) – впізнає в ДНК послідовність, що має структуру

| <i>Рестриктаза</i> | <i>Сайт рестрикції</i> |
|--------------------|------------------------|
| <i>A1u</i> | <i>AI</i> |
| <i>Bam III</i> | <i>B</i> |
| <i>Eco RI</i> | <i>E</i> |
| <i>Eco RII</i> | <i>E₂</i> |
| <i>Hind III</i> | <i>III</i> |
| <i>Hpa I</i> | <i>HI</i> |
| <i>Sau 3A</i> | <i>S₃</i> |

GCAGC(N)₈

CGTCCG(N)₁₂

і розщепляє ДНК по одному з ланцюгів на відстані 8 нуклеотидів від сайту впізнавання, а по іншому ланцюгу – на відстані 12 нуклеотидів від ділянки, яку впізнає.

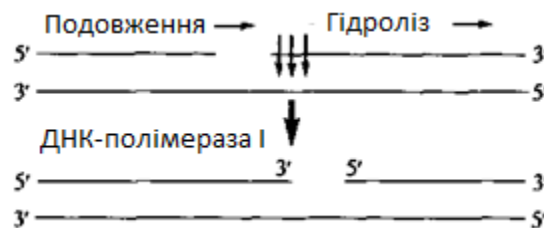
Рестриктази типу III подібні до ферментів типу I. Для прояву активності вони потребують АТФ, Mg²⁺ і S-аденозилметионін. Ці рестриктази складаються з 2 типів субодиниць (рестриктази і метилази). Вони впізнають непаліндромні послідовності довжиною 5-6 н.п. і розщепляють ДНК на відстані 24-25 н.п. від сайтів впізнавання. Вичерпного гідролізу ДНК вони не роблять.

Окрім бактерій рестриктази виявлені у дріжджів *Sachramyces cerevisiae* і одноклітинних водоростей *Chlamydomonas reinhardtii* і вони за властивостями нагадують рестриктази типу III. У водоростей рестриктаза *Cpe I* виявлена тільки в зиготах і активна у відношенні тільки ДНК хлоропластів одного з партнерів. В генетичній інженерії рестриктази (особливо типу II) використовують для отримання бібліотек, або банків ДНК генома. При обробці хромосомної ДНК рестриктазами (метод дробовика - "shotgun") одержують величезну кількість фрагментів ДНК (105-107 фрагментів з геному ссавців). Далі шляхом використання плазмід і їх клонування отримують мільйони колоній клітин бактерій або дріжджів, кожна з яких містить плазмиду з різними фрагментами ДНК. Це і є бібліотека, або банк ДНК генома. Відповідний банк був створений і використаний при вивченні структури геному людини.

Для створення нових молекул ДНК, зрозуміло, окрім розрізання, потрібна ще і можливість зшивання двох ланцюгів. Це робиться за допомогою ферментів ДНК-лігаз, які зшивають цукрово-фосфатний остов двох ланцюгів ДНК.

ДНК-лігаза фермент, який каталізує синтез фосфодиефірного зв'язку в дволанцюговій ДНК. Найчастіше в генетичній інженерії використовується ДНК-лігаза фага T4, яка у присутності АТФ зшиває фрагменти ДНК, як з «липкими», так і з «тупими» кінцями.

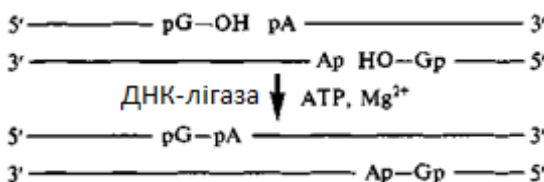
Цей фермент складається з одного поліпептидного ланцюга (68 кДа) і прискорює синтез фосфодієфірного зв'язку між 5'-фосфатним (5'-P) і 3'-гідроксильними кінцями (3'-ОН) ланцюгів ДНК. При лігуванні липких кінців реакція йде за схемою



Частим випадком цієї реакції є лігування нік-розриву в одному з ланцюгів ДНК.

ДНК-полімераза E.coli відкрита А.Корнбергом і співавт. у 1958 р. Цей фермент, назвали ДНК-полімеразою I, він складається з одного поліпептидного ланцюга (103 кДа) і має трьохдоменну структуру. Кожен домен має певну ферментативну активність: N-кінцевий домен 5'→3' – екзонуклеазну; С-кінцевий домен 5'→3' – полімеразну (нуклеотидилтрансферазну); а середній домен 3'→5' – екзонуклеазну. N-кінцевий домен може бути вирізаний з використанням протеаз (трипсином, субтилізином та ін.); частина молекули (68 кДа), що залишається, фрагмент Кльонова – зберігає властиві йому каталітичні активності.

За рахунок 5'→3'-нуклеазної активності ДНК-полімераза I здатна вирізати нуклеотиди з 5'-кінця одного ланцюга ДНК (у спарених ділянках), яке відбувається в місці нік-розриву. При цьому одночасно йдуть дві реакції: 5'→3' екзонуклеазний гідроліз і 5'→3' полімеразна реакція. В цьому випадку відбувається процес «перенесення» одноланцюгового розриву вздовж ланцюга ДНК - нік-трансляція: →



Якщо використовувати в приведеній реакції радіоактивні нуклеотиди, то можна отримувати мічену ДНК. Розрив (нік) зазвичай проводять, додаючи до препарату ДНК невелику кількість ендодезоксирибонуклеази (ДНКази I з підшлункової залози бика), для утворення початкового пролому в ланцюзі, який необхідний для приєднання ферменту і запуску нік-трансляції. Ця реакція *in vivo* відіграє важливу роль в репарації пошкодженої ДНК.

Нуклеази, специфічні відносно одноланцюгової ДНК, виділені з різних об'єктів: пліснявого гриба *Aspergillus oryzae*, *Neurospora* та ін. Нуклеаза SI, яка виділена з *A. oryzae*, використовується в генетичній інженерії для вирізання шпильки (одноланцюгової ділянки) ДНК при отриманні кДНК за допомогою зворотної транскриптази.

РНКази H специфічно розщепляють ланцюг РНК в дуплексі РНК:ДНК. РНКаза H *E.coli* є ендорибонуклеазою, продукти дії якої олігорибонуклеотиди. Вона широко використовується у ряді методів генетичної інженерії. Клітини еукаріот також містять ендонуклеазу такого типу. Ендонуклеазна активність РНКази H властива і зворотним транскриптазам ретровірусів.

Зворотна транскриптаза (ревертаза). У 1964 р. Г.Тьомін висунув гіпотезу про існування специфічних для РНК-вмісних ретровірусів ферментів, які здатні синтезувати ДНК на матриці РНК, а в 1970 р. Г.Тьомін і С.Мизутані, а також незалежно від них Д.Балтімор відкрили цей фермент у віруса саркоми Рауса. Ця РНК-залежна ДНК-полімераза отримала назву зворотна транскриптаза, або ревертаза. Найбільш вивчена ревертаза вірусів птахів складається з двох субодиниць - α (65 кДа) і β (95 кДа) і володіє принаймні трьома активностями: ДНК-полімеразною (може використовувати як матрицю РНК, так і ДНК); активністю РНКази H (гідролізує РНК у складі гібрида РНК:ДНК, але не атакує вільну РНК); ДНК-ендонуклеазною активністю. Перших дві активності ферменту використовуються для синтезу ДНК за матрицею вірусною РНК, яка потім інтегрується в геном клітини-хазяїна. Ендонуклеазна активність використовується для внесення розривів в ланцюзі ДНК-хазяїна. Показано, що β-субодиниці ревертази мають усі три активності, α-субодиниця – тільки

активності ДНК-полімерази і РНКазі Н. Приманкою (праймером) для полімеразної реакції можуть слугувати невеликі ділянки одноланцюгових молекул ДНК або РНК (а також тРНК).

Електрофорез ДНК. Експериментаторам часто доводиться мати справу з сумішшю молекул ДНК різної довжини. Наприклад, при обробці рестриктазами хімічно виділеною з організму ДНК утворюється суміш фрагментів ДНК з різною довжиною.

Молекули ДНК у водному розчині негативно заряджені, є можливість розділити фрагменти ДНК різних розмірів за їх довжиною методом електрофорезу. ДНК вводять в гель (агарозний - для відносно довгих молекул або поліакриламідний – для електрофорезу з високим ступенем розділення), який поміщають в постійне електричне поле. Молекули ДНК рухатимуться до позитивного *електроду* (аноду), причому їх швидкість руху залежить від довжини молекули (чим вона довша, тим сильніше їй заважає рухатися гель і менша швидкість руху). Після електрофорезу суміші фрагментів різної довжини в гелі утворюють смуги, які відповідають довжині фрагментів. За допомогою маркерів можна встановити довжину молекул у зразку (рис.11.3). Побачити результати електрофорезу можна двома способами. Перший, шляхом додавання речовин, що флуоресціюють у присутності ДНК (традиційно використовувався токсичний бромистий етидій, останнім часом використовують інші безпечніші речовини). Бромистий етидій світиться помаранчевим світлом при опроміненні ультрафіолетом, причому при зв'язуванні з ДНК інтенсивність світіння зростає на декілька порядків (рис. 11.4).

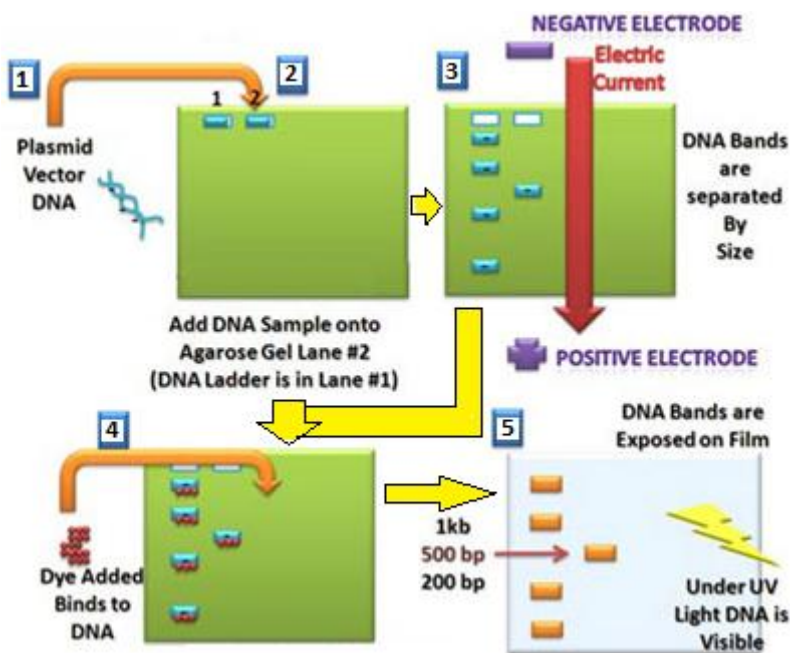


Рис. 11.3. Схема проведення електрофорезу ДНК в агарозному гелі.

Інший метод полягає у використанні радіоактивних ізотопів, які при аналізі необхідно додати до складу ДНК. В цьому випадку на гель зверху кладуть фотопластину, яка засвічується над смугами ДНК за рахунок радіоактивного випромінювання (метод *авторадіографії*).

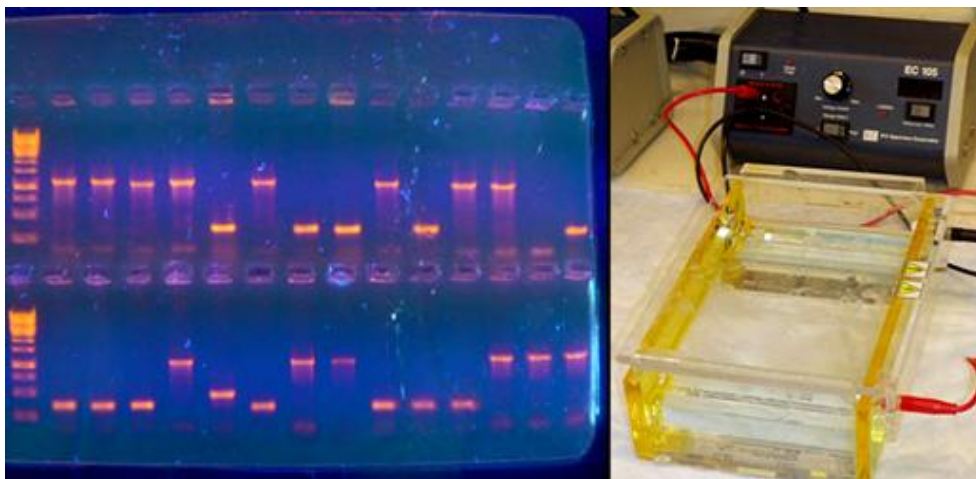


Рис. 11.4. Електрофорез в агарозному гелі з використанням бромистого етидія для візуалізації результатів в ультрафіолеті. Перша доріжка — маркер з фрагментів відомої довжини.

Окрім «звичайного» електрофорезу в пластині з гелю, в деяких випадках використовують

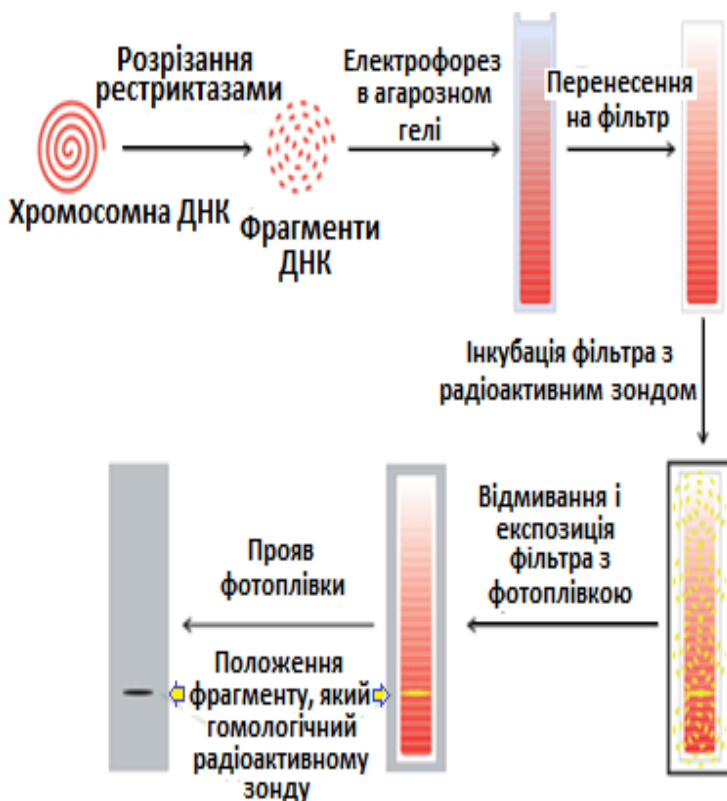
капілярний електрофорез, який проводять в дуже тонкій трубочці, що заповнюється

поліакриламідним гелем. Роздільна здатність такого електрофорезу значно вища, за його допомогою можна розділяти молекули ДНК, що відрізняються по довжині всього на один нуклеотид.

Ідентифікація фрагментів ДНК і РНК методами гібридизації.

Гібридизація з ДНК-зондами. Тривалий час, до розробки ПЛР, єдиними методами виявлення і виділення специфічних фрагментів ДНК (геномів і кДНК) з метою їх наступного вивчення були гібридизація з ДНК-зондами і клонування, незважаючи на цілий ряд обмежень їх застосування. Основні обмеження: великий розмір досліджуваних фрагментів, які значно більші довжини ДНК-зондів, це перешкоджає прямому молекулярному аналізу; неможливість довільного вибору кінців послідовностей, що вивчаються і які відповідають сайтам рестрикції в початковій молекулі ДНК; необхідність великої кількості добре очищеної ДНК генома (не менше 10 мкг на одну реакцію, що рівноцінно 0,5-1 мл крові). Для гібридизації генома необхідні радіоактивні ДНК-зонди з високою питомою активністю (не менше 10⁹ імп./хв. мкг), які діють обмежений проміжок часу, і спеціально обладнаного ізотопного блоку. До того ж тривала експозиція автографів значно подовжує час отримання результатів. Усе це, а також велика трудомісткість досліджень, обмежують використання методів блот-гібридизації і клонування для швидкої пренатальної діагностики плоду і діагностики спадкового захворювання, при загибелі хворого, коли неможливо отримати велику кількість ДНК). Але ці методи не втратили своєї актуальності і використовуються для картування і вивчення нових генів.

ДНК-зонд – одноланцюгова ДНК (10-1000 нуклеотидів), яка використовується для пошуку комплементарних послідовностей в молекулі більшого розміру або серед безлічі різноманітних молекул ДНК. ДНК-зонди можна синтезувати штучно або виділити з генома. Потім ці послідовності клонують, щоб мати можливість отримувати їх в будь-який час і в необмеженій кількості.



Суміш фрагментів ДНК розділяють за допомогою електрофорезу. Розділені фрагменти ДНК з гелю переносяться на лист нітроцелюлози або нейлону за рахунок блоттинга: гель лежить на губці у ванночці з розчином луку, який просочується через гель і нітроцелюлозу за рахунок капілярного ефекту від паперових рушників, складених згорі. Луг викликає денатурацію ДНК, і на поверхню пластини нітроцелюлози переносяться та закріплюються одноланцюгові фрагменти. Лист нітроцелюлози акуратно знімають з гелю обробляють радіоактивно міченим ДНК-зондом, який комплементарний до специфічної послідовності ДНК. Лист нітроцелюлози відмивають, на ньому залишаються тільки ті зонди, які гібридувалися з ДНК. Після авторадіографії ДНК, з якою гібридувався зонд, буде виявлятися смуга на фотопластині.

Блот-гібридизація – високочутливий метод ідентифікації специфічних послідовностей ДНК. Гібридизація ДНК ґрунтується на утворенні водневих зв'язків між двома комплементарними ланцюгами ДНК, що призводить до їх з'єднання. Залежно від типу

речовини, що вивчається, способів його попередньої обробки і перенесення (блоттинга) розрізняють декілька різновидів цього методу. Саузерн-блот, або блот-гібридизація по Саузерну – найбільш ефективний метод ідентифікації певних молекул ДНК серед фрагментів розділених електрофорезом (запропонований в 1975 р. Едвардом Саузерном).

Для виявлення певної послідовності ДНК в суміші за допомогою Саузерн блоттингу ДНК обробляють однією або декількома рестриктазами і фрагменти, що утворилися, розділяють по відносній молекулярній масі в агарозному або акриламідному гелі. Далі фрагменти ДНК піддають денатурації *in situ* і переносять з гелю на щільний носій. Блоттинг (перенесення) здійснюється за рахунок дії капілярних сил, електричного поля або вакууму. Далі фіксовану на цьому носії ДНК гібридизують з радіоактивно міченим ДНК- або РНК-зондом. Потім положення фрагмента ДНК генома на електрофореграмі визначають методом радіоавтографії. При тривалій експозиції (протягом декількох днів) і при високій питомій радіоактивності ДНК-зонду цей метод дозволяє виявляти менш ніж 0,1 пг ДНК. Етапи блот-гібридизації схематично представлені на рисунку 11.5.

За допомогою електрофорезу можна визначити тільки розмір молекул ДНК в розчині. Методом гібридизації ДНК можна визначити, яка із смуг містить фрагмент із визначеною послідовністю нуклеотидів. Для проведення гібридизації синтезують *ДНК-зонд* (одноланцюгова молекула ДНК), комплементарний потрібній послідовності нуклеотидів. Зонд гібридується тільки з комплементарною послідовністю, а за рахунок флуоресцентної мітки або радіоіотопів, вбудованих в зонд, його можна побачити.

Методи дот- і слот-гібридизації дістали свої назви залежно від форми плями ДНК на фільтрі - округлої або довгастої, відповідно. На тверду матрицю препарати ДНК і РНК наносяться краплинно. Принципова відмінність цих методів в тому, що з міченим ДНК-зондом гібридизуються молекули ДНК або РНК без попередньої обробки рестриктазами і електрофорезу.

Адаптація цієї методики для визначення специфічних послідовностей РНК називається нозерн-блоттингом (*northern blotting*: *southern* - «південний», а *northern* — «північний»). В цьому випадку проводять електрофорез в гелі з молекулами мРНК, а в якості зонду використовують одноланцюгові молекули ДНК або РНК.

Блот-гібридизація – високочутливий, але дорогий і трудоємкий метод виявлення специфічних послідовностей ДНК. Метод нозерн-блот-гібридизації – *Northern-blot* використовується для визначення рівня експресії гена шляхом кількісної оцінки іРНК. Метод складний і тривалий за виконанням (5-7 діб). Труднощі пов'язані з блокуванням РНКаз, які надзвичайно стабільні і стійкі до багатьох хімічних процедур, що використовуються при екстракції РНК. Ці методи також використовуються в дослідженнях геномної структури ДНК (РНК) та для виявлення точкових мутацій.

Метод вестерн-блот-гібридизації (*Western-blot*) або імуноблот – це зв'язування білків розділених електро-форезом, які зафіксовані на фільтрах, з міченими антитілами.

Перераховані види блот-гібридизації мають ряд недоліків: необхідність використання добре очищених препаратів ДНК і радіоактивних зондів, тривалість і трудомісткість процедури. Усе це робить ці методи дуже дорогими. Проте, блот-гібридизація не втратила свого значення і нині. Використання різних варіантів нерадіоактивного мічення (біотин- або флуоресцентномічені ДНК-зонди, ДНК, що забарвлені нітратом срібла) дозволяє застосовувати цей метод для діагностики генних хвороб.

З виростанням цих методів можна клонувати ділянку генома (н., певний ген). У геномі будь-який ген займає певний локус – ділянку ДНК. Клонування ДНК – ампліфікація – це створення великого числа копій її фрагмента для отримання в достатній для вивчення кількості. Існує два основні варіанта клонування: використання організмів (зазвичай бактерій

Escherichia coli — кишкової палички, або дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*), які швидко діляться (рис. 11.6), або клонувати *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

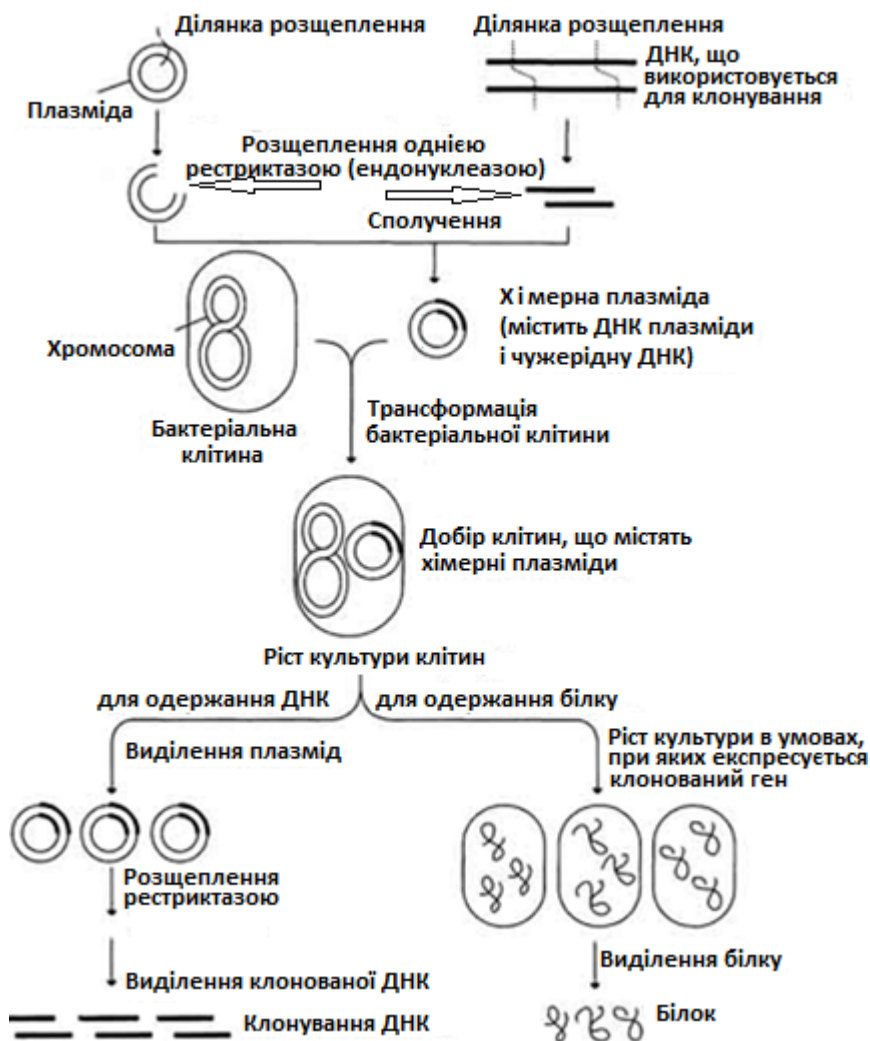


Рис. 11.6. Схема клонування ділянки ДНК (гена) у бактеріях.

Гібридизація *in situ*. Метод гібридизації з ДНК-зондами на гістологічних або хромосомних препаратах, який не вимагає попереднього виділення і очищення ДНК. Найширше використовується FISH (від англ. fluorescent *in situ* hybridization) – варіант методу, при якому в якості зондів використовують препарати ДНК або РНК, які мічені флуорохромами. Мічений ДНК-зонд наносять на препарати диференціально забарвлених і підготовлених для гібридизації (денатурованих) метафазних хромосом.

Після видалення молекул ДНК і специфічної обробки, яка залежить від типу використаного зонду, місця хромосомної локалізації послідовностей ДНК, комплементарної відповідним ДНК-зондам, спостерігають в мікроскоп характерні точки, що світяться.

Гібридизація *in situ* – один з найбільш ефективних методів картування послідовностей ДНК на хромосомах за допомогою комплементарних ДНК-зондів. Його застосовують при дослідженні послідовностей геному, що повторюються; ДНК клонованих послідовностей, ДНК невідомого походження; при визначенні хромосомної належності і внутрішньохромосомної локалізації унікальних генів, взаємного розташування клонованих фрагментів ДНК навіть в межах одного хромосомного локуса. Роздільна здатність FISH-метода досягає декількох хромосомних бендів: при проведенні гібридизації *in situ* на інтерфазних хромосомах людини вона може досягати 50 тис. п.н., що складає близько 5% величини середнього хромосомного бенда.

Гібридизація *in situ* молекул РНК з кДНК-зондами, що проводиться на гістологічних препаратах, ефективно використовується для аналізу тканиннспецифічного розподілу і внутрішньоклітинної локалізації мРНК.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) — молекулярно-генетичний метод, що дозволяє добитися колосального (>1000 разів) збільшення числа копій певного фрагмента ДНК *in vitro*. Вона була винайдена Кэри Мюллісом (Kary Mullis) в 1983 році, за що в 1993 році він отримав Нобелівську премію з хімії (у співавторстві з М. Смітом).

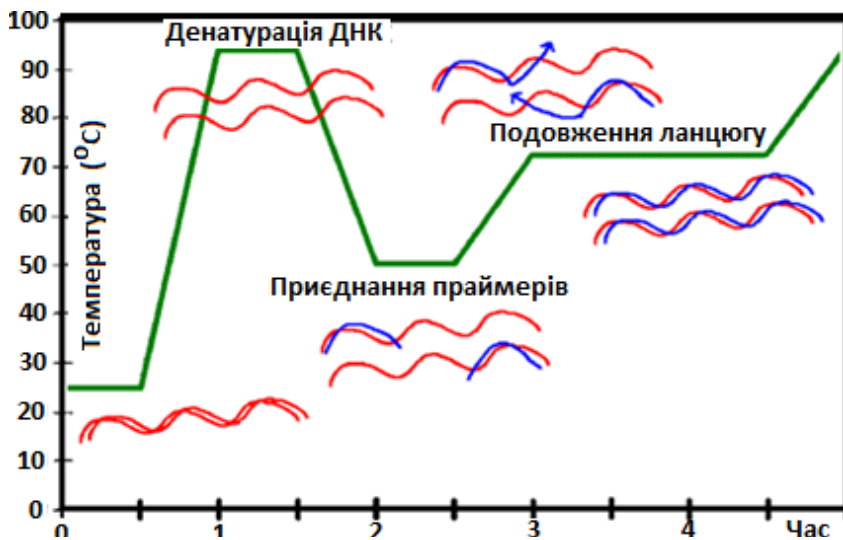
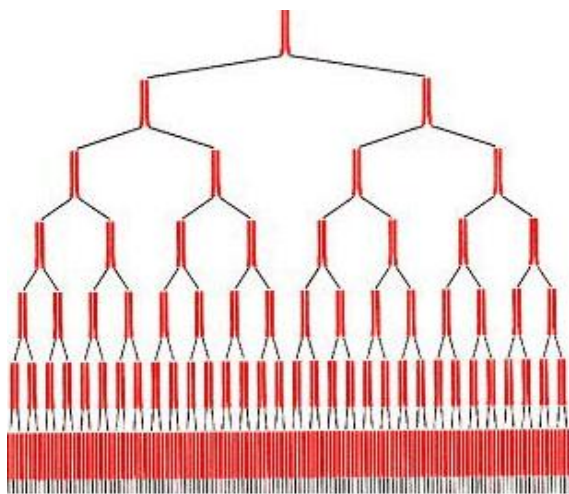


Рис. 11.7. Схема ПЛР.

Метод ґрунтується на багаторазовому виборчому копіюванні ділянки ДНК за допомогою ферментів в штучних умовах. При цьому відбувається копіювання тільки певної ділянки ДНК, яка також є в досліджуваному зразку. На відміну від реплікації ДНК в клітинах живих організмів, за допомогою ПЛР ампліфікують порівняно короткі ділянки ДНК (≤ 3000 п. н.), проте є методи, які дозволяють копіювати ділянки до 20 тис. п. н. — Long Range PCR. Фактично, ПЛР є штучною багатократною реплікацією фрагмента ДНК (рис. 11.7). ДНК-полімерази самостійно не можуть синтезувати нову ДНК, маючи в наявності матрицю (фрагмент ДНК) і мономери (нуклеотиди). Для синтезу потрібна ще і приманка (праймер), з якого розпочинається синтез. Праймер — це короткий одноланцюговий фрагмент нуклеїнової кислоти, комплементарний ДНК-матриці. При реплікації в клітині такі праймери (короткі молекули РНК) синтезуються спеціальним ферментом *праймазою*, які пізніше замінюються на ДНК. В ПЛР використовують штучно синтезовані молекули ДНК, оскільки в цьому випадку не потрібна стадія видалення РНК і синтезу на їхньому місці ДНК. У ПЛР праймери також обмежують ампліфікаційну ділянку з обох боків.



Для проведення ПЛР спочатку готують реакційну суміш до якої входять: ДНК-матриця, праймери, ДНК-полімераза, вільні нуклеозиди, а також деякі інші речовини, що покращують роботу полімерази (їх додають в спеціальні буфери, які використовують в реакції).

Рис. 11.8. З кожним циклом ПЛР кількість цільової ДНК подвоюється.

Щоб синтезувати ДНК, комплементарну матриці, необхідно, щоб один з праймерів утворив з нею водневі зв'язки. Але ж ДНК-матриця є дволанцюговою спіраллю. Тому спочатку необхідно розплавити ДНК — тобто зруйнувати водневі зв'язки. Роблять це за допомогою простого нагрівання (до $\approx 95^\circ\text{C}$) — стадія денатурації. Потім температуру знижують ($50\text{--}65^\circ\text{C}$), праймери відпалюють, після чого температуру трохи піднімають до 72°C (для оптимальної роботи полімерази). І тоді полімераза починає синтезувати комплементарний матриці ланцюг ДНК — це стадія елонгації (рис.11.7). Після одного такого циклу кількість копій необхідних фрагментів ДНК подвоюється. Синтез повторюється декілька десятків разів і з кожним повтором кількість копій фрагмента ДНК подвоюється, причому нові синтезовані молекули теж стають матрицями (рис. 11.8). Побачити результати ПЛР дуже легко: досить провести електрофорез реакційної суміші після ПЛР і можна бачити яскраву смугу з отриманими копіями ДНК.

При проведенні ПЛР найчастіше використовується термостабільна ДНК-полімераза з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*, яку скорочено називають ДНК-полімераза Taq.

Щоб уникнути сильного випаровування води з реакційної суміші, в неї додають олію, що покриває її згори, і накривають кришкою *термоциклера* (прилад, в якому проводять ПЛР). *Термоциклер* швидко змінює температуру зразків, і їх не доводиться постійно переключати з одного термостата в інший. Для попередження неспецифічного синтезу використовують ПЛР з «гарячим стартом»: ДНК і полімераза розділяються між собою парафіновим прошарком, який плавиться при високій температурі і дає їм взаємодіяти в сприятливих умовах. Іноді використовують полімерази, які не працюють при низькій температурі.

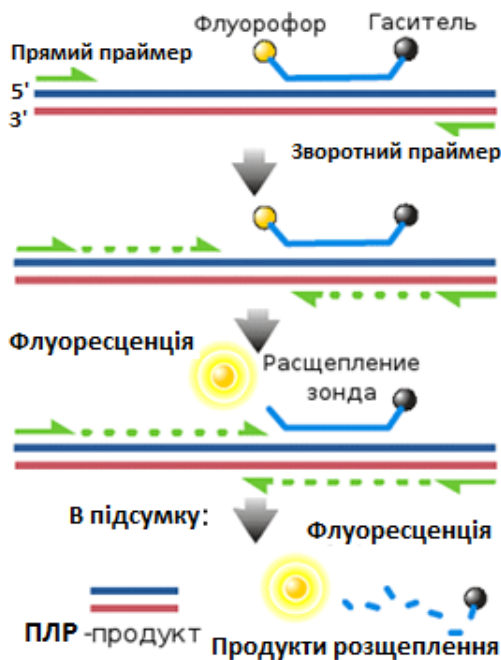


Рис. 11.9. Схема роботи ПЛР «в реальному часі».

Важливою є оцінка результатів ПЛР. Зараз розроблені методи визначення альтернативні класичному електрофорезу. Наприклад, досить простим варіантом є додавання в реакційні зразки перед початком реакції речовини, що флуоресцюють у присутності ДНК. Тоді, порівнявши первинну флуоресценцію з кінцевою, можна побачити, чи синтезувалася значна кількість ДНК або ні. Але цей спосіб неспецифічний: не можна визначити, чи синтезувався необхідний фрагмент, або відбулося злипання праймерів і вони добувалися до непередбачуваних послідовностей.

ПЛР в реальному часі. ПЛР в реальному часі (або «кількісна ПЛР») – це лабораторний метод, основою якого є ПЛР. Даний метод використовується для одночасної ампліфікації та вимірювання кількості заданої молекули ДНК. Існує декілька варіантів цього методу, але ідея одна і та ж: можна в ході реакції безпосередньо спостерігати за накопиченням продуктів ПЛР н., за флуоресценцією («ПЛР з реєстрацією флуоресценції в режимі реального часу»).

Відповідно, для проведення ПЛР «в реальному часі» потрібний спеціальний прилад, здатний збуджувати і розпочинати флуоресценцію в кожному зразку.

Оскільки кінетика накопичення продуктів ампліфікації пов'язана із вихідною кількістю матриці, це дає можливість точно оцінити її кількість (на відміну від фрагментного аналізу звичайної ПЛР, при якому оцінюємо якісні показники).

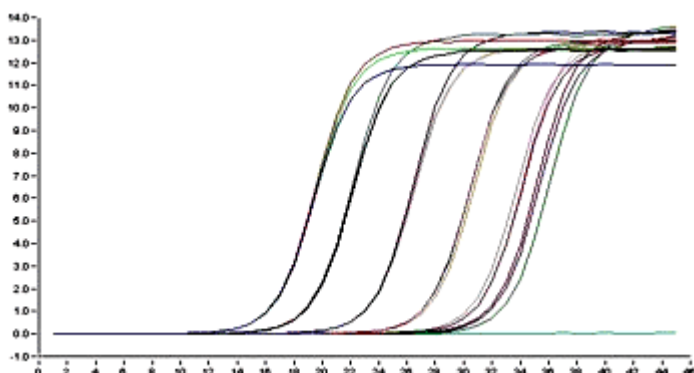


Рис. 11.10. Приклад кривих накопичення флуоресценції в ПЛР «в реальному часі»: залежність інтенсивності флуоресценції (у декількох зразках — на кожну своя крива) від номера циклу.

В результаті вимірювань змін флуоресценції, які в автоматичному режимі відбуваються в реальному часі під час ампліфікації, визначається кількість копій досліджуваної ділянки безпосередньо, або опосередковано відносно внесеної стандартній кількості ДНК чи додаткових калібрувальних генів.

За допомогою ПЛР в реальному часі можна також визначити специфічні однонуклеотидні заміни (SNPs). ПЛР в реальному часі не потребує стадії електрофорезу, дозволяє провести повний аналіз зразків впродовж 60-120 хвилин та теоретично дозволяє

детектувати навіть одну молекулу ДНК або РНК в зразку. Для постановки ПЛР в реальному часі потрібен спеціальний ампліфікатор із можливістю збуджувати та реєструвати флуоресценцію, яка відображує накопичення ампліконів, на кожному циклі ампліфікації.

Для кількісного аналізу використовують два підходи — використання флуоресцентних барвників, які інтеркалюють у дволанцюгові молекули ДНК в процесі ПЛР, та модифікованих дезоксинуклеотидів, які випромінюють світло після гібридизації із комплементарними ділянками ДНК. Спосіб детекції із використанням SYBR Green I базується на тому, що флуоресценція даного барвника значно зростає при його інтеркаляції у дволанцюгові молекули ДНК, це дозволяє спостерігати накопичення продуктів ампліфікації.

Найпопулярнішою реалізацією такого підходу є метод вирізання флуорофору за рахунок руйнування зонду (TaqMan Assay; рис. 11.9). В цьому випадку в реакційній суміші має бути присутній спеціальний одностанцюговий ДНК-зонд: молекула ДНК, комплементарна послідовності фрагмента, який ампліфікується і який буде розташований між праймерами. При цьому до одного його кінця приєднується *флуорофор* (флуоресцуюча молекула), а до іншого — погашувач (молекула, що поглинає енергію флуорофору і «гасить» флуоресценцію). Коли такий зонд буде знаходитися в розчині або буде комплементарно пов'язаний з цільовою послідовністю, флуорофор і погашувач будуть знаходитися відносно недалеко один від одного, і флуоресценції не спостерігається. Проте за рахунок 3'-екзонуклеазної активності, яку має Taq-полімераза (вона розщеплює ДНК, на яку «наштовхується» в ході синтезу, і на її місці синтезує нову), зонд при синтезі другого ланцюга руйнується, флуорофор і погашувач за рахунок дифузії віддаляються один від одного, і з'являється флуоресценція.

Оскільки число копій в ході ПЛР росте експоненціально, так само росте і флуоресценція. Проте це триває недовго, оскільки у визначений момент ефективність реакції починає падати внаслідок поступової інактивації полімерази, нестачі деяких компонентів. Аналізуючи графіки зростання флуоресценції можна встановити скільки ДНК-матриць було спочатку (quantitative PCR, qPCR).

Усі варіанти застосування ПЛР в науці неможливо перерахувати. Виділення фрагментів ДНК, секвенування, мутагенез. ПЛР — є найбільш досконалим діагностичним методом. Він широко застосовується в медицині для ранньої діагностики спадкових і інфекційних захворювань, визначення батьківства, в розслідуваннях для встановлення особи і для багато чого іншого.

Зараз усі основні молекулярно-біологічні процеси можуть бути легко проведені *in vitro*. ПЛР — це аналог реплікації ДНК. Для цього досить просто змішати необхідні реагенти у відповідних умовах. Для транскрипції потрібні ДНК-матриця, РНК-полімераза і рибонуклеотиди, для трансляції — мРНК, субодиниці рибосом і амінокислоти, для зворотної транскрипції — РНК-матриця, зворотна транскриптаза і дезоксирибонуклеотиди. Ці методи широко застосовуються в різних областях біології, коли необхідно, н., отримати чисту РНК певного гена. В цьому випадку спочатку проводять зворотну транскрипцію гена за матрицею мРНК, далі за допомогою ПЛР ампліфікують його, а потім за допомогою *in vitro*-транскрипції отримують багато мРНК. Перша стадія потрібна через те, що перед утворенням зрілої мРНК — матриці для синтезу білка, в клітині проходить процесинг і сплайсинг РНК (у еукаріот). Іноді цього вдається уникнути, якщо уся кодуюча послідовність гена розташована в одному екзоні.

Секвенування ДНК. Визначення нуклеотидної послідовності ДНК — секвенування важливе для багатьох фундаментальних і прикладних завдань. Особливе місце воно займає в науці: для аналізу результатів секвенування геномів була фактично створена нова наука — біоінформатика. Секвенуванням зараз користуються молекулярні біологи, генетики, біохіміки, мікробіологи, ботаніки і зоологи, і, звичайно ж, еволюціоністи: практично уся сучасна систематика ґрунтується на його результатах. Секвенування широко застосовується в медицині як метод пошуку спадкових захворювань і вивчення інфекцій.

Секвенування по Сенгеру було розроблене в 1977 році, а ПЛР, як говорилося вище, тільки в 1983-му. Існує безліч різних методик. Всі методи секвенування можна розділити на дві категорії: «класичні» і нового покоління. Зараз використовується фактично тільки один «класичний» метод — секвенування по Сенгеру, або метод термінаторів. В порівнянні з новими методами, у нього є важлива перевага: довжина прочитання – кількість нуклеотидів у послідовності, яку можна визначити за один раз, у нього вища — до 1000 нуклеотидів. В той же час у самого «кращого» «нового» методу секвенування — 454 нуклеотидів, при піросеквенуванні — ≤ 500 нуклеотидів.

Можливості нових методів обмежує довжина прочитання ДНК, а «зібрати» цілий геном з фрагментів розміром у декілька десятків нуклеотидів дуже складно. Як мінімум, для цього потрібні суперкомп'ютери, а деякі місця в геномі неможливо виявити, н., такі, що містять високоповторювальні послідовності. У такому разі може допомогти порівняння отриманих фрагментів із вже наявним цілим геномом, але таким чином неможливо прочитати геном організму вперше (*de novo*).

Розробляються методи нового покоління (н., «напівпровідникове секвенування»), що дозволяє читати декілька тисяч п.н, але з великими помилками (Pacific Biosciences). Нині поширений швидкий і дешевий метод (з розрахунку на один прочитаний нуклеотид) — метод, реалізований в секвенаторах Illumina. Основний його недолік — читання фрагментів дуже короткої довжини, не більше 100 нуклеотидів, і витікаюча звідси складність прочитання геному «з нуля». У цьому методі можна виділити три етапи: підготовку бібліотеки фрагментів (1), створення кластерів (2) і власне секвенування (3).

1. Спочатку створюється бібліотека фрагментів ДНК з генома, який секвенується або іншого джерела ДНК. ДНК за допомогою ультразвуку або спеціального ферменту розщеплюється на довільні фрагменти завдовжки в декілька сотень нуклеотидів, з яких вибираються ті, що мають задану довжину (це визначає експериментатор). Після цього до них з двох кінців приєднуються різні адаптерні послідовності.

2. Розчин фрагментів ДНК поступає на спеціальний мікрочіп з «пришитими» до нього фрагментами ДНК, комплементарними адаптерним послідовностям, — праймерам. Ділянки геномної ДНК прикріплюються за допомогою адаптерних послідовностей до молекул ДНК на чипі. За допомогою ДНК-полімерази в усіх таких фрагментах добудовується другий комплементарний ланцюг, який буде зв'язаний з праймером. Це повторюють кілька разів, після чого один з типів праймерів відрізають від молекули ДНК і в послідовності (кластері), що утворився, залишаються тільки однакові ланцюги. Всього на чипі утворюється і знаходяться сотні мільйонів таких кластерів.

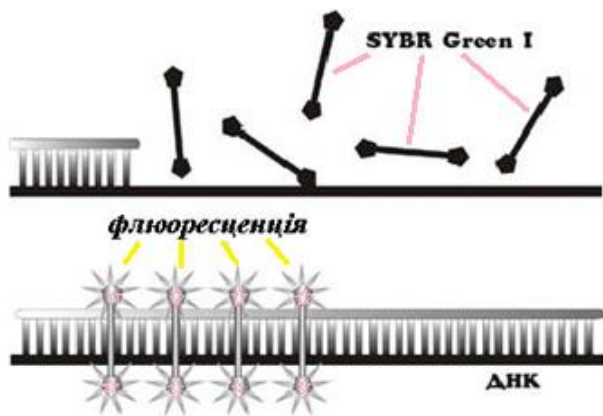


Рис.11.11. ДНК-діагностика з використанням флуоресцентних барвників.

3. Власне секвенування. До кластерів додають праймери, комплементарні одній з адаптерних послідовностей, з якої вони зв'язуються. Потім додають ДНК-полімеразу і спеціально модифіковані нуклеотиди з прикріпленим до них флуорофором (різним для різних типів нуклеотидів), після яких синтез блокується. Вони комплементарно приєднуються до молекул ДНК. Потім прилад сканує, який флуорофор з'явився в кожному кластері за кольором світінням в лазері, і комп'ютер запам'ятовує розташування кластерів. По цьому визначається, який нуклеотид вбудувався в ланцюг. Далі відщеплюються флуорофори від усіх нуклеотидів, і подальший синтез ланцюга розблоковується.

4. Все повторюється знову: додаються нуклеотиди, чіп сканується, щоб визначити, який нуклеотид приєднався до якого кластера і тому подібне. Таким чином секвенують до 100 нуклеотидів в кожному кластері, а усього кластерів може бути сотні мільйонів — у результаті можна секвенувати послідовності, які містять мільярди пар нуклеотидів.

Автоматизоване секвенування ДНК стало стандартним методом молекулярно-генетичної діагностики в багатьох клінічних лабораторіях молекулярної генетики і сприяло значному прогресу «Проекту геном людини». Секвенування ДНК особливо корисно у випадках невеликих генів і в ситуаціях, коли точна мутація у членів цієї сім'ї невідома. Усі виявлені зміни в структурі гена мають бути ретельно проаналізовані, щоб зрозуміти, чи вони викликають захворювання або відносяться до нормального поліморфізму.

Методи ДНК-діагностики. Дані методи є найбільш достовірними методами дослідження порушень ДНК при спадкових захворюваннях. Перевага ДНК-діагностики у порівнянні з іншими методами молекулярної генетики людини у тому, що ці методи дозволяють виявити та дослідити саме першопричину захворювання (ген, його локалізація, тип мутації). Ці методи дозволяють виявити навіть мінімальні порушення первинної структури ДНК (в тому числі одонуклеотидні заміни), які неможливо дослідити іншими методами. ДНК-діагностика є малоінвазивною процедурою (достатньо 1-2 мл крові, букального епітелію, або декількох клітин матеріалу плоду, взятого в першому триместрі вагітності). Крім того подібний аналіз у разі виявлення мутації не потребує повторення, достатньо одного дослідження. Основними методами ДНК-діагностики є: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), фрагментний аналіз продуктів ПЛР із використанням різних видів гель-електрофорезів ДНК, визначення нуклеотидної послідовності ДНК за допомогою секвенування, ПЛР в реальному часі.

Аналіз ПЛР-фрагментів ДНК. Фрагменти ДНК, які були синтезовані в ході ПЛР (копії досліджуваних ділянок ДНК), знаходяться у ампліфікаційній суміші у кількості, яка є доступною для якісної оцінки та аналізу нуклеотидного складу. Оскільки фрагменти ДНК є зарядженими молекулами, для їх подальшого аналізу ампліфікаційні продукти фракціонують за їх довжиною (звичайний фрагментний аналіз), або конформацією просторових структур (при DGGE- та SSCP-аналізі) із використанням різних видів електрофорезів. На електрофореграмі частіше за все візуалізують смуги (зони локалізації фрагментів одного розміру або конформації) із допомогою флуоресцентного барвника броміду етидія та реєструють фотографічно в УФ-світлі.

Реєстрація фрагментів ПЛР може відбуватися автоматично за допомогою різних типів аналізаторів флуоресценції (флюорометрів). Для цього необхідно мати ПЛР продукти, які мічені флуоресцентним барвником із спектральними характеристиками вівповідними типу лазерного детектора приладу.

В сучасних дослідженнях використовують фрагментний аналіз в горизонтальному агарозному гелі, в неденатуруючому поліакриламідному гелі, в денатуруючому градієнтному (DGGE-гель) та неградієнтному поліакриламідному гелі.

DGGE-аналіз. Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (DGGE) дозволяє встановити будь-які заміни в ланцюзі ДНК (в т.ч. одонуклеотидні). За результатами аналізу розрахунку профілів плавлення доменів для 35 тис. н.п. ДНК людини встановлено, що до 50-70% усіх замін пар основ можуть бути виявлені (Lerman L.S. et all, 1986). Згідно із методикою DGGE молекули ДНК нагрівають до температури початку денатурації і здійснюють її електрофоретичне розділення у ПАА гелі, який містить зростаючий градієнт концентрацій сечовини та формаміду. Фрагменти ДНК, просуваючись по гелю, потрапляють в таку концентрацію денатурантів, при якій легкоплавкі домени стають нестабільними та швидко плавляться, в результаті чого утворюється частково дисоційована та частково двохланцюгова структура. Такі молекули просуваються гелем повільніше, або взагалі застрягають.

Положення в гелі, при якому рух молекули ускладнюється є унікальним та характеризує кожний фрагмент послідовності ДНК. Таким чином, молекули, які відрізняються замінами у легкоплавкому домені можуть бути розділені в такому гелі завдяки різниці в температурі плавлення домену. Описаний метод є скринуючим, оскільки він дозволяє виявити певну ділянку гену, у якій наприклад, відбулася мутація, проте не дозволяє точно ідентифікувати виявлену мутацію. Для ідентифікації мутації проводять секвенування ділянки гену в якій був зареєстрований змінений електрофоретичний профіль.

Молекулярно-генетичні методи призначаються для виявлення варіацій в структурі досліджуваної ділянки ДНК (алелю гена, регіону хромосоми). В основі цих методів лежать маніпуляції з ДНК і РНК. Це складні методи діагностики, вимагають певних лабораторних умов і підготовки кваліфікованого персоналу. Молекулярно-генетичні методи проводять у декілька етапів. Перший етап усіх методів – отримання зразків ДНК або РНК. Для цього використовують краплю крові, лейкоцити, культури фібробластів, зіскоб епітелію з слизової оболонки, волоссяні цибулини. Виділена ДНК однаково придатна для проведення різних варіантів і може довго зберігатися в замороженому стані.

Наступним етапом молекулярно-генетичних методів є накопичення (ампліфікація) потрібних фрагментів ДНК. За допомогою методу ПЛР *in vitro* протягом короткого часу розмножується певна послідовність ДНК в кількості, що перевищує початкову в мільйон разів. Далі проводиться рестрикція ДНК на фрагменти за допомогою рестриктаз.

Розподіл фрагментів ДНК проводять методом електрофарезу на агарозном або поліакриламідному гелі. В процесі електрофарезу кожен фрагмент ДНК займає певне положення в гелі. Після обробки гелю етидію бромідом, який зв'язується з ДНК, проводять ультрафіолетове опромінення і виявляють ділянки свічення. Розроблені інші методи забарвлення гелю і виявлення фрагментів ДНК.

Показання до ДНК-діагностики.

Використання ДНК-діагностики рекомендується в наступних випадках:

- при спадкових захворюваннях, коли визначається в медико-генетичній консультації специфічний ризик народження дитини із спадковою патологією та попередження народження хворої дитини;
- при діагностики деяких форм безпліддя і патології вагітності;
- для визначення різних збудників інфекцій;
- для встановлення виду мутації при спадкових поліморфних хворобах;
- для ідентифікації особи, встановлення спорідненості та інших випадках.

Прямі і непрямі методи ДНК-діагностики. У гуманній медицині використовують прямі і непрямі методи ДНК-діагностики.

При прямій діагностиці виявляють генні мутації і їх типи, коли відома його екзон-інтронна організація або нуклеотидна послідовність повнорозмірної комплементарної ДНК. Прямі методи ДНК-діагностики виявляють мутації, що змінюють довжину розрізаних фрагментів ДНК, які виявляє електрофорез. Відомі мутації визначають за допомогою ферментів-рестриктаз, які розпізнають певні нуклеїнові послідовності. Рестриктази розрізають дволанцюгову ДНК в певних послідовностях з 4-8 нуклеотидів. Розрізані ділянки ДНК-мутанта відрізняються за довжиною від нормальних ділянок. Різниця в розмірах мутантних і нормальних ділянок ДНК визначається методом електрофарезу на агарозному або поліакриламідному гелі.

Для виявлення точкових мутацій використовують алельспецифічну полімеразну ланцюгову реакцію, яка дозволяє багаторазово збільшувати унікальну послідовність ДНК з наступним виявленням мутації.

Прямі методи відрізняються точністю, що досягає майже 100 %. Проте на практиці вказані методи можуть застосовуватися за певних умов,: 1) відома цитогенетична локалізація

гена, відповідального за розвиток спадкового захворювання, 2) клонуваним має бути ген захворювання і відома його нуклеотидна послідовність.

Метою прямої діагностики є ідентифікація мутантних алелей (порушень в первинній структурі ДНК, визначення типу мутацій). Висока точність методу прямої ДНК-діагностики в більшості випадків не вимагає ДНК-аналізу усіх членів сім'ї, оскільки виявлення мутації у відповідному гені дозволяє майже з 100-процентною точністю підтвердити діагноз і визначити генотип усіх членів сім'ї хворої дитини, включаючи гетерозиготних носіїв. Недоліком методу прямої ДНК-діагностики є необхідність знання точної локалізації гена і спектру його мутацій.

Мутаційна мінливість в сайтах рестрикції може бути визначена по зміні довжини рестрикційних фрагментів ДНК, які гібридизуються із специфічними ДНК-зондами (ПДРФ-аналіз; Restriction Fragment Length Polymorphism, або RFLP-аналіз). Метод ПДРФ-аналізу включає проведення декількох етапів дослідження: виділення ДНК генома; рестрикція виділеної ДНК за допомогою специфічних ендонуклеаз; електрофоретичний розподіл фрагментів ДНК; ідентифікація фрагментів ДНК, що містить поліморфний сайт рестрикції за допомогою блот-гібридизації по Саузерну. За відсутності рестрикції ДНК за даними радіоавтографії виявляють великий нерозрізаний фрагмент, або бенд, а за наявності рестрикції виявляють менший за розмірах фрагмент. У осіб, гомозиготних за визначеним спадковим захворюванням, виявлятиметься один бенд, тоді як у осіб, гетерозиготних по цьому спадковому моногенному дефекту, визначатимуться обидва фрагменти.

Методи прямої ДНК-діагностики показані для таких захворювань, як фенілкетонурія (мутація R408W), муковісцидоз (найбільш часта мутація delF508), хорея Гентингтона (експансія тринуклеотидних повторів – CTG-повтори) та ін. Проте до теперішнього часу гени багатьох захворювань не картировані, невідома їх екзон-інтронна організація, і багато спадкових хвороб характеризуються генетичною гетерогенністю, що не дозволяє повною мірою використовувати прямі методи ДНК-діагностики. Тому інформативність методу прямої ДНК-діагностики широко варіює. Так, при діагностиці хореї Гентингтона, ахондроплазії вона складає 100 %, при фенілкетонурії, муковісцидозі, адреногенітальному синдромі – 70-80%, а при хворобі Вільсона-Коновалова і міопатії Дюшена/Бекера - 45-60 %. У зв'язку з цим використовуються непрямі методи молекулярно-генетичної діагностики спадкових хвороб.

Непрямі методи ДНК-діагностики. Непряма ДНК-діагностика проводиться у випадках: 1) коли ген не ідентифікований, а лише картирований на певній хромосомі, 2) коли методи прямої ДНК-діагностики не дають результату (наприклад, через велику протяжність гена або широкому спектрі мутаційних змін, 3) при складній екзон-інтронній організації гена. При використанні непрямих методів ДНК-діагностики необхідним є сімейний аналіз алелей поліморфних маркерів. Для непрямой діагностики можуть використовуватися так звані гіперваріабельні повтори сателітів. Вони є більш інформативними методами, ніж ПДРФ-аналіз, оскільки мають високий рівень гетерозиготності і щільно розташовані в кожній з хромосом.

Останніми роками використовуються короткі тандемні повтори (STR-повтори, short tandem repeats), які стабільно успадковуються і мають великий рівень поліморфізму, а також короткі секвеновані послідовності ДНК з відомою генною локалізацією, так звані STS - повтори (sequence tagged sites). STS-повтори мають виражену індивідуальну специфічність, успадковуються відповідно законам Менделя і тому знаходять широке застосування для молекулярно-генетичної діагностики моногенних хвороб.

Непрямі методи ДНК-діагностики засновані на аналізі зчеплення з досліджуваним геном визначеного поліморфного локуса (маркера), за допомогою якого можна виробляти маркіровку як мутантних, так і нормальних алелів і проаналізувати їх серед родичів та передачу в поколіннях. Це особливо важливо при вирішенні питання про пренатальну

(допологову) діагностику спадкового захворювання. При використанні непрямих методів ДНК-діагностики слід пам'ятати – чим тісніше зчеплення між маркерним локусом і мутантним геном, тим точніше діагноз. Щоб звести до мінімуму помилку діагностики, необхідно по можливості використовувати внутрішньогенні маркери або використовувати два маркерних локуса, фланкують мутантну алель.

Мутаційна мінливість в сайтах рестрикції може бути визначена по зміні довжини рестрикційних фрагментів ДНК, які гібридизуються із специфічними ДНК-зондами (ПДРФ-аналіз; Restriction Fragment Length Polymorphism, або RFLP -аналіз).

Метод ПДРФ-аналізу включає проведення декількох етапів дослідження:

- виділення ДНК генома;
- рестрикція виділеної ДНК за допомогою специфічних ендонуклеаз;
- електрофоретичний розподіл фрагментів ДНК;
- ідентифікація фрагментів ДНК, що містять поліморфний сайт рестрикції за допомогою блот-гібридизації по Саузерну.

За відсутності рестрикції ДНК за даними радіоавтографії виявлятиметься великий (нерозрізаний фрагмент, або бенд). При наявності рестрикції виявлятиметься менший за розмірами фрагмент. У гомозиготних осіб, за геном, який визначає це спадкове захворювання, виявлятиметься один бенд, тоді як у гетерозиготних визначатимуться обидва фрагменти. ПДРФ-аналіз значно спрощується, якщо є можливість специфічної ампліфікації ділянки ДНК, що містить поліморфний сайт рестрикції. Проведення в цьому випадку ПЛР-реакції і рестрикції ампліфікованого фрагмента дозволяє провести тестування стану цього локусу.

Непрямі методи ДНК-діагностики можуть використовуватися як молекулярні маркери мутантних хромосом в сім'ях з високим ризиком та в пренатальній діагностиці для діагностики моногенних захворювань. Для цього необхідно знати про поліморфізм локуса і його локалізацію (знаходиться поблизу від мутантного гена або усередині нього). Тому для діагностики вимагається обстеження як можна більшого числа родичів (в першу чергу батьки-діти), щоб прослідкувати шлях передачі маркерів потомству. Це підвищує інформативність вибраного маркера.

ДНК-чіпи. Нанотехнологія – високотехнологічна галузь, спрямована на вивчення і роботу з атомами і молекулами. Однією зі сфер, в якій використовується нанобіотехнологія, є створення біочіпів (ДНК-чіпи, DNA-microarrays). Біочіп – це узагальнююча назва технології, що передбачає використання невеликого за розмірами твердого носія, на якому щільно нанесена велика кількість біологічних молекул для різноманітних біохімічних тестів.

Біологічний мікрочіп (англ. biochip)— 1) матриця з нанесеними молекулами білків або нуклеїнових кислот для одночасного проведення великої кількості аналізів в одному зразку; 2) електронний пристрій, що містить біологічні молекули; 3) мініатюрний датчик, здатний виявити зникаючі невеликі концентрації білків, гормонів, ДНК або РНК.

Частіше за все це пластинка зі скла, оскільки скло має низьку внутрішню флуоресценцію, воно є однорідним та інертним. Іноді використовують й інші матеріали, н., кремній, пластик. Основна частка сучасних біочіпів припадає на ДНК-чіпи (94%) та білкові чіпи (6%). Пристрій дозволяє за короткий час визначити декілька тисяч алергенів, онкогенів, різних БАР і навіть генетичні дефекти.

Для виробництва чіпів використовується складне обладнання та нанотехнології, що дозволяє «пришивати» лазерним випромінюванням аналізатори прямо до гелевої підложки, принцип дії яких заснований на методі одномолекулярної мас-спектрометрії (проведення досліджень на окремих молекулах). На сьогодні створені біочіпи на основі наноструктур (польового кремній-алюмінієвого нанотранзистора, який містить одностінні нанотрубки); на основі графену і наночастинок платини; сенсори на основі нанозондів, які приєднані до

полімерних векторів, і мають будову та функції вірусів (призначені для проникнення у клітини людського організму та аналізу клітин); сенсори, що становлять нанотрубки, вкриті ДНК; біочіпи на ДНК-основі, з використанням технології нанодрукування та супрамолекулярного нанодрукування (в основі дії яких лежить існуюча в природі технологія копіювання ДНК і РНК).

Мікроскопічний розмір біочіпів дозволяє розміщувати на невеликій площі величезну кількість різних молекул ДНК і зчитувати з цієї площі інформацію за допомогою флуоресцентного мікроскопа або спеціального лазерного пристрою для читання.

Виділяють 3 основних види ДНК-чіпів:

1. Синтезовані *in situ* олігонуклеотидні ДНК-чіпи (генні чіпи);
2. Нанесені на скло олігонуклеотидні мікрочіпи;
3. Нанесені на скло ДНК-чіпи.

Існує два підходи до синтезу та нанесення ДНК-мішеней на поверхню ДНК-чіпів: доставка та синтез *in situ*. У разі застосування методів доставки мішень синтезується стандартним способом, таким як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), та пізніше наноситься на поверхню.

За допомогою методів прямого синтезу мішені створюються безпосередньо на поверхні чіпів шляхом поступового приєднання нуклеотидів до олігонуклеотидного ланцюга. Найбільш прогресивним в синтезі ДНК-чіпів є метод синтезу олігонуклеотидів безпосередньо на поверхні чіпу шляхом поетапного додавання нуклеотидів до наростаючого кінця ланцюга. Цей напрямок більш ефективний, ніж використання попередньо синтезованих полінуклеотидів, оскільки припускає можливість одночасного синтезу всіх полінуклеотидів, які розташовуються на чіпі.

Переваги синтезу *in situ* полягають у великій щільності ДНК-мішеней, доступній ціні виготовлення чіпів високої складності, надійній ідентифікації олігонуклеотидів на ДНК-чіпах.

В основі проведення аналізу на ДНК-чіпах лежить гібридизація до мішеней на поверхні ДНК-чіпа мічених флуоресцентними барвниками молекул ДНК (зразків). Зразки отримують за допомогою зворотної транскрипції виділеної з клітин мРНК та полімеразної ланцюгової реакції.

Після проведення гібридизації проводиться детекція визначення тих комірок чіпа, де відбулась гібридизація іммобілізованих на поверхні чіпа ДНК з ДНК послідовності, яку аналізують. Оскільки кожна комірка чіпа містить ДНК мішень однієї певної послідовності, то її гібридизація з ДНК, що аналізується, однозначно вказує на наявність у складі ДНК послідовності комплементарної послідовності ДНК-мішені, яка розташована в цій комірці чіпа. Визначення комірок чіпа, в яких відбулася гібридизація іммобілізованих в ній ДНК-зразків з ДНК, яку аналізуємо підтверджує наявність в ДНК відповідних комплементарних послідовностей нуклеотидів.

Для визначення ДНК вона повинна бути міченою. Відмінність методів детекції результатів полягає в використанні типів мічення.

Для детекції інтенсивності флуоресценції кожної плями використовують апаратуру. Рівень детекції залежить від комплементарності молекул ДНК та кількості зразків. Кількісні показники, що одержуються при цьому використовують для визначення вмісту зразків у досліджуваному матеріалі. В більшості випадків кожна пляма на ДНК-чіпах містить ДНК окремого гена, тому інтенсивність плями розглядають як рівень генної експресії.

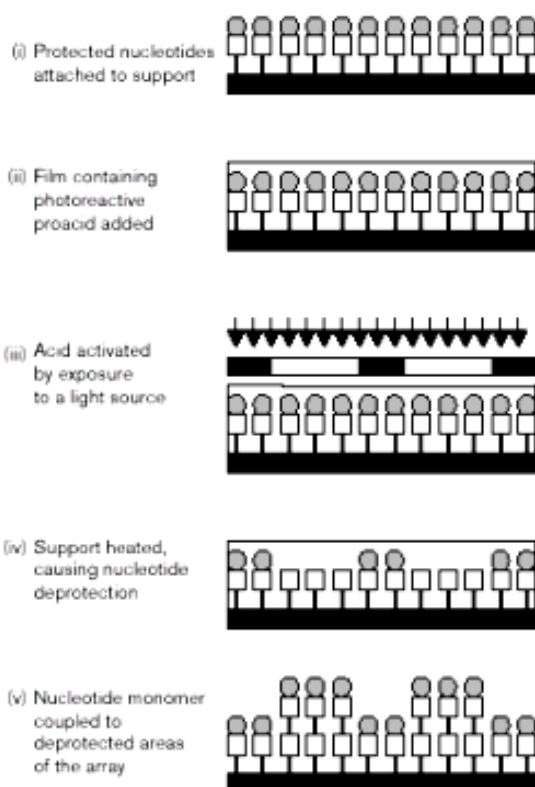
ДНК-чіпи використовують для детекції одонуклеотидного поліморфізму, генотипування, секвенування мутантних геномів, вивчення екзон-інтронної будови генів, аналізу диференційної генної експресії. Використання ДНК-чіпів дозволяє виділяти, детектувати, ідентифікувати та кількісно аналізувати експресію десятків тисяч генів.

Гібридизація з олігонуклеотидними мікрочіпами служить для якісної та кількісної ідентифікації нуклеїнових кислот та для аналізу структурних варіацій в них.

Рибосоми присутні у всіх живих клітинах, а рибосомальні РНК є одними з найбільш еволюційно консервативними макромолекулами. У р-РНК існують кілька варіабельних ділянок. Відмінності в нуклеотидній послідовності цих ділянок застосовуються для ідентифікації мікроорганізмів і для простежування їх еволюції.

Розроблено ряд мікрочіпів для експресного методу ідентифікації нітрифікуючих бактерій, бактерій груп *Bacillus* та архебактерій. Присутність р-РНК в клітині в кількості тисяч копій дозволяє проводити аналіз у ряді випадків без їх ампліфікації.

Олігонуклеотидні мікрочіпи використовують ефективно для одночасної ідентифікації від десятків до тисячі генів і їх структурного аналізу, для виявлення специфічних нуклеотидних послідовностей. ДНК-чіпи використовуються для встановлення спорідненості, визначення генетично модифікованих організмів, ранньої діагностики онкологічних захворювань.



Мал. 11.12. Схема синтезу ДНК-чіпа за допомогою фотоіндукованої кислоти.

Застосування ДНК-чіпів дозволяє дуже швидко і ефективно здійснювати безліч процедур аналізу індивідуальних особливостей ДНК організмів, що дуже важливо для вирішення різних практичних завдань.

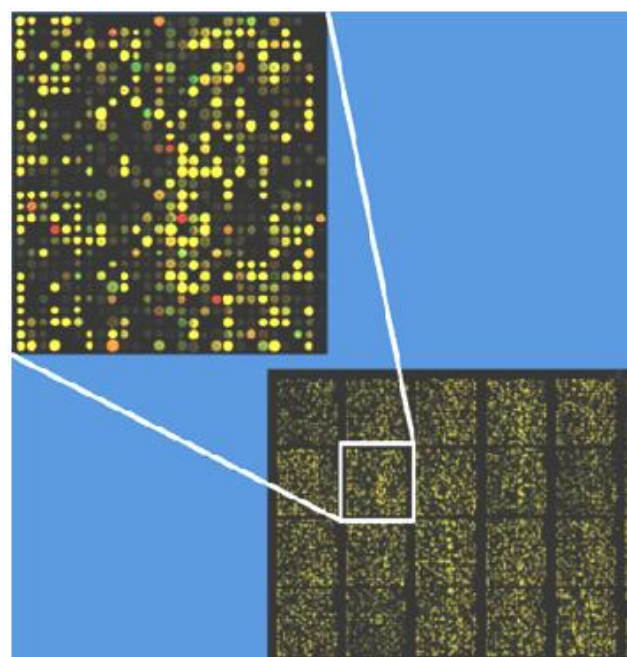
Вивчення експресії генів за допомогою ДНК-мікрочіпів. При вивченні функції гена важливо дізнатися, коли і в яких тканинах організму він працює (експресується), а також його взаємодію з іншими генами. При вивченні невеликого числа генів і тканин це можна зробити дуже просто: виділити РНК з тканини, провести зворотну транскрипцію (тобто, синтезувати кДНК) і потім, провести кількісну ПЛР. Залежно від результатів ПЛР встановлюють

наявність транскрипта (мРНК досліджуваного гена в тканині).

Для вивчення експресії багатьох генів в різних тканинах ця методика стає дуже довгою і витратною. У такому разі використовують ДНК-мікрочіпи.

Рис. 11.13. Флуоресценція на ДНК-мікрочіпі після обробки розчином кДНК. Всього тут приблизно 37500 прикріплених молекул ДНК.

Щоб вивчати експресію генів за допомогою чіпів, необхідно також синтезувати їх кДНК і помітити її флуоресцентним барвником (не розділяючи



кДНК різних генів). Таку суміш наносять на мікрочіп, домагаючись, щоб кДНК гібридизувалася з молекулами ДНК на чіпі. Після цього дивляться, де спостерігається флуоресценція і порівнюють це з тим, що має в розпорядженні молекул ДНК на чіпі. Якщо місце флуоресценції співпадає з положенням молекули ДНК, то в цій тканині даний ген експресований. Крім того, помітивши кДНК з різних тканин різними барвниками, можна вивчати експресію відразу двох тканин на одному чіпі: за кольором флуоресценції можна визначити, в якій з тканин він експресується (якщо відразу в декількох — вийде змішаний колір) (рис. 11.13).

Проте останнім часом все частіше замість чіпів використовують масове секвенування усієї кДНК з тканини (створення так званих *транскриптомів*), що сильно спростилося із-за розвитку методів секвенування. Це є дешевше і ефективніше, оскільки знання повних послідовностей усіх мРНК дає більше інформації, ніж просто сам факт їх наявності або відсутності.

Біочіпи широко використовують в *in vitro*-діагностиці. В основі їх механізму дії є молекулярне розпізнавання молекул, які взаємодіють із біополімерами, нанесеними на чіп. Так, чіпи використовуються для діагностики туберкульозу, кліщових інфекцій, лейкемії, СНІДу, онкозахворювань, а також для експрес-діагностики вірусу грипу та стафілококової інфекції та для раннього виявлення хвороби Альцгеймера. Біочіпи ідентифікують за лічені хвилини сполуки різної хімічної природи: від білків, вітамінів, вірусів, ДНК до живих клітин у біологічному матеріалі, що дозволяє проводити діагностику захворювань на ранніх стадіях.

ДНК-діагностика допомагає виявляти певну послідовність ДНК, розшифровувати генетичну інформацію, визначати функції всіх білків організму, виявляти гени, що несуть мутацію, а також дає можливість визначити генетичну схильність людини до раку, діабету, наркоманії тощо, виявляти хромосомні порушення.

Сучасні біочіпи здатні детектувати навіть одну хімічну сполуку чи вірусну частку. Деякі біочіпи на основі наноструктур за 1 хв. можуть визначити вміст в 1 мм³ рідини до 1000 окремих молекул потрібної речовини, при цьому немає необхідності маркувати розчини радіоактивними чи флуоресцентними мітками. Існують біочіпи для вимірювання рівня глюкози шляхом швидкого та надчутливого аналізу зразків слини, сечі або сліз.

Біосенсори із флуоресцентною фарбою придатні для використання в польових умовах з метою виявлення навіть незначної концентрації сальмонели в харчових продуктах за короткий час. Біочіпи забезпечують виявлення молекулярної взаємодії між білками вірусів (ВІЛ, гепатиту та ін.) та білками, які синтезуються клітинами людського організму, що піддаються інфекції — це важливо при розробці нових методів боротьби з вірусами.

Біочіпи використовують у криміналістиці (для експрес-ДНК-дактилоскопії за межами лабораторії, навіть визначають колір очей точністю 94%). Особливу групу становлять імунологічні біочіпи (ІБ), які використовують для створення діагностичних тест-систем із метою визначення імунофенотипу для діагностики захворювань, які пов'язані із порушенням клітинної ланки імунітету. ІБ призначені для використання в гематології (для дослідження клітин пухлин лімфатичної системи та клітин мієлоїдних пухлин, що дозволяє визначити не просто наявність захворювання, а і його тип).

Особливе місце посідають біочіпи для імплантації, внутрішньоклітинні та біочіпи для діагностики методом *in vivo*. Нанобіочіпи можна використовувати для імплантації пацієнтам із хронічними захворюваннями, для ранньої діагностики злоякісних пухлин і небезпечних вірусних захворювань. Біочіпи використовують також для розробки наномедичних знеболювальних систем, які містяться в організмі, реагують на біль та вивільняють дозу лікарської речовини.

Сенсори із нанотрубок, вбудованих у структуру ДНК, здатні виявляти в живій клітині ліки, токсини, вільні радикали і використовуватися для моніторингу забезпечення клітини

лікарською речовиною. Існують сенсори, що дозволяють відстежити наявність і виміряти вміст ліпідів у живій клітині або рівень рН клітини.

Отже, технологія біочіпів, що замінює цілі імунологічні лабораторії, дає можливість на кілька порядків підвищити продуктивність більшості діагностичних методів і значно знизити собівартість аналізів; їх використання робить аналіз більш швидким, точним та якісним. Наприклад, нова технологія з використанням передової технології ДНК-чіпів, яка запропонована британськими вченими, дозволить перевести на новий рівень діагностику важких уражень нервової системи, таких як менінгіти і енцефаліти. Якщо раніше на повний аналіз йшло багато днів, то зараз можливе діагностувати захворювання за хвилини.

Молекулярно-генетичні методи досліджень у судовій медицині.

Метод ідентифікації особи, заснований на аналізі ДНК, прийшов у світову криміналістику в 1985 році, коли в липневому номері журналу «Nature» з'явилася стаття професора Лестерського університету в Англії А.Джеффріса «індивідуально-специфічні відбитки пальців ДНК людини». У грудні того ж року А.Джеффріс і П.Гілл з Алдермастонського експертно-криміналістичного центру МВС Великобританії опублікували ще одну статтю під назвою «Судово-експертне використання «відбитків пальців» ДНК». У цих ключових роботах вперше продемонстрована можливість використання аналізу ядерної ДНК людини для судово-експертної ідентифікації особи. Так народилася «дактилоскопія» генома – метод, який визнаний одним із найвидатніших досягнень ХХ сторіччя в галузі судових наук.

Цей метод дозволяє ідентифікувати особу за біологічними слідами людини, що особливо важливо в розслідуванні тяжких злочинів.

Молекулярно-генетичний ідентифікаційний аналіз, що традиційно називають геномною (генетичною) «дактилоскопією», або генотипуванням (DNA profiling, DNA fingerprinting або DNA typing), за своєю суттю направлений на виявлення індивідуальних особливостей («особливих прикмет») генетичної конституції конкретної людини. Два основоположні принципи – індивідуальна генетична унікальність кожного організму і генетична ідентичність всіх його клітин і тканин – складають концептуальну основу молекулярно-генетичної індивідуалізації.

На ранніх етапах розвитку методу основою для експертного висновку найчастіше служило відображення індивідуальних характеристик ДНК у вигляді графічного образу, а саме: специфічного набору ліній, що віддалено нагадує картинку так званого бар-коду (рис. 11.14). Звідси, за аналогією з аналізом дактилоскопічного відбитку, виникла назва – генетична, або геномна «дактилоскопія». Термін уведений у 1985 р. Джеффрісом (в англійському оригіналі - DNA Fingerprinting, буквально – «зняття відбитків пальців ДНК»). На теперішній час його слід розглядати як застарілий, оскільки в науковій лексиці його витиснули більш чіткі визначення, н., типування ДНК або генетична ідентифікація.



Рис.11.14. Геномний відбиток" ДНК людини. В якості гібридизаційного зразка для аналізу рестрикційного гідролізата сумарної геномної ДНК людини використовують мічений радіоактивний молекулярний зонд 33.15 Джеффріса.

Молекулярно-генетичний ідентифікаційний аналіз дозволяє досліджувати особливі ділянки ДНК, чітко специфічні для кожного індивідуума, і отримувати унікальний генетичний «паспорт» людини, який не можна ні змінити, ні підробити. Індивідуалізуючі ознаки, що визначаються на рівні ДНК, характеризуються майже абсолютною стійкістю, тобто зберігаються в організмі людини незмінними все життя і незмінно відображаються в його біологічних слідах. Тому ідентифікаційне значення генетичних ознак надзвичайно високе.

Типування ДНК нині стало найбільш доказовим методом аналізу біологічного

матеріалу при проведенні судово-медичної ідентифікаційної експертизи. Генетичні методи особливо ефективні у двох випадках: ідентифікації осіб і встановлення біологічної спорідненості. У першу чергу, мова йде про ідентифікацію особи при розслідуванні вбивств, тяжких тілесних ушкоджень, згвалтувань та інших злочинів, що вимагають судово-медичного дослідження речових доказів, а також при розпізнанні розчленованих або сильно скалічених трупів, н., у випадках масових природних і техногенних катастроф і військових конфліктів.

Проте «дактилоскопія» генома, на відміну від традиційної криміналістичної дактилоскопії, дозволяє не тільки однозначно встановлювати особу, але і визначати кровну спорідненість. Це робить її незамінним експертним методом у складних випадках підміни, втрати, викраданні дітей, визначенні спорідненості малолітніх або таких, що втратили пам'ять осіб, виявленні фактів кровозмішення. Метод також ефективно використовується й у вирішенні цивільних справ - встановленні батьківства або материнства. Можливо навіть пренатальне дослідження, що дозволяє встановлювати батьківство до народження дитини.

Молекулярно-генетичні маркерні системи засновані на існуванні відмінностей у структурі ДНК (генів) у різних індивідуумів. На молекулярному рівні алельні варіанти одного і того ж гена різняться невеликими змінами в структурі ДНК. Можливі заміни одиничних нуклеотидів, так звані точкові заміни, або локальні перебудови, делеції й інсерції - відповідно втрата або додавання невеликих ділянок ланцюга. Такі незначні відмінності зрештою і визначають те, чим різні люди відрізняються один від одного. Поєднання алельних варіантів всіх генів забезпечує біологічну індивідуальність кожної людини.

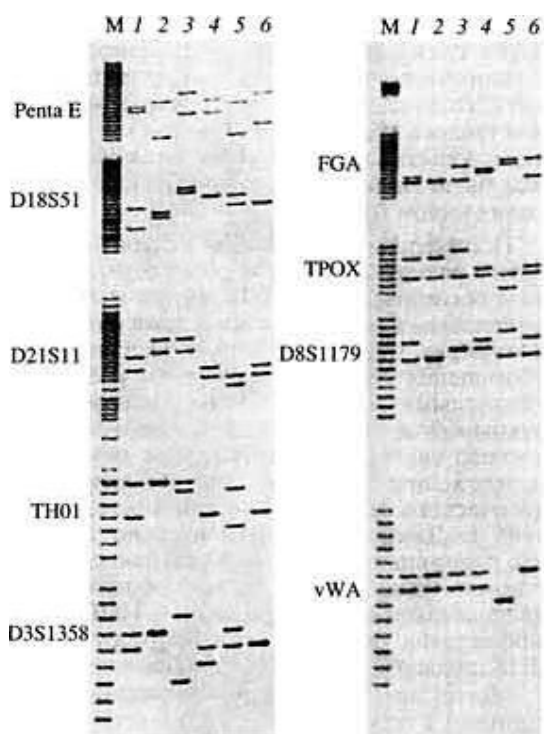
Виявлення цих відмінностей як індивідуалізуючих характеристик вимагає спеціальних методів і підходів, що дозволяє працювати безпосередньо з молекулами ДНК. На практиці як маркери індивідуальності виступають мультиалельні гіперваріабельні гени (гіперваріабельні генетичні локуси). Індивідуалізуючими характеристиками є численні структурні варіанти таких локусів, які в різних поєднаннях наявні в ДНК різних індивідуумів.

У судово-експертній практиці базовими молекулярно-генетичними технологіями визнані: аналіз поліморфізму (варіабельності) довжини рестриктазних фрагментів ДНК, аналіз поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів ДНК і аналіз поліморфізму

нуклеотидних послідовностей (сайт-поліморфізму) ДНК. Їх детальна характеристика наведена нами раніше.

Розроблені *мультиякісні* ампліфікаційні системи, які дозволяють одночасно аналізувати ПДАФ відразу декількох локусів (їх може бути більше 10). Створюваний сумою локусів ампліфікаційний профіль ДНК має надзвичайний поліморфізм, адже він є комбінацією декількох незалежних поліморфних елементів, які і зумовлюють його дуже високу індивідуальну специфічність (рис. 11.15).

Рис. 11.15. Типування хромосомної ДНК шести неспоріднених індивідів за допомогою мультиплексної ампліфікаційної системи PowerPlex2.1 System (Promega Corp., США) (Іванов П.Л., 2003).



Як показано на рис. 11.15, ця система дозволяє одночасно аналізувати ПДАФ дев'яти хромосомних локусів: Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179 і vWA (комп'ютерний інтерпретаційний образ трибарвної картини, отриманої на апаратно-

програмному комплексу Hitachi FMBIO II Fluorescence Imaging System), які порівнюються з комбінованим апельним стандартом M, де представлені всі алельні варіанти аналізованих локусів. Сумарний ампліфікаційний профіль ДНК для кожного індивідуума створюється комбінацією дев'яти пар смуг, які в не родичів поводяться як незалежні поліморфні елементи, що зумовлює дуже високу індивідуальну специфічність.

Така технологія ДНК найчастіше використовується в судовій медицині і називається *методом ДНК-профілізації або STR-аналізом* (англ. *Short Tandem Repeat*). STR – повтор нуклеотидів у ДНК, які примикають один до одного. Довжина короткого тандемного повтору зазвичай становить від 2 до 10 пар основ (н., CATGn) і знаходиться в інтронній ділянці. Число повторів у кожній із ділянок різне. Кожному числу повторень відповідає 5-20% людей. Але якщо розглядати велику кількість ділянок, то цінність методу значно підвищується (н., при розгляді 13 ділянок вірогідність помилкового збігу становить 10^{18}). Саме ця властивість призвела до високої популярності STR-аналізу. Виявлення коротких тандемних повторів використовують при створенні генетичного профілю людини. Вже опубліковано понад десяти тисяч послідовностей коротких тандемних повторів у геномі людини. Аналіз STR став переважаючим аналітичним методом визначення генетичного профілю в патологічній анатомії.

STR-аналіз складається з декількох етапів: попереднього тестування біологічного зразка; виділення і очищення ДНК; ПЛР (ампліфікація і флуоресцентне мічення STR); детекція алелей.

Бурхливий і одночасний розвиток методів ДНК-аналізу для ідентифікації особи в різних країнах призвів до створення баз даних STR-профілів осіб, які скоїли злочини, і біологічних об'єктів, вилучених із місць злочинів.

Найбільший банк даних ДНК у світі - Національна база Великобританії, яка встановлена в 1995 році і містить близько 3 млн. зразків. У ній зберігається інформація про ДНК не тільки засуджених, але і підозрюваних. За даними британських криміналістів, щонеділі розкривається до 2 тис. злочинів, за якими з місця події отримували генетичний матеріал. У США Національна база даних за генетичною інформацією створена в 1998 році. До 2002 року в ній вже зберігалось понад 800 тис. генотипів.

Вимога сумісності зростаючих баз даних призвела до створення регіональних, а згодом і міжнародних стандартів для систем STR-локусів. Так, в Європі, у результаті співпраці Інтерполу і організації ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) 10 маркерних STR-локусів прийняті як європейський стандарт. У США і Канаді прийнята система CODIS (COmbined DNA Index System), в яку входить 14 STR-локусів. Вони знаходяться на різних хромосомах, і їх незалежний розподіл робить статистичний аналіз достовірнішим.

На основі цих систем, використовуваних різними міжнародними організаціями, створені комерційні набори STR маркерів. У зв'язку з цим, дані, отримані з допомогою цих наборів, сумісні з будь-яким з існуючих стандартів. Це дає можливість проводити аналізи на спорідненість для осіб, які знаходяться в різних країнах, без необхідності пересилки через державні кордони біологічного матеріалу.

У цілому генетичні маркери можна розділити на чотири групи:

- системи STR-локусів автосом;
- системи STR-локусів Y-хромосоми;
- STR-локуси X-хромосоми;
- поліморфні локуси мтДНК.

У більшості випадків при встановленні спорідненості використовуються системи, засновані на аутосомних STR-локусах. До теперішнього часу відомі тисячі різних аутосомних STR-локусів, які достатньо рівномірно розподілені по всьому геному людини, що дозволяє скласти велику кількість систем на їх основі. В розрахунках, що проводяться при оцінці

достовірності результатів аналізів, використовуються дані генетики популяції. Для коректного використання популяційних даних найчастіше необхідно, щоб локуси, які входять у систему, були незалежними, тобто розташовувалися на різних хромосомах або на одній хромосомі, але на достатньо великій відстані один від одного. При виборі локусів-кандидатів враховується дана особливість, характерна для аналізу спорідненості й ідентифікації особи на основі аутосомних маркерів.

Системи на основі аутосомних локусів використовуються при встановленні різних ступенів спорідненості:

- батько - дитина;
- брат (сестра) - брат (сестра);
- бабуся (дідусь) - онук (онучка);
- загальний випадок.

При визначенні статі або спорідненості за чоловічою лінією використовуються системи STR-локусів Y-хромосоми, яка, як відомо, майже не рекомбінує в мейозі. Рекомбінація з X-хромосомою відбувається тільки на невеликих гомологічних ділянках, розташованих на кінцях Y-хромосоми і займають близько 5% її довжини. Таким чином, Y-хромосома передається з покоління в покоління від батька до сина, практично в незмінному вигляді, за відсутності мутацій. Описані властивості зумовлюють використання генетичних маркерів, що лежать на Y-хромосомі, як з метою ідентифікації особи, так і для встановлення спорідненості за чоловічою лінією.

До теперішнього часу відомо більше 219 STR-локусів Y-хромосоми, причому деякі з них наявні на хромосомі у двох, і навіть у трьох екземплярах. Як і у випадку з аутосомними локусами, вимоги уніфікації і сумісності зростаючих національних баз даних частот гаплотипів Y-хромосоми призвели до створення міжнародних стандартів. У 1997 році, зусиллями європейської організації ISFG (International Society of Forensic Genetics) визначено т.з. «мінімальний гаплотип», що складається з локусів DYS19, DYS385a/b, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 і DYS393. У 2003 році американською організацією SWGDAM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods), на додаток до згаданих 8 локусів, запропоновано використовувати локуси DYS438 і DYS439.

Скорочені записи маркерів DYS (DNA Y-chromosome Segment) розшифровуються як «ДНК Y-хромосоми сегмент», а потім зазначають їх номери. Після перевірки і об'єднання результатів декількох STR з одного генома визначається гаплотип, який може бути представлений у вигляді послідовності числа кожного маркера.

Маркери STR записані в заголовку, а сам гаплотип в елементах таблиці. Так, н., DYS19 має 14 повторів, DYS385a – 12 тощо. Аналіз гаплотипу дозволяє прослідкувати весь шлях предків даної людини протягом десятків тисяч років. Н., найзагальніший гаплотип у Західній Європі, тобто властивий всім чоловікам (Атлантичний Модальний Гаплотип - АМГ), визначений тільки шістьма маркерами.

Дещо довший набір наявний у 98% всіх чоловіків: DYS# 19 _ 388 - 390 - 391 - 392 - 393 - 3851/11. Ще довший-у 34%: DYS# 19-388-390-391 - 392 - 393 - 3851/11 - 438-439 тощо.

Для оцінки частоти популяції Y-STR певного гаплотипу використовують бази даних за цими локусами, характерні для різних популяцій. Н., база даних U.S. Consolidated Y-STR Database містить генотипи для 15-17 STR локусів встановлених для багатьох популяцій, зокрема і європейських.

STR-локуси X-хромосоми при ідентифікації особи і встановленні спорідненості, не мають такого широкого розповсюдження, як у випадку з аутосомними маркерами і маркерами Y-хромосоми. На теперішній час, у світі не існує загальноприйнятої для встановлення спорідненості системи STR-локусів X-хромосоми. Найчастіше для встановлення спорідненості використовують такі маркери: DXS1192, DXS1226, DXS1237, DXS7161, DXS8020,

DXS8060, DXS8087, DXS8089, STR49, SH2DIA, NDPCA.

Аналіз Х-хромосоми обов'язково використовується при визначенні статі, для чого визначають короткі фрагменти ДНК (локуси AMELY і AMELX) у гомологічних регіонах Х- і Y-хромосом.

На теперішній час також широко використовується молекулярно-генетична індивідуалізуюча система, яка заснована на секвенуванні сайт-поліморфних ампліфікованих фрагментів мітохондріальної ДНК (мтДНК).

Мітохондріальна ДНК людини характеризується низкою унікальних біологічних властивостей: швидким темпом мутації і, як наслідок, високим рівнем мінливості, великим числом копій у кожній клітині, материнським характером успадкування і відсутністю рекомбінації. Ці властивості, що стали причиною широкого використання мтДНК у популяційних і еволюційних дослідженнях, роблять її високоінформативним, а в деяких випадках єдиною застосовним інструментом і в судово-медичній практиці.

Можна використовувати мтДНК як генетичний маркер материнської лінії успадкування, і особливо успішно при встановленні спорідненості в тих випадках, коли генетична дистанція, що розділяє родичів, більша ніж одне покоління. Автономні маркери не дають доказового результату, оскільки практично неможливо проаналізувати дуже велику кількість варіантів їх успадкування в ряді поколінь. Нуклеотидна ж послідовність мтДНК ідентична у всіх родичів, пов'язаних материнською лінією спорідненості (за винятком рідкісних мутацій). З цієї причини для встановлення приналежності індивіда до конкретної генетичної лінії, а отже, для його непрямой ідентифікації, можна використовувати порівняльний аналіз мтДНК будь-яких родичів індивіда по материнській лінії (сестра, бабуся, дядько, племінник, тощо).

Аналіз мтДНК можливий, якщо для експертного дослідження доступні дуже малі кількості біологічного матеріалу або ДНК, що міститься в зразку, сильно деградована хромосомна ДНК не може бути ампліфікована. Мітохондріальна ДНК багато разів використовувалася для аналізу кісткових рештків, яким було десятки, сотні і навіть десятки тисяч років. Такі результати недосяжні для індивідуалізуючих систем, які базуються на аналізі генів хромосомної ДНК.

Високий рівень мінливості мтДНК забезпечує широкий спектр індивідуалізуючих характеристик, а значить, і високий дискримінуючий потенціал даного методу. Оскільки мтДНК не схильна до рекомбінації, то її розглядають як єдиний локус. Варіабельність послідовностей певних ділянок мтДНК істотно перевищує кількість алелей будь якого поліморфного хромосомного маркера. Поліморфізм певних локусів мтДНК (1,11) такий високий, що іноді один лише його аналіз може забезпечити надійне підтвердження спорідненості.

Як стандартна послідовність нуклеотидів молекули мтДНК людини використовується Кембріджська референтна послідовність (revised Cambridge Reference Sequence або rCRS), яка опублікована в 1999 році. Два ланцюги молекули мають різний сумарний нуклеотидний

склад і позначаються як L-ланцюг (light, легкий) і H-ланцюг (heavy, важкий).

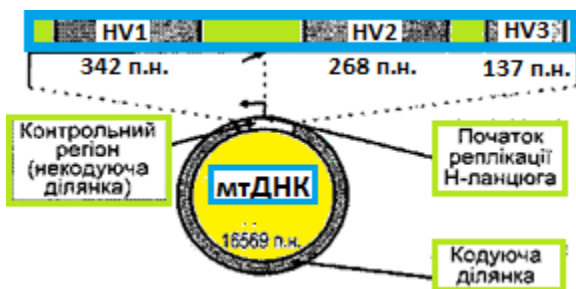


Рис. 11.16. Розташування гіперваріабельних ділянок HV1, HV2 і HV3 на контрольному регіоні мтДНК людини.

Нуклеотиди L-ланцюга референтної послідовності пронумеровані, починаючи з точки початку реплікації H-ланцюга. Велика частина молекули мітохондріальної ДНК містить консервативні кодувальні послідовності. Тільки невелика некодувальна ділянка розміром 1122 п.н.

(«контрольний регіон») містить гіперваріабельні ділянки HV1 (342 п.н.), HV2 (268 п.н.) і HV3 (137 п.н.). Вони показані на рис. 11.16.

Поліморфізм в полінуклеотидних ланцюгах мтДНК зумовлений в основному точковими нуклеотидними замінами в некодуєчій ділянці. При типуванні мтДНК у судово-експертних ідентифікаційних дослідженнях використовується аналіз поліморфізму довжини рестриктазних і ампліфікованих фрагментів (ПДРФ, ПДАФ), аналіз поліморфізму нуклеотидних послідовностей (ППАФ, SSO, гібридизаційні мікроматриці), а також аналіз конформаційного поліморфізму (SSCP, DGGE). Найбільше практичне значення має тільки індивідуалізуюча система ППАФ-типу, в основі якої лежить секвенування ампліфікованих фрагментів ДНК, синтезованої на матриці мтДНК.

Аналіз, що передбачає пряме секвенування ампліфікованого продукту, дає повну інформацію про первинну структуру досліджуваного фрагмента (рис. 11.17).

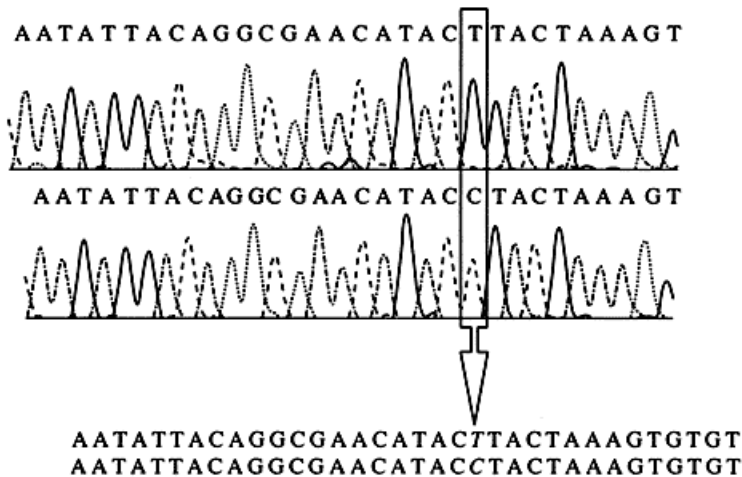


Рис. 11.17. Виявлення нуклеотидних замін у мтДНК методом прямого флуоресцентного секвенування (за: Іванов І.П., 2003).

Вирішення завдань судово-медичної експертизи з молекулярно-генетичної ідентифікації найбільш ефективна у двох випадках: для ідентифікації особи і встановлення біологічної спорідненості.

Типування мтДНК дозволяє виявляти споріднені зв'язки не тільки близькоспоріднених, а трасувальних родовідних маркерів. Одним із перших і найбільш яскравих прикладів використання мтДНК в експертному дослідженні стала ідентифікація рештків членів російської імператорської сім'ї. Дана експертиза поклала початок серії робіт, заснованих на аналізі мтДНК, які проливають світло на історичні події минулого. Така, н., експертиза передбачуваних рештків нацистського злочинця Мартіна Бормана, принца Луї XVII, генерала Г.Н. Шпигуна, українського журналіста Р. Гонгадзе і багато інших.

Застосування методів типування мтДНК дозволило отримати перший позитивний досвід вирішення ідентифікаційних завдань при судово-медичній експертизі масових невпізнаних людських рештків. Мова йде про масштабні експертизи нерозпізнаних рештків людей, загиблих у результаті терористичних актів та під час збройних конфліктів. Також застосовуються молекулярно-генетичні технології для ідентифікації громадян, загиблих під час стихій і авіакатастроф. Проте найдокладніше проведена ідентифікація генома в історичній справі царської сім'ї Миколи II, що продовжувалася з 1991 до 2008 рр. і проводилася фахівцями різних країн: Росії, США, Канади та ін.

В околицях Єкатеринбурга (1991 р.) виявлено групове поховання людей із слідами насильницької смерті. За деякими даними, це могло бути поховання сім'ї і членів найближчого оточення останнього російського імператора, розстріляних восени 1918 р. За фактом виявлення рештків призначена комплексна експертиза, покликана відповісти на наступні питання. Яка статеві приналежність похованих осіб? Чи є в групі останки родичів і в якому ступені спорідненості були ці люди? Чи співвідносяться останки за якими-небудь ознаками з родичами царської сім'ї, що нині є живими?

На першому етапі дослідження визначали стать людей, чиї останки знаходилися в похованні. З кісткових рештків 9 осіб були отримані ДНК. Визначення статі засноване на тому, що статеві хромосоми X і Y несуть гомологічний ген, який знаходиться в них у різних

алельних станах – ген у Y-хромосомі на 6 пар нуклеотидів довше, ніж у X-хромосомі. Цей ген кодує компонент зубної емалі амелогенін. Для того, щоб виявити, чи міститься в даному зразку ДНК Y-хромосома, зі всієї ДНК генома аналізують лише ділянку амелогенінового гена, що відрізняються в X- і Y-хромосомах.

Результати розділення фрагментів гена амелогеніна після проведення ПЛР на ДНК з кісткових рештків виявили, що у чоловіків утворюються два фрагменти: довжиною 112 пар нуклеотидів в Y-хромосомі, і 106 пар нуклеотидів в X-хромосомі. У жінок дві X хромосоми, кожна з яких дає фрагмент 106 пар нуклеотидів. У дев'яти зразках в чотирьох випадках виявлено по дві смуги, а в п'яти випадках – одна смуга. Отже, серед убитих четверо чоловіків і п'ять жінок. Такий тест дозволив встановити тільки статеву приналежність, але не індивідуальні риси досліджуваної ДНК.

Наступний етап дослідження – оцінка ступеня спорідненості. Для цього використовується аналіз локусів, які мають п'ять або десять алельних станів. Локуси, що мають більше двох алельних станів називають *поліморфними маркерами*. Якщо проаналізувати п'ять локусів, кожен з яких може бути в п'яти алельних станах, то можна отримати 3125 можливих варіантів поєднань алелей в конкретній хромосомі, тобто два неспоріднені індивіди, в яких збігається алельний стан всіх п'яти маркерів, зустрінуться не так вже часто, у родичів алельний стан поліморфних локусів-маркерів збігається (чим ближче спорідненість, тим більше збігів).

Для дослідження ДНК із кісткових рештків обрали локус Тn01, який містить багаторазово повторюваний динуклеотид CA (STR-маркер). Існує п'ять алелей локуса, що містять від 6 до 10 копій повтору. Алелі легко помітні за розміром ПЛР-фрагментів, що виявляються в гелі після електрофорезу.

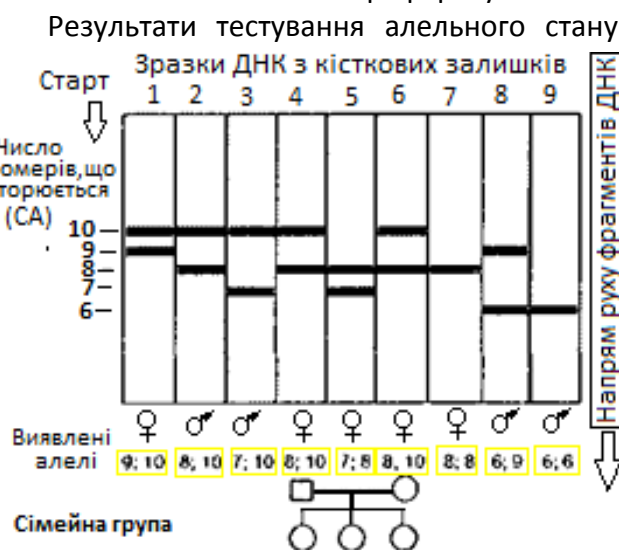


Рис. 11.18. Аналіз алельного стану локуса Тn01. Внизу вказана сімейна група, виявлена за аналізом алельного стану п'яти поліморфних локусів (за: Н.К. Янковський, 1996).

Порівняння алельного стану локуса Тn01 для будь-якої пари індивідів дозволяє прийняти або відкинути гіпотезу про їх генетичну спорідненість по вертикалі (батько-дитина). У дитини розмір одного фрагмента збігається з розміром одного з фрагментів матері, а розміри другого фрагмента – з одним із фрагментів батька. Якщо у двох індивідів не виявляються однакові смуги (н., на рис. 11.18 індивіди 1 і 5 або 7 і 8), то їх спорідненість по вертикалі виключена, а якщо наявні однакові смуги (однакові алелі локуса), то спорідненість можлива. Н., за наслідками аналізу, представленого на рис. 11.18, помітно, що індивід 3 (чоловічої статі за наслідками попереднього ДНК-тесту, див. рис. 11.17) є носієм алелі (CA)₇ і (CA)₁₀ локуса Тn01, і цей алель відсутній у індивідів 7, 8, 9. Отже, індивід 3 не може бути їх батьком або сином - у дітей повинен бути наявним який-небудь з алелей батька. Водночас індивід 3 може бути або батьком, або сином індивідів 1,2,4, 5 або 6. Аналогічні картини розподілу алелей були отримані ще для чотирьох поліморфних локусів.

Для перевірки гіпотези про належність рештків Миколи II і його сім'ї вибрали метод

визначення послідовності нуклеотидів мтДНК. В ній є консервативні ділянки, які однакові у всіх людей. Вони чергуються з варіабельними ділянками, нуклеотидна послідовність яких часто змінюється в результаті мутацій. Одна з таких варіабельних ділянок – D-петля, її обрали для дослідження. Визначення послідовності мтДНК з рештків Георгія Олександровича Романова, брата Миколи II показало, що нуклеотидні послідовності D-петлі братів виявилися повністю ідентичними. Це дозволило дійти висновку, що виявлені в похованні останки дійсно належать останньому російському імператорові Миколі II і його сім'ї.

В серпні 2007 р. археологи оголосили про знахідку пошкоджених і частково спалених кісткових фрагментів, виявлених у другому похованні під Єкатеринбургом. Разом з останками двох тіл археологи виявили осколки посуду з-під сірчаної кислоти і кулі різного калібру. Кримінальне і історичне розслідування обставин загибелі сім'ї Миколи II було знову відновлено.

Через півтора року, експерти (Rogaev et al., 2009) надрукували в журналі *Proceedings of the National Academy of Sciences* результати аналізу генома рештків царської сім'ї Миколи II, що склалися з аналізу нових зразків (рештків двох обпалених скелетів із поховання, виявлених у липні 2007 р.); обширного аналізу генома рештків із поховання 1991 р.; генетичного аналізу архівних зразків крові Миколи II (приблизно 117 річного віку). Крім того, проаналізовані зразки, отримані від нащадків європейських королівських сімей за батьківською, та за материнською лініями. Вони остаточно підтвердили, що останки, які ідентифікуються, належали Миколі II і його сім'ї, включаючи всіх п'ятьох дітей.

Дана робота продемонструвала, що аналіз повних послідовностей мітохондріального генома в поєднанні з аналізом генетичних профілів ядерної ДНК, особливо Y-хромосоми, може ефективно використовуватися для дослідження історичних реліквій з метою аналізу сімейної спорідненості та індивідуальної ідентифікації.

Молекулярно-генетичні методи, які використовуються для досліджень у судовій медицині продовжують вдосконалюватися. Наприклад, розроблена нова методика екстрагування ДНК з об'єктів судово-генетичної експертизи, що заснована на частковому поєднанні процедур фенолхлороформної екстракції і сорбентних методик (Іванов П.Л., Каганова Н.Л., 2009). Ці два методи виділення ДНК об'єднані з метою створення оптимального протоколу, позбавленого основних недоліків, і який має переваги кожного з базових методів. Для судово-медичної ідентифікації особи розроблені гідрогелеві олігонуклеотидні мікрочіпи для локуса ABO (Міт'яєва О.Н. та співавт., 2007), і методика визначення п'яти алелей даного локуса, який визначає групспецифічні характеристики крові. Запропонований метод дозволяє аналізувати варіанти точкового поліморфізму (SNP) у позиціях 26 і 297 екзона 6 і в позиціях 646 і 657 екзона 7 і таким чином виявляти п'ять алелей локуса ABO – A, B, O¹, O^{IV}, O².

Таким чином, застосування молекулярно-генетичних методів дослідження в судовій медицині та криміналістиці дозволяють вирішувати складні практичні завдання ідентифікації особистості за біологічними рештками. Ці методи достовірно виявляють генетичну спорідненість та проводять ідентифікацію індивідуумів з високою точністю.

Методи генної інженерії

Поняття про генну інженерію. Рекombінантні ДНК, принципи їх конструювання. Клонування фрагментів нуклеїнових кислот in vivo. Визначення поняття вектора в молекулярній біології. Біологічні вектори: плазміди, бактеріофаги, косміди, штучні хромосоми. Методи пошуку специфічних рекombінантних ДНК. ДНК-бібліотека геномів, бібліотеки кДНК. Досягнення і перспективи генної інженерії. Системна РНК-інтерференція.

Поняття про генну інженерію. Генна інженерія займається конструюванням in vitro

функціонально активних штучних генетичних програм (рекомбінантних ДНК). Завдяки генній інженерії з'явилася можливість не лише детального вивчення гігантських геномів вищих організмів, але і цілеспрямованої зміни їх структури. Виникли умови для створення генетично трансформованих видів мікроорганізмів, рослин і тваринних, здатних стати продуцентами біологічноактивних сполук (ферментів, гормонів, антибіотиків і тому подібне), тобто була створена база для розвитку нової біотехнології.

Датою народження генної інженерії можна вважати 1972 р., коли П.Берг і співробітники отримали першу рекомбінантну ДНК, яка складалася з ДНК вірусу SV40 і бактеріофага. Виникнення генної інженерії мало величезне значення для молекулярної біології в цілому. Завдяки її методам структура і функції будь-якого гена і продуктів його експресії (РНК і білки) стали практично доступні для дослідження.

Молекулярні біологи розробили принципово нові технології, засновані на відкриттях у біохімії і молекулярній генетиці. Це надало величезні можливості маніпулювання генетичним матеріалом. Нові підходи і методи отримали назву «Технології рекомбінантних ДНК», які часто називають «генною інженерією». Ці технології революціонізували біологію і зробили величезний вплив на медицину. З їх допомогою можна проводити обмін генетичною інформацією між хромосомами, створюючи нові гени і геноми. Наприклад, можна отримувати організми, наприклад, бактерії, експресуючи гени людини, проводити генну терапію людини та ін. Таким чином, в генній інженерії використовуються різні технології створення рекомбінантних ДНК для цілеспрямованої зміни генетичних програм і створення нових генів і генотипів. Генна інженерія включає декілька основних етапів (рис.12.1):

- а) отримання генетичного матеріалу з потрібними генами;
- б) включення цих генів в автономну генетичну систему (вектор), здібну до реплікації і вбудовування в чужий геном;
- в) введення цієї системи в реципієнтну клітину, де нові гени входять до складу ДНК. На вказаних етапах використовується багато молекулярно-генетичних підходів і методів.

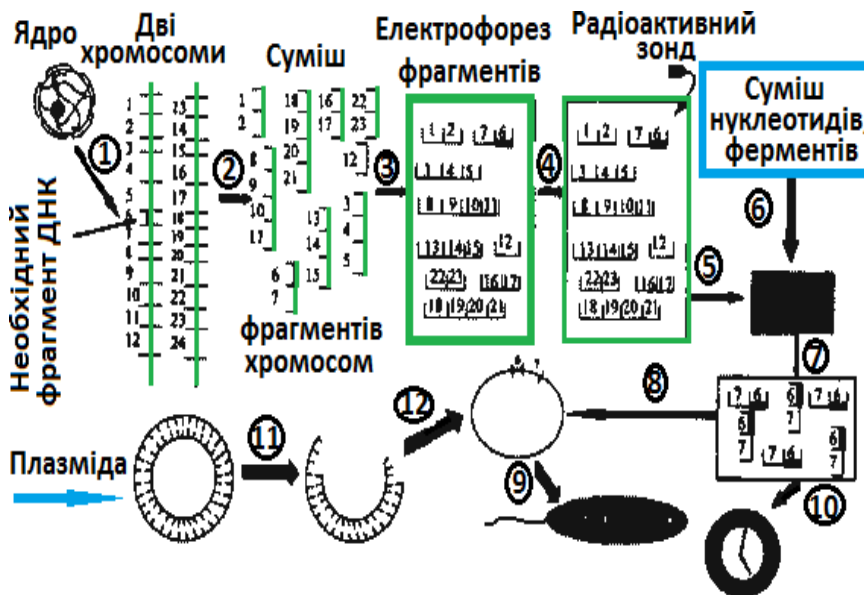


Рис.12.1. Схема основних етапів і методів генної інженерії: 1 — отримання ДНК із ядер; 2 — рестрикція ДНК на фрагменти (фрагмент 6 містить ген, що цікавить нас); 3 — розділення фрагментів за допомогою електрофорезу; 4 — ідентифікація необхідного фрагмента методом гібридизації із спеціальним ДНК-зондом; 5 — виділення потрібного фрагменту; 6 — синтез потрібного фрагменту; 7 — клонування фрагментів методом ПЛР; 8 — включення фрагменту ДНК в вектор; 9 — введення плазміди в бактерію; 10 —

введення фрагменту ДНК безпосередньо в ядро клітини реципієнта; 11 — рестрикція плазміди; 12 — включення в плазміду фрагмента ДНК.

Генетичний матеріал можна отримувати декількома методами: шляхом хімічного синтезу і шляхом ферментативної рестрикції ДНК (рис.12.2). Розвиток і успіхи генної інженерії пов'язані з вдосконаленням методів досліджень і серед них виділяють п'ять основних:

- рестрикція ДНК, що необхідна для виділення генів і маніпуляцій з ними;

- гібридизація нуклеїнових кислот для видалення специфічної послідовності ДНК;
- клонування ДНК шляхом введення отриманих фрагментів в швидко реплікуючі генетичні структури (плазмід, віруси), що дає можливість розмножувати їх у прокариот, одноклітинних грибів або еукаріот;

- визначення нуклеотидних послідовностей – секвенування в клонах фрагментів ДНК, що дозволяє визначити структуру генів і амінокислотні послідовності поліпептидів;

- хіміко-ферментативний синтез, необхідний для модифікації генів і роботи з ними. Хімічний синтез ДНК здійснюється з нуклеотидів у спеціальних умовах (рис.12.2.А) на основі розшифрованої нуклеотидної послідовності певної ділянки ДНК. Штучний ген аланінової тРНК був вперше синтезований в 1970 р. (Г.Корана). Цей ген складався з 77 пар нуклеотидів, але не мав регуляторних відділів і тому не функціонував. Опісля кількох років Г.Корана синтезував ген тирозинової тРНК, що містила промотор і термінатор. Цей ген, введений бактеріям, функціонував. В даний час синтезовано вже багато різноманітних генів.

Синтез деяких генів можна проводити також за допомогою мРНК і ферментів зворотної транскрипції (рис.12.2.Б). У певних умовах на матриці мРНК за допомогою спеціальних ферментів ревертаз синтезується комплементарний ланцюг ДНК. Потім на ній як



на матриці утворюється другий ланцюг ДНК. Така штучно отримана молекула називається ДНК-копією або кДНК.

Рис. 12.2. Схеми шляхів синтезу генетичного матеріалу. А - синтез нуклеотидів; Б - синтез на основі зворотної транскрипції мРНК: 1 - отримання мРНК; 2 – зворотна транскрипція; 3 – утворення дволанцюгової кДНК.

Рекомбінантні ДНК, принципи їх конструювання.

Технологія одержання рекомбінантних ДНК заснована на здатності азотистих основ утворювати комплементарні пари: А-Т (У) і G-C при гібридизації нуклеїнових кислот. Реакція гібридизації використовується в генетичній інженерії для створення гібридних молекул ДНК, а також як дуже чутливий метод виявлення певних послідовностей в ДНК і РНК. Якщо водний розчин ДНК нагрівати до температури 96-100°C і створити сильно лужне рН (> 13,0) середовище, то ДНК дисоціює на окремі ланцюги. Цей процес денатурації ДНК обернений, оскільки два ізольовані ланцюги ДНК при 65°C знову сполучаються, утворюючи подвійну спіраль, - процес називають ренатурацією, або гібридизацією (відпалювання). Гібридизація може йти між одинарними ланцюгами ДНК і/або РНК (звичайно, якщо вони мають комплементарні послідовності нуклеотидів), що приводить до утворення подвійних ланцюгів (дуплексів) різного складу: ДНК : ДНК; РНК : РНК; ДНК : РНК.

При конструюванні рекомбінантних ДНК гібридизація НК реалізується, як правило, двома основними методами: конекторним і рестриктазноїлізним.

Конекторний метод створює умови для гібридизації продуктів рестрикції різних геномів шляхом нарощування на їх кінцях олігонуклеотидних комплементарних ділянок (рис. 12.3).

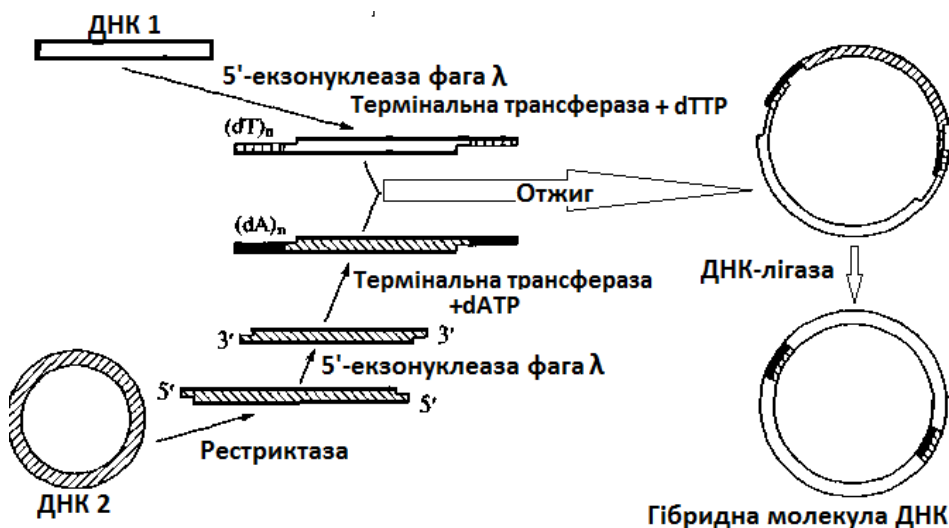


Рис. 12.3 Схема конекторного метода одержання гібридних молекул ДНК (С.Н.Щелкунов, 1994)

Гібридизація (відпалювання) цих фрагментів веде до утворення гібридних молекул ДНК. У цьому методі використовуються 3 ферменти: 5'-екзонуклеаза, термінальна нуклеотидилтрансфераза і ДНК-лігаза.

Саме цим методом П.Берг і співробітники отримали в 1972 р. першу гібридну молекулу ДНК.

Рестриктазно-лігазний метод (С.Коен і співавтори, 1973 р.) найбільш простий і популярний в генетичній інженерії. У цьому методі з використанням однієї рестриктази типу II, рестрикції, яка дає фрагменти, з «липкими кінцями», гібридизація між фрагментами хромосомної ДНК і ДНК-плазмідой здійснюється без додаткової процедури нарощування кінців за принципом комплементарності. Після закінчення гібридизації залишається тільки зшити полінуклеотидні фрагменти за допомогою ДНК-лігази (рис. 12.4).

Для локалізації специфічних послідовностей нуклеїнових кислот в хромосомах і клітинах використовують гібридизацію in situ. ДНК-зонди при цьому гібридизують з хромосомами після тимчасової дії лужного рН.

Далі місця гібридизації виявляють за допомогою радіоавтографії. При цьому використовують не лише радіоактивні, але і хімічно мічені ДНК-зонди.

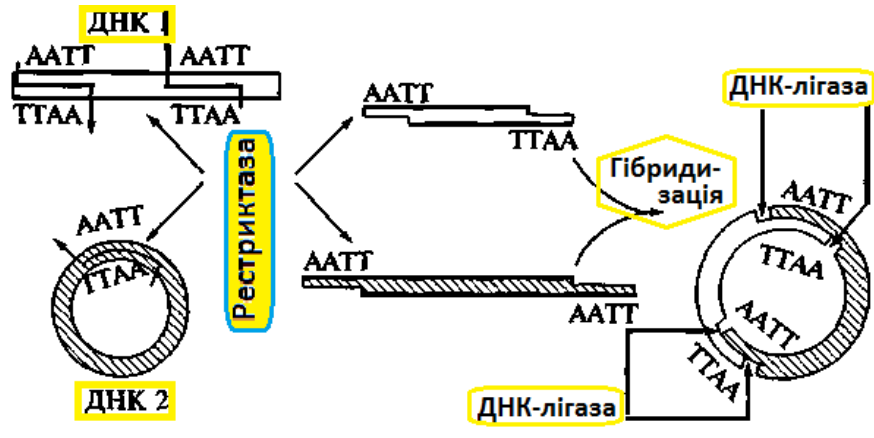


Рис. 12.4. Схема рестриктазно-лігазного методу отримання гібридної молекул ДНК

Для цього при синтезі зонду використовують нуклеотиди, що містять бічний ланцюг, який після гібридизації забарвлюють стрептовидином. За допомогою гібридизації in situ можна виявити локалізацію певних видів мРНК в клітинах і таким чином судити про диференціальну активність генів в ембріогенезі і процесі диференціювання в клітинах ембріона. Популярною біологічною моделю таких досліджень є ембріони плодової мушки дрозофіли.

При високому числі генів у еукаріот (від 6 200 у дріжджів, до 30 000 і більш у людини) виникає необхідність у використанні спеціальної техніки для одночасного отримання експериментальної інформації про активність великого числа генів в клітині.

Сучасна експериментальна техніка дозволяє створити матрицю – біочіп, розміром всього декілька сантиметрів, за допомогою якої можна отримати дані про функціональну активність багатьох (якщо не усіх) генів організму. У цьому методі на спеціальну (скляну)

підкладку за допомогою робіт нанносять зразки ДНК, які є або окремими генами, або молекулами кДНК, отриманими в достатній кількості для приготування біочіпів з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Після іммобілізації ДНК на матриці за допомогою ультрафіолету проводять гібридизацію генів, які містяться на чіпах, з утворюваними РНК, що виділяються з вивчаемого об'єкту. Для аналізу результатів гібридизації використовують флуоресцентні барвники. Після того, як флуоресціюючі зразки РНК прореагували з біочіпом, чіп сканують лазером і оцінюють інтенсивність сигналу флуоресценції, мірою функціональної активності генів, що служить. Використання біочіпів перспективне в різних напрямленнях, і зокрема для виявлення генів, що реагують на негативну (стресову) дію довкілля і здійснюють захисні функції в організмі. Так, за допомогою біочіпів підтверджена видатна роль гена, що кодує білок р53, в захисті організму від різноманітних ушкоджувальних реагентів.

Одним з найважливіших інструментів генної інженерії є ендонуклеази — ферменти, що розщеплюють ДНК по специфічних послідовностях нуклеотидів ланцюга. Рестрикція ДНК — процес «розрізання» молекул ДНК прокариот і еукаріот спеціальними ферментами-рестриктазами, що дозволяє отримувати ділянки з певними генами. Рестриктази розщеплюють ДНК на відносно невеликі фрагменти в ділянках певних послідовностей (рис.12.5). Цим їх дія відрізняється від більшості інших ферментативних, хімічних або фізичних дій, які приводять до випадкових розривів ланцюгів ДНК. Рестриктази (відкрито

більше 200 типів ферментів) є частиною захисної системи бактерій, що охороняють власний геном від чужорідної вірусної ДНК.



Рис. 12.5. Схема рестрикції ДНК (А) і утворення рекомбінантної (химерної) ДНК(Б): 1. Рестриктази розпізнають певні нуклеотидні послідовності ДНК і «розрізають» їх в місцях, позначених стрілками. 2. Фрагмент початкової ДНК з «липкими кінцями», готовими до комплементарної взаємодії. 3. Фрагмент «чужої» ДНК, отриманий після рестрикції тим же видом рестриктаз. 4. Рекомбінантна (химерна) ДНК, що складається з «своїх» і «чужих» генів.

Рестриктази прийнято іменувати по назві бактерій, з яких їх виділяють. Так, назва ECOR1 свідчить про те, що цей фермент Esherichia coli. Ватн1 — з Bacillus amilolquefaciens. Кожен фермент має певну 4-7-членну послідовність у дволанцюговій ДНК. Розрізання ДНК по

цих сайтах приводить до утворення або «тупих» (н., при дії рестриктаз HpaI), або «липких», тобто що перекриваються (н., Ватн1), кінців. Для конструювання гібридних молекул особливо зручні липкі кінці (рис.12.5). Будь-який фрагмент ДНК має характерне розташування сайтів пізнання різних рестриктаз, що дозволяє будувати так звані рестриктазні карти. При розщеплюванні ДНК одною рестриктазою отримують суміш фрагментів, кожен з яких має одні і ті ж кінцеві ділянки. Такі фрагменти можна розділити і ідентифікувати методом електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелі.

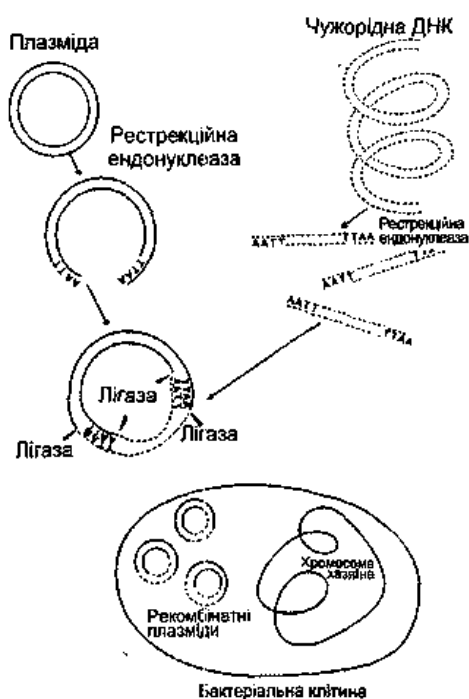
Слід зазначити, що виникнення генетичної інженерії було безпосередньо пов'язане з відкриттям цілої серії ферментів, які є незамінними інструментами для маніпулювання з

генами, зважаючи на практично повну відсутність відповідних хімічних методів, що дозволяють отримувати, модифікувати і ампліфікувати рекомбінантні молекули ДНК.

Гібридизація широко використовується для виявлення певних нуклеотидних послідовностей в суміші рестрикційних фрагментів. Такий прийом носить назву "блоттинг" (від англ. blot - промокати). З цією метою рестрикційні фрагменти фракціонують методом електрофорезу в 0,8% агарозі, що дозволяє розділити до 500 фрагментів, які відрізняються за розміром всього на один нуклеотид. Потім гель поєднують з аркушем паперу нітроцелюлози. В результаті дифузії фрагменти частково переходять на цей лист (blot), і таким чином, виходить реплікат (відбиток) з гелю. Потім методом радіоавтографії з використанням радіоактивного ДНК-зонду і рентгенівської плівки визначають на репліці положення фрагментів, які гібридизуються із зондом. Виявлення фрагментів ДНК з використанням ДНК-зондів, що призводить до утворення гібридів ДНК:ДНК, носить назву саузерн-блоттингу.

За методом нозерн-блоттингу ДНК-зонди гібридизують з реплікатами гелю, в якому фракціонують РНК, що призводить до утворення гібридів ДНК:РНК. Гібридизацію (блоттинг) зондів можна здійснювати на цілих хромосомах, які вдається фракціонувати в крупнопористих агарозних гелях методом пульс-електрофорезу, змінюючи напрям електричного поля, що дозволяє фракціонувати величезні молекули ДНК.

Клонування фрагментів нуклеїнових кислот *in vivo*.



Після того, як ДНК зшита в пробірці, її необхідно розмножити. Існує два методи клонування ДНК: *in vitro* і *in vivo*. Другий метод (*in vivo*) припускає використання бактеріальних або дріжджових клітин для розмноження уведеної в них чужорідної ДНК.

Схема основних етапів конструювання рекомбінантних ДНК *in vivo* представлена на рис. 12.6. Після отримання потрібних генів, їх вбудовують у вектор, н., в плазміді, і потім цю рекомбінантну конструкцію вводять у бактерію, де вона реплікується.

Рис. 12.6. Схема конструювання рекомбінантних ДНК *in vivo*.

Визначення поняття вектора в молекулярній біології.

Вектори - молекули ДНК, які використовують для зберігання, перенесення індивідуальних генів у клітини та примноження їх кількості.

Вектори повинні мати наступні властивості: невеликий розмір (для ефективного перенесення екзогенної ДНК в бактеріальну клітину, довжина вектора плазміди повинна включати не більше 15 тис. пар нуклеотидів; автономно реплікуватися в клітині-хазяїна; легко трансформуватися в клітину-хазяїна після включення чужорідної ДНК; мати унікальний сайт рестрикції, в який може бути здійснена вставка (при цьому місця розрізання і введення чужої ДНК не повинні впливати на реплікацію вектора); мати селективні генетичні маркери для ідентифікації реципієнтних клітин, які містять рекомбінантну ДНК.

Кращими векторами є природні реплікони невеликих розмірів – ДНК плазмід, вірусів, у тому числі і фагів, мітохондрій, хлоропластів, транспозонів. Природні молекули ДНК рідко використовуються безпосередньо як вектори, їх зазвичай модифікують або рекомбінують відповідно перерахованим вище вимогам.

Залежно від організації клітин, в яких вектори реплікуються, їх поділяють на вектори прокаріот і еукаріот. Є вектори, що містять реплікатори (ділянки ДНК, з якої починається процес її реплікації – огі-послідовності) генетично неспоріднених організмів. Такі вектори

реплікуються в генетично неспоріднених клітинах і їх називають векторами човникового типу.

Вектори прокаріот отримують від плазмід, фагів і їх комбінацій. Вектори еукаріот створюють для трансформації дріжджових клітин, грибів, вищих рослин і тварин. В клітини тварин гени вносять за допомогою векторів, сконструйованих на основі вірусів SV40, ретровірусів і ін. На основі вірусу вісповакцини сконструйовано вектор, в який включені гени грипу, гепатиту В, кору, та ін. для індукції імунітету проти даних вірусів.

У генетичній інженерії як вектор генів, які не мають аналогів в ДНК клітини-реципієнта і тому не здатних брати участь у гомологічній рекомбінації, найчастіше використовуються плазміди і фаги бактерій.

Клонування фрагментів нуклеїнових кислот *in vivo* (інфекція, трансфекція і клонування). Перенесення рекомбінантних молекул з пробірки в клітину відбувається шляхом інфекції або трансфекції. Сконструйовані рекомбінантні молекули ДНК вводять в клітини або вірусні частинки для клонування та ампліфікації. Для різних систем хазяїн-вектор застосовуються різні методи. Нагадаємо, що рекомбінантні ДНК, сконструйовані на основі бактеріальних і дріжджових плазмід або вірусів еукаріотів, трансфікуються в господарські клітини тільки після того, як клітинні мембрани стають проникними. Рекомбінанти, сконструйовані з використанням λ -векторів чи космід, упаковуються в фагові часточки, які потім використовуються для інфікування пермісивних клітин *E.coli* K12. Зазвичай трансфекція відбувається не дуже ефективно. Рекомбінантний геном включається лише в частину оброблених клітин. Вирощуючи клітини в умовах, при яких проявляється залежність від векторних генів, можна ідентифікувати потрібні клітини, і відібрати їх.

При плануванні експерименту по молекулярному клонуванню і його проведенню необхідно дотримуватися два основних принципи. По-перше, після конструювання *in vitro* окремі молекули рекомбінантних ДНК повинні бути введені в різні структури. Жодна з клітин не повинна отримати більше однієї плазмідної молекули або вірусної частинки. По-друге, ці структури повинні бути здатні до реплікації.

У результаті трансфекції та інфекції утворюються популяції самих різних клітин або популяції вірусів або бактеріофагів. Одні члени популяції містять потрібні рекомбінантні молекули, інші несуть рекомбінантів, що містять небажані вставки, чи векторні молекули взагалі без вставки, треті являють собою незмінені клітини. Крім того, можуть зустрічатися різноманітні непередбачувані і аберантні рекомбінанти, в тому числі вектори, в які включені дві або більше вставок, і рекомбінантів, у яких в результаті рекомбінації вже в клітині-хазяїна відбулася зміна вставки. Таким чином, трансфекція і інфекція не є останнім етапом експерименту з отримання рекомбінантної ДНК, а лише один з його етапів. Далі потрібно провести клонування і ідентифікацію потрібних рекомбінантів.

Клонування. Необхідною умовою успішного клонування є можливість поділу всіх трансфікованих або інфікованих клітин. Тільки в цьому випадку кожен клон буде представлений окремою колонією бактеріальних або тваринних клітин або негативно фаговою або вірусною колонією і буде містити певну рекомбіновану ДНК.

Плазмідні вектори. Трансфіціровані клітини висівають на агар таким чином, щоб вони були повністю ізольовані одна від одної і кожна могла дати початок окремої колонії. Зазвичай вектори містять принаймні один селективний маркер, за яким проводиться відбір трансфіцірованих клітин. При цьому нетрансфіціровані клітини не можуть утворювати колонії у використовуваному середовищі.

Фагові вектори. Інфіковані клітини висівають на середовищі чутливих клітин, на якому в результаті інфікування сусідніх клітин утворюються фагові бляшки. Деякі векторні системи мають вбудовані маркери, які дозволяють легко відбирати рекомбінантів серед реконструйованих інтактних векторів.

Вектори, сконструйовані на основі вірусів тварин. 8У40-вектори, які використовують для трансдукції, здатні продукувати вірусні частинки, клонуються так само, як і фаги-вектори. Однак, оскільки такі 8У40-вектори потребують вірус-помічника, заповнюють втрачені ними функції, вірусні бляшки можуть містити як рекомбінантні геноми, так і геноми помічника. Плазмід, сконструйовані на основі вірусу SV40, і пасивно трансформують вектори, які не продукують вірусних частинок, спочатку клонують як човникові вектори в клітинах *E.coli*. Зазвичай вони містять селективний маркер, який визначає фенотип тваринної клітини, що дозволяє відібрати клони трансформованих клітин. Аналогічно рекомбінантні вектори на основі папіломавірусів великої рогатої худоби і ретровірусів клонують в клітинах *E.coli* як човникові вектори, а потім трансфікують ними клітини тварин.

Клонування фрагментів нуклеїнових кислот *in vivo*. Методом клонування фрагменти ДНК будь-якого виду, одержані за допомогою рестриктаз, можна ввести в плазмід або у бактеріофаг і отримати вектор молекулярного клонування, а потім розмножити ці генетичні елементи *in vivo* – в клітинах бактерій або дріжджів, збільшуючи їх кількість в мільйони разів. Вбудовування фрагмента ДНК в плазмід здійснюється *in vitro*, а потім рекомбінантна ДНК вводиться в клітини бактерії-хазяїна. Найчастіше в ролі хазяїна виступає детально вивчений штам *E.coli* K12, а в ролі вектора - плазмід або фаги цієї бактерії.

Новий генетичний матеріал в бактерії може потрапити трьома шляхами: трансформацією, кон'югацією або трансдукцією. Трансформація здійснюється у разі внесення ДНК в культуральне середовище. У молекулярній біології цей метод забезпечує стабільну зміну генотипу і фенотипу бактеріальної клітини. Кон'югація – це перенесення ДНК (плазмід) з однієї клітини (донора) в іншу клітину (реципієнт) через особливий канал, що виникає між двома клітинами. В нормальних умовах це перенесення займає 90 хв. Встановивши час, необхідний для перенесення певних генів в процесі кон'югації, вдається побудувати генетичну карту бактерії. Трансдукція – процес включення генетичної інформації за участю бактеріофагів, які включають в геном бактерій нові генетичні елементи.

При використанні фагів в генній інженерії носієм рекомбінантної ДНК є популяція фагових часток, і рекомбінантний фаговий геном можна клонувати безпосередньо (у чашках Петрі) на газоні клітин-хазяїв, де утворюються фагові бляшки. Потім їх можна ввести в клітини бактерій у вигляді ізольованої ДНК (трансфекція) або у вигляді реконструйованих фагових часток (інфекція). Процедура отримання рекомбінантної ДНК і її клонування заснована на тих же принципах, що і трансдукція. Окрім бактеріофагів в ній використовуються плазмід.

Плазмід є кільцевими молекулами дволанцюгової ДНК, що зустрічається в клітинах бактерій і дріжджів, де реплікується в процесі проліферації клітин як самостійні одиниці. З точки зору генної інженерії плазмід мають декілька важливих властивостей або функцій, до яких належать: реплікація, несумісність, функція перенесення і стійкість до антибіотиків. Плазмід, які мають вищеперераховані властивості, разом з бактеріофагами використовують як вектори клонування. Вектор - молекула ДНК, яка здатна переносити в клітину сторонню ДНК і забезпечувати там її ампліфікацію. У генетичній інженерії процес вступу молекул ДНК в живі клітини бактерій, званий трансфекція, зазвичай здійснюється після обробки клітин СаС12, що робить їх оболонки проникнішими, і введення ДНК займає всього декілька хвилин.

Бактерійні плазмід мають блокову організацію. При цьому гени перенесення можуть об'єднуватися з репліконом (ділянкою, відповідальною за реплікацію). Блокова організація плазмід дає можливість методами генетичної інженерії спеціально конструювати вектори, які мають необхідні якості. Одним з найбільш поширених векторів є спеціально створена плазмід рBR322 (рис. 12.7). Нуклеотидна послідовність цього вектора (4 362 н.п.) повністю вивчена. У ньому є гени стійкості до ампіциліну (Amp^r) і тетрацикліну (Tet^r). Реплікон в цьому векторі узятий з плазмід Col EI. Ця природна плазмід *E.coli* містить ген, який кодує білок-токсин коліцин, що і позначено в її назві.

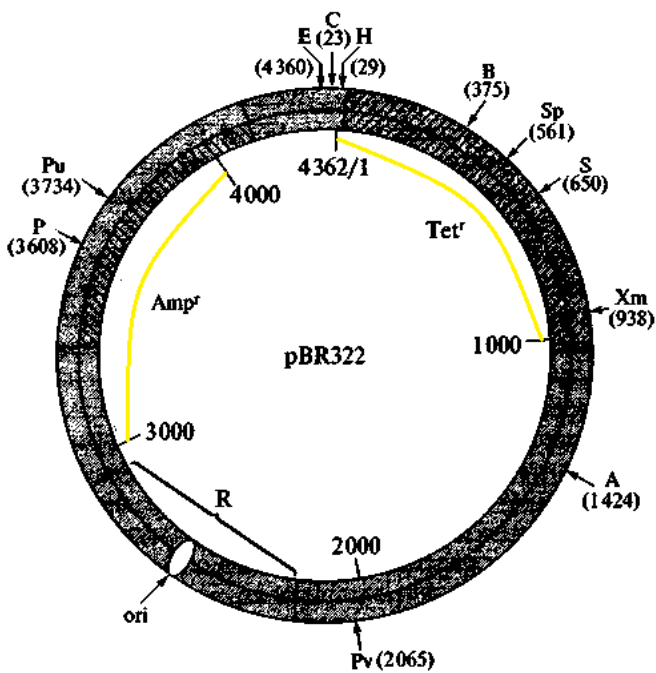


Рис. 12.7. Схема будови плазмідного вектора pBR322 (М.Сингер, П.Берг, 1998): ori - точка початку реплікації; Amp^r і Tet^r - гени стійкості до ампіциліну і тетрацикліну; вказані сайти рестрикції для різних рестриктаз; цифри означають число нуклеотидних пар; R - реплікон.

Реплікон забезпечує ініціацію реплікації, включаючи синтез особливого виду РНК (так званою РНКІ), яка контролює інтенсивність реплікації (число копій) плазміди в клітині. У нормі в клітині *E. coli* може міститися до 50 копій плазміди pBR322. Клітини *E. coli*, які містять цей вектор, вирощують в середовищі з ампіциліном або тетрацикліном, на якому клітини, що не мають цю плазмиду, не ростуть, і таким чином на такому

селективному середовищі накопичуються тільки ті клітини, які містять рекомбінантну ДНК. Ця властивість полегшує виділення великих кількостей рекомбінантної плазмідної ДНК. Із-за свого невеликого розміру плазмідна ДНК легко відділяється від хромосомної ДНК методом центрифугування.

У генетичній інженерії створюються плазмідні вектори, які забезпечують високий рівень експресії певних генів. Далі ген, який хочуть використовувати для посиленого напрацювання якого-небудь білку, поєднують в плазміді з сильним промотором – ділянкою ДНК, яка забезпечує ефективне зв'язування РНК-полімерази і високу швидкість синтезу матричної РНК. Окрім цього прагнуть використовувати регульовані промотори, інтенсивність дії яких можна змінювати шляхом зміни деяких параметрів (температури, концентрації певних іонів і так далі). Одним з таких сильних регульованих промоторів є промотор PL фага λ. Його активність зростає при підвищенні температури у зв'язку з інактивацією білка-репресора (A-репресор). Прикладом вектора з промотором PL фага λ є плазміда pL203. Цей вектор був створений з використанням плазміди pBR322, у якій регуляторна ділянка була замінена на таку фага λ (рис. 12.8).

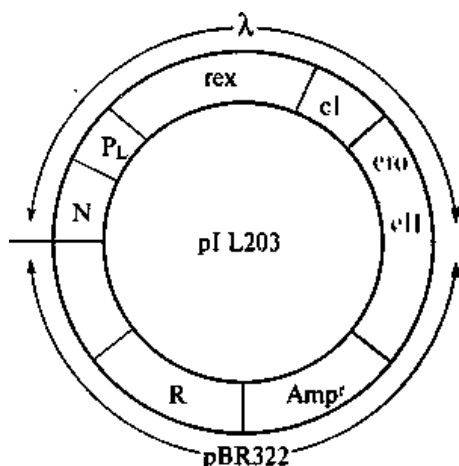


Рис. 12.8. Спрощена схема будови плазмідного вектора pL203: N, rex, ego, cl, ell - гени фага X; PL - регульований промотор; Amp^r - ген стійкості до ампіциліну

За допомогою цієї плазміди були створені бактеріальні штами-суперпродуценти декількох ферментів. Можливості плазмід для генної інженерії не безмежні, що пов'язано з їх невеликими розмірами. Коли треба клонувати великі фрагменти ДНК, зручніше використовувати вектори на основі бактеріофага X. Геном фага X досконально вивчений: він містить ділянку початку реплікації (ori), гени білків голівки і хвостового відростка, а також гени ферментів, необхідні для реплікації фагової ДНК, гени лізису клітин, які інфікуються, і гени, які детермінують лізогенний шлях існування фага. У центральній частині лінійного генома фага знаходиться ділянка, не обов'язкова для літичної інфекції, яку і використовують для вставки клонованої ДНК. ДНК фага λ розрізають за допомогою рестриктази Eco RI, видаляють не обов'язкову центральну ділянку і на її місце вбудовують

потрібний фрагмент ДНК, отримуючи, таким чином, конкамер – попередник для упаковки фагової ДНК в зрілі фагові частки. Фаг λ дуже пластичний: без порушення розвитку фага з нього можна прибрати до 25 % ДНК або прибродувати до 6 % зайвої ДНК. У цей фаговий вектор можна вбудовувати до 23 ТОВ н. п.

У тих випадках, коли не вистачає можливостей фага, використовують ще більші вектори - косміди. До складу космід входять: ген (маркер) резистентності до антибіотиків, реплікон плазміди і фрагмент ДНК фага λ (так звана *cos*-ділянка). Цей фрагмент має одноланцюгові комплементарні ділянки на кінцях фагової ДНК, тобто "липкі кінці". Косміди по суті є рухливі "cos"-сайти, між "липкими кінцями" яких вдається вбудувати фрагменти ДНК завдовжки до 45 000 н. п.

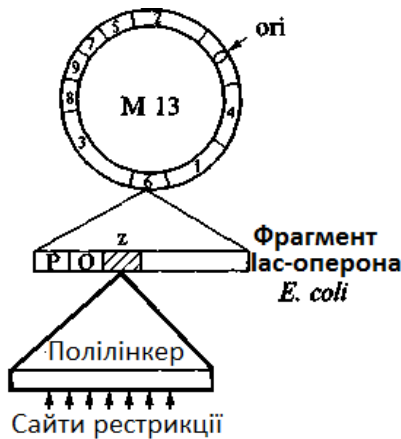


Рис. 12.9. Вектор на основі фага M13: 1-9 - гени фага M13; z - ген *lac*; P - промотор; O - оператор. Полілінкери (42 н. п.) містять сайти рестрикції для різних рестриктаз.

Ще один вид векторів - фазміди, штучні гібриди між фагом і плазмідом. Вставки сторонньої ДНК в одних умовах можуть розмножуватися як фаги, а в інших - як плазміди. Фазміди мають певні переваги перед векторами інших типів. Їх можна "упаковувати" в оболонки фагових білків, і вони існують як фаги, при температурі 42°C, або, використовуючи термочутливий білок - репресор фага λ , примушувати їх розмножуватися як плазміди (при нижчій температурі ~32 °C).

Вектори на основі ниткоподібних фагів застосовують тоді, коли зручніше працювати з одним ланцюгом ДНК (н., для визначення її нуклеотидної послідовності). Так, фаги M13 і fd містять кільцеву одноланцюгову ДНК з повністю вивченими послідовностями нуклеотидів (6407 нуклеотидів у фага M13) і їх організацією. Ці фаги можуть міститися у кількості 200-300 копій на одну бактеріальну клітину. Для розмноження вони переходять в двуланцюгову реплікативну форму, в яку за допомогою рестриктаз і лігаз легко вбудувати потрібний фрагмент ДНК, де далі він розмножуватиметься і існуватиме в одноланцюговій формі. Типовий вектор на основі фага M13 зображений на рис. 12.9.

Для зручності відбору рекомбінантів ген дикого типу M13 модифікують, вбудувавши в нього частину лактозного оперону (*lac*-оперона) *E.coli*, що включає промотор, оператор і кодуючу ділянку гена β -галактозидази. У цю ділянку додатково вбудовують фрагмент ДНК, який містить сайти пізнавання для певних рестриктаз, з тим, щоб далі можна було їх використовувати для включення фрагментів ДНК з відповідними "липкими кінцями". Такий сегмент називають полілінкером.

Найчастіше для клонування ДНК використовують прокаріотичні системи хазяїн-вектор. Проте зараз починають розвиватися відповідні еукаріотичні системи клонування, в яких використовують клітини дріжджів, рослин і тварин.

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* – перспективні моделі для експериментів з рекомбінантною ДНК. Їх гаплоїдний геном містить $1,4 \times 10^7$ н.п. (у 3 рази більше, ніж у *E. coli*), розподілених по 17 хромосомах. Дріжджі не інфікуються вірусами, але в їх клітинах виявлена плазміда, яка використовується як вектор – 2 мкм-плазмідна ДНК. Ця дволанцюгова плазміда має довжину в 318 н.п., на одну дріжджову клітину приходить 50 копій. Дикий тип цієї плазміди не має маркерних генів, що не дозволяє відбирати клітини, які її містять. Проте 2 мкм-плазміда була використана для створення так званого човникового вектора, отриманого шляхом об'єднання її частини з плазмідом rBR322, яка містить дріжджовий ген. Ген дріжджової клітини кодує фермент, необхідний для біосинтезу гістидину, завдяки чому вдається проводити відбір клітин, які ростуть в відсутності гістидину. Для введення вектора, жорстку полісахаридну стінку дріжджових клітин руйнують за допомогою відповідних

ферментів або обробляють їх ацетатом літію, що відкриває можливість для проникнення ДНК в клітини.

Важливою особливістю дріжджових систем є те, що клоновані фрагменти ДНК здатні до рекомбінації з гомологічними ділянками дріжджового генома, що веде до стабільної сайт-специфічної трансформації останнього (незалежно від збереження або втрати вектора). Тому останнім часом створені конструкції на основі дріжджових хромосом, які дозволяють клонувати в клітинах дріжджів фрагменти ДНК розміром до 1 000 000 н. п.

У клітинах рослин немає природних плазмід і як вектори можуть бути використані різні рослинні віруси. В той же час вектори для рослинних клітин найуспішніше створюють на основі особливих бактерійних Ті-плазмід, які мають здатність переносити сегменти ДНК в геноми рослин.

При введенні ДНК в клітини тварин часто використовують віруси, в які заздалегідь вводять необхідний сегмент ДНК. Після утворення віріонів віруси проникають в клітини шляхом інфікування. Упаковка відбувається зазвичай *in vivo*, оскільки *in vitro*, на відміну від бактеріофагів, цей процес здійснити не можливо. Можна проводити і пряму ін'єкцію ДНК в клітини і їх ядра, але при цьому трансформується тільки мала частина досліджуваних клітин (не більше 10%). У ряді випадків використовується електропорація - обробка суміші клітин і ДНК, які вводяться, високовольтним (2-4 тис. Вольт) електричним розрядом, що призводить до утворення в мембранах клітин отворів (пор), необхідних для проникнення ДНК. Вектори для трансформації клітин тварин найчастіше створюють на основі вірусу SV40 і вірусу папіломи. На основі вірусу SV40, аналогічно вищезгаданій процедурі конструювання векторів на основі фага X, створено декілька типів векторів: трансдукуючі, плазмідні і пасивні. Трансдукуючі вектори реплікуються в клітинах бруньок мавпи і упаковуються у віріони. Плазмідні SV40 - вектори реплікуються, але не упаковуються в білкові оболонки. Пасивні трансформуючі вектори не можуть ні реплікуватися, ні упаковуватися, проте містять ділянки генома вірусу, які сприяють експресії інших генів. Стабільна трансформація в клітинах тварин відбувається тоді, коли плазмідні вектори SV40 інтегруються в геном клітини-хазяїна. Частота цієї інтеграції складає не більше 10^{-5} - 10^{-3} .

Папіловіруси викликають доброякісні новоутворення шкіри (бородавки) у ряду видів тварин. Геном папіломовірусу великої рогатої худоби (BPV) використовують для створення векторів тварин. Він здатний реплікуватися у вигляді стабільної плазміди без утворення віріонів. Вбудовування ДНК в цей вектор відбувається із збереженням "трансформуючої" частини генома вірусу. При цьому вектор не вбудовується в геном клітини-хазяїна, а залишається в ній у вигляді плазміди в кількості від 10 до 100 копій.

Реплікація у бактеріях.

Оскільки при кожному клітинному поділі бактерії (як і будь-які інші клітини, не рахуючи попередників статевих клітин) подвоюють свою ДНК, це можна використати для примноження кількості необхідної нам ДНК. Для того, щоб вбудувати наш фрагмент ДНК у бактерію, необхідно «вшити» його в спеціальний вектор, в якості якого зазвичай використовують бактеріальну плазмиду (невелику — відносно бактеріальної хромосоми — кільцеву молекулу ДНК, яка реплікується окремо від хромосоми). У бактерій «дикого типу» часто зустрічаються подібні структури: вони часто переносяться «горизонтально» між різними штамми або навіть видами бактерій.

Найчастіше в них містяться гени стійкості до антибіотиків або бактеріофагів, а також гени, що дозволяють клітині використати різноманітніший субстрат. Саме такі плазмиди зазвичай і використовують в молекулярно-генетичних дослідженнях. (Рис. 12.10). У плазмідах обов'язково міститься послідовність, з якої розпочинається реплікація молекули (точка початку реплікації), цільова послідовність рестриктази і ген, що дозволяє відібрати ті клітини, в яких є ці плазмиди (зазвичай, це гени стійкості до якого-небудь антибіотика).

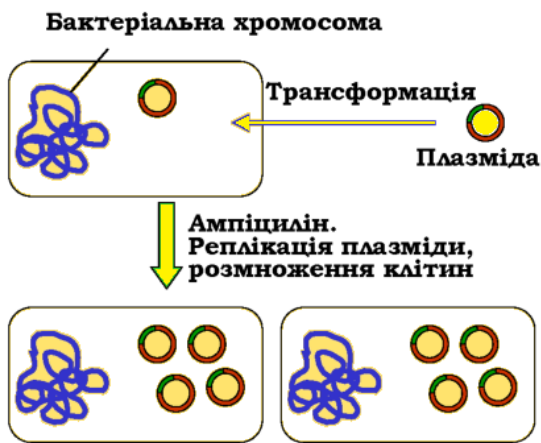


Рис. 12.10. Розмноження рекомбінантних плазмід в бактеріальних клітинах.

В деяких випадках (н., при вивченні дуже великих фрагментів ДНК) використовують не плазмиду, а штучну бактеріальну хромосому. У плазмиду за допомогою рестриктаз і лігаз вбудовують необхідний фрагмент ДНК, після чого додають її в культуру бактерій за спеціальних умов, що забезпечують *трансформацію* — процес активного захоплення бактерією ДНК із зовнішнього середовища. Після цього проводять відбір бактерій,

трансформація яких пройшла успішно, додаючи ті, які відповідають гену в плазмиді антибіотика: в живих залишаються тільки клітини, що несуть ген стійкості (а, отже, і плазмиди). Далі, після зростання культури клітин, з неї виділяють плазмиди, а з них за допомогою рестриктаз виділяють «наш» фрагмент ДНК (чи використовують плазмиду цілком). Якщо ж ген вставили в плазмиду для того, щоб отримати його білковий продукт, необхідно забезпечити культурі умови для зростання, а потім просто виділити необхідний білок.

На цьому місці відразу ж повинне виникати питання: як же усе це можливо було використати до того, коли були розшифровані геноми, та і читання послідовності ДНК було ще дорогим і малопоширеним? Допустимо, за допомогою рестрикції і клонування отриманих фрагментів ми отримуємо бібліотеку ДНК, тобто набір бактерій, що несуть різні плазмиди, які містять сумарно увесь геном (чи помітну його частину). Але яким чином ми зможемо зрозуміти, в якому з фрагментів міститься необхідний ген? Для цього використали метод гібридизації. Спочатку необхідно було виділити білок потрібного гена. Після чого секвенування його фрагменту, обернути генетичний код і отримати послідовність нуклеотидів (звичайно, із-за виродженості генетичного коду доводилося пробувати багато різних варіантів). Відповідно до неї хімічно синтезували коротку молекулу ДНК, яку і використали в якості зонду для гібридизації.

Але в деяких випадках цей метод давав збої — наприклад, так сталося з чинником згортання крові VIII. Цей білок бере участь в згортанні крові, і порушення в його функціональності є причиною одного з найпоширеніших генетичних захворювань — гемофілії А. Раніше для лікування доводилося виділяти цей білок з великої кількості організмів, тому що не вдавалося клонувати його для виробництва бактеріями. Пов'язано це було з тим, що його довжина складає близько 180000 пар нуклеотидів, і він містить багато нітронів (некодуєвих фрагментів між тими, що кодують) — не дивно, що не в одну плазмиду цей ген не потрапив цілком.

Біологічні вектори: (плазмиди, бактеріофаги, косміди, штучні хромосоми).

Вектор — це щось ніби молекулярного «таксі», здатного переносити чужорідну ДНК всередину клітини-хазяїна так, щоб вона там могла реплікуватися.

Вектор, який включає фрагменти чужорідної ДНК, повинен проникати в реципієнтні клітини, вибрані для клонування гена. Ці клітини можуть бути як про-, так і еукаріотичними. Найчастіше для цієї цілі використовують бактерії, оскільки їх легко отримувати у великій кількості. Вбудовані в плазмиди чужі гени передаються в клітину хазяїна шляхом трансдукції і вбудовуються в їх геном, де стають здатними до швидкої реплікації за допомогою ферментів клітини хазяїна. Процес швидкого отримання великої кількості однакових копій молекул називається клонуванням. Клон — це велика популяція ідентичних молекул, клітин, організмів, отриманих від одного предка. Шляхом клонування вектора у реципієнтних

клітинах можна забезпечити отримання великої кількості потрібного гена у високоочищеному вигляді або великої кількості білка, який кодується даним геном. У геном тварин фрагменти чужої ДНК вводять шляхом мікроін'єкції безпосередньо в ядро клітини.

Існує два основні типи векторів: бактеріальні плазміди і бактеріофаги.

Бактеріальні плазміди — це невеликі кільцеві молекули дволанцюгової ДНК, у функції яких входить, наприклад, забезпечення стійкості до антибіотиків. Плазміди мають декілька властивостей, які роблять їх надзвичайно зручними для використання в якості векторів. Зокрема в бактеріальній клітині вони можуть існувати в безлічі копій, можуть реплікуватися незалежно від господарської ДНК. Для багатьох плазмід відома повна нуклеотидна послідовність. Це робить можливою точну локалізацію сайтів рестрикції для клонування фрагментів ДНК. Плазміди значно менші господарської хромосомної ДНК і тому можуть бути легко відокремлені від неї. Клонований фрагмент легко виділяється з рекомбінантної плазміди за допомогою її розщеплювання тієї ж рестриктазою.

Бактеріофаги зазвичай містять лінійну ДНК, в яку можуть бути вбудовані фрагменти чужорідної ДНК по якому-небудь з доступних сайтів рестрикції. Основною перевагою фагових векторів перед плазмідними є те, що в них вдається вбудувати в 2-3 рази крупніші фрагменти «чужої» ДНК.

Необхідні гени вирізають з хромосом тварин, з'єднують з плазмідами або фагами, які також розрізають спеціальними рестриктазами (рис.12.2 і 12.3). Через деякий час фрагменти різної ДНК з'єднуються відповідно до принципу комплементарності і ДНК плазміди відновлюють початкову кільцеву форму. Так можна з'єднувати відрізки ДНК, одержаних з різних клітин і створювати комбінації різноманітних генів в одній молекулі. Для з'єднання ділянок ДНК застосовують лігазу — один з ферментів репарації. Процес ковалентного з'єднання «липких» кінців фрагментів ДНК називають «лігуванням». Використовуючи різні рестриктази і лігази, можна розрізати і зшивати нитку ДНК в різних місцях і отримувати різноманітні рекомбінантні (химерні) молекули.

Косміди. Вектори косміди, можуть включати до 40 тисяч пар нуклеотидів чужорідної ДНК і при цьому активно ампліфіцикуватися в *E. coli* як плазміди. Косміди об'єднують в собі властивості плазмідних векторів і векторів на основі фага λ . Наприклад, широко вживана косміда pLFR-5 (приблизно 6 тисяч пар нуклеотидів) має два *cos*-сайта фага λ , крапку початка реплікації ДНК і ген стійкості до тетрацикліну. Ця косміда може інтегрувати чужорідну ДНК, довжина якої до 40 тисяч пар нуклеотидів.

Опинившись у бактеріальній клітині, лінійна молекула pLFR-5 зі вставкою замикається в кільце завдяки спаровуванню *cos*- сайтів. У такій стабільній конфігурації вона може довгий час існувати в клітині і реплікуватися як гібридна плазміда, оскільки містить всі необхідні для цього елементи. Крім цього, ген стійкості до тетрацикліну забезпечує ріст колоній, які несуть дану косміду, на середовищі з цим антибіотиком; трансформовані клітини при цьому гинуть. Існують і інші космідні вектори на основі фага.

Косміди мають велику перевагу в порівнянні з плазмідами: в них можна вбудувати довші фрагменти ДНК, а це означає, що для створення бібліотеки генома потрібна менша кількість клонів і буде потрібно менше часу на їх скринінг.

Векторні системи, здатні інтегрувати крупні вставки (>100 тисяч пар нуклеотидів), мають велику цінність при аналізі складних еукаріотичних генів. Без таких векторів не обійтися, наприклад, при картированні генома людини. На відміну від бібліотек з невеликими вставками найчастіше буде представлений весь генетичний матеріал організму. Крім того, в цьому випадку зменшується число клонів, яке потрібно підтримувати, і збільшується вірогідність того, що кожен з генів буде присутній в «своєму» клоні.

Штучні хромосоми. Для клонування фрагментів ДНК розміром від 100 до 3000 тисяч пар нуклеотидів був сконструйований низькокопійний плазмідний вектор на основі

бактеріофага P1. Це химерна конструкція, називається штучною хромосоною. Був створений також дуже стабільний вектор, здатний інтегрувати вставки довжиною від 150 до 300 тисяч пар нуклеотидів, на основі F-плазміни E.coli, яка представлена в клітці однією або двома копіями з селекційною системою lac Z - ця конструкція називається бактеріальною штучною хромосоною.

Штучні хромосоми містять три основні елементи: кінцеві ділянки (теломери), центромеру і точки ініціації реплікації. Властивості теломерних ділянок хромосом людини добре вивчені, чого не можна сказати про центромери і точки ініціації реплікації. Існували побоювання, що штучні хромосоми не вдасться сконструювати, поки не будуть досконально вивчені всі її елементи. Але вже отримані і підтримуються в трансфіцированій культурі стабільні, лінійні, штучні хромосоми людини (мікрохромосоми), ДНК повторів (завдовжки близько 1 мільйона пар нуклеотидів), центромерної ділянки, високомолекулярних фрагментів ДНК генома і теломерних ділянок. У їх центромерну ділянку був вбудований ген стійкості до неоміцину, що дозволило використовувати середовище С 418 в якості селективного.

Дві з трьох мікрохромосом були отримані «усіканням» існуючої хромосоми. В одному випадку вихідна центромера була збережена, а в іншому замінена трансфіцированою центромерною ділянкою. Третю, штучну мікрохромосому, отримали лігуванням *in vitro* трьох трансфіцированих ДНК-елементів. Зрозуміло, що створення штучної хромосоми людини, яка містить «терапевтичні» гени, цілком реально. Основною проблемою стане доставка цієї величезної молекули ДНК в ядро клітини-мішені. Крім того, експресія генів, що входять до складу ДНК-блоку, з яких побудована штучна хромосома, може надати шкідливу дію на клітини-мішені. Спершу в тканині пацієнта можна спробувати імплантувати інкапсульовані клітини зі штучними хромосомами. Нещодавно вченими були створені лентивірусні вектори. Вони широко використовуються при генетичних захворюваннях, тому що їх структура допускає перенесення великих генів, наприклад генів гемоглобіну, факторів згортання крові VIII, IX та інших. Головна перевага лентивірусних векторів перед іншими ретровірусами - в можливості інтеграції в геном всіх клітин. Це особливо важливо для перенесення генів в примітивні стовбурові кровотворні клітини, тому що основна маса останніх перебуває поза клітинним циклом, а мобілізація в цикл суттєво позначається на проліферативному потенціалі і частки стовбурових кровотворних клітин при трансплантації.

Методи пошуку специфічних рекомбінантних ДНК.

Пошук в клоні специфічних нуклеотидних послідовностей здійснюється наступними методами: скринінг (*screening* — добір, сортування) клонованих рекомбінантних молекул за допомогою гібридизації; тестування на синтез специфічного поліпептиду *in vitro*; визначення експресії гена в клітинах; фенотиповий добір; імунологічний скринінг.

Скринінг за допомогою гібридизації. Після поділу рекомбінантних молекул і отримання окремих клонів постає важке завдання – виявлення потрібного клону або клонів. Ідентифікація клону ґрунтується на тому, що вставка в рекомбінантній ДНК детермінує яку унікальну властивість містять її клітини. Ця властивість може визначатися структурою самої вставки або бути пов'язана з її функцією. На ньому ґрунтується скринінг популяції клонів з метою ідентифікації одного потрібного клону. Методи скринінгу повинні бути дуже чутливими, оскільки іноді доводиться ідентифікувати один клон із сотень тисяч або навіть мільйонів клонів.

Гібридизація використовується для виявлення послідовностей в ДНК, які транскрибуються і не транскрибуються. При цьому аналізуються продукти гібридизації ДНК і матричних РНК, що дозволяє виявити активні (що транскрибуються) ділянки в молекулах ДНК. Саме аналіз результатів гібридизації ДНК:РНК дозволив У. Гілберту виявити мозаїчну будову генів еукаріот, що стало одним з найважливіших відкриттів в молекулярній біології.

Гібридизація використовується для знаходження певних нуклеотидних послідовностей (генів) в ДНК. З цією метою застосовують ДНК-зонди - радіоактивні фрагменти ДНК з відомою нуклеотидною послідовністю. Мітку в зонд вводять шляхом нік-трансляції. Оскільки швидкість ренатурації (гібридизація) денатурованої нагріванням ДНК лімітується вірогідністю зіткнення послідовностей комплементарності, швидкість гібридизації з ДНК-зондом дає можливість визначити число копій генів в ДНК. Це дуже точний метод, який дозволяє виявити один єдиний ген в клітині. Так виявляють унікальні гени, а також гени, представлені в геномі десятками або сотнями копій.

Відпалювання з комплементарними полінуклеотидами. Комплементарні одноланцюгові РНК або ДНК, при відповідних умовах з легкістю ренатурують, незважаючи на присутність великого надлишку неспоріднених ланцюгів. Це створює потужний інструмент для виявлення специфічної вставки, який можна використовувати в різних ситуаціях.

Відпалювання з радіоактивним зондом. Припустимо, що є велика популяція клонованих рекомбінантних молекул і проводимо відпалювання з певним полінуклеотидним зондом. Тоді міченими стають тільки ті рекомбінантні молекули, які містять послідовності, комплементарні зонду. Успіх експерименту залежить від наявності потрібного зонда.

Для скринінгу великої кількості колоній, які містять плазмідні, а також фагових бляшок, розроблені зручні та швидкі методи. На тих же принципах заснований і скринінг 8У40-бляшок. Метод полягає в тому, що бактеріальні колонії або бляшки переносять з агару на іммобілізовану підкладку, наприклад на нітроцелюлозний фільтр, і піддають ДНК, яка міститься в них, денатурації. Потім фільтр інкубують в розчині, що містить денатурований ³²P-мічений зонд, в умовах, які сприяють ренатурації комплементарних ланцюгів. Якщо колонія чи бляшка містить комплементарну зонду ДНК, то на радіоавтограмі у відповідному місці буде спостерігатися потемніння. Незважаючи на те що кожна бляшка або колонія містить лише невелику кількість ДНК, її вдається виявити завдяки високій радіоактивності зондів.

Отримати великі колекції клонованих колоній або бляшок на нітроцелюлозних фільтрах не складає труднощів. Бактерії і дріжджі добре ростуть на самому нітроцелюлозному фільтрі, вміщеному на відповідний поживний агар. Фільтр, що містить колонії, обробляють так, щоб відбулися лізис клітин і денатурація ДНК, відпалюють денатуровану ДНК із зондом, ідентифікують бляшки, в яких ДНК гібридизувалася, і відбирають клітини з відповідної ділянки агару. Фагові бляшки переносять на нітроцелюлозний фільтр, наклавши його на поживний агар. За один раз на фільтр може бути перенесено до 10000 бляшок з однієї чашки діаметром 10 см. Якщо обережно зняти фільтр, то ДНК з кожної бляшки залишиться фіксованою на ньому. Після відпалювання та ідентифікації потрібних бляшок можна відібрати фагові частки з бляшок, які залишилися на чашці з агаром. Аналогічним чином можна виявити упаковані рекомбінантні молекули вірусу SV40. Поживний агар, який покриває інфікований моношар клітин мавпи, видаляють, весь моношар переносять на нітроцелюлозні фільтри і ідентифікують потрібні бляшки шляхом відпалювання з відповідним радіоактивно міченим зондом. Віріони, які містять рекомбінантні ДНК, відбирають з агарового шару.

В якості зондів можна використовувати високоочищені мРНК і денатуровані гомологічні ДНК або кДНК. Особливо зручні одноланцюгові зонди, оскільки їх не потрібно денатурувати і тестовані клоновані ДНК не конкурують з іншими гібридизуючими ланцюгами ДНК під час відпалювання. мРНК-зонди вже є одноланцюговими, а одноланцюгові кДНК-зонди легко отримати, скопіювавши тільки один ланцюг. Одноланцюгові РНК-зонди можна також приготувати з рекомбінантної плазміді, що містить послідовність зонда, вбудовану в спеціальний вектор, наприклад рGEM. Цей вектор містить два різних високоспецифічних бактеріальних промотора, фланкують вставку рекомбінантних молекул. Використовуючи

очищену відповідним чином лінеаризовану плазмиду в якості матриці *in vitro* і ту чи іншу з РНК-полімераз прокариот, синтезують РНК, яка представляє собою копію однієї з двох ланцюгів вставки.

Якщо відома амінокислотна послідовність поліпептиду, кодованого даним геном, то можна відновити нуклеотидну послідовність цього гена і потім синтезувати його хімічними методами. Навіть у тих випадках, коли як зонд використовується ділянка ДНК довжиною всього 15 нуклеотидів, можна отримати відносно достовірний результат. Через вираженість генетичного коду неможливо точно відновити унікальну послідовність кодуєчої ділянки. Щоб вирішити цю проблему, синтезують суміш олігонуклеотидів, які розрізняються одним або кількома нуклеотидами. Це не так важко, як здається. Замість того щоб використовувати один захищений мононуклеотид на певному етапі хімічного синтезу, використовують суміш захищених мононуклеотидів.

Тестування на синтез специфічного поліпептиду *in vitro*. Іноді не вдається провести прямий скринінг клонів тому, що просто немає у достатній мірі очищеного відповідного зонду. У такому випадку можна використовувати непрямі методи, хоча зазвичай вони незручні при масовому скринінгу клонованих популяцій. Зазвичай застосовуються непрямі методи засновані на двох принципах. По-перше, можна транскрибувати відповідну мРНК *in vitro* та отримати ідентифікований поліпептид. По-друге, можна використовувати той факт, що трансляція пригнічується, якщо одноланцюгова мРНК ренатурує з комплементарною клонованою ДНК. РНК, що входить до дуплекс РНК-ДНК, не здатна функціонувати як мРНК. Якщо проінкубувати суміш мРНК *in vitro* в присутності необхідних компонентів, то на них синтезуються відповідні поліпептиди. Суміш цих поліпептидів можна розділити за розмірами з допомогою електрофорезу. Ефективна трансляція *in vitro* здійснюється тільки з одноланцюгових мРНК. Якщо ж до початку трансляції якась мРНК ренатурувала з комплементарною ДНК і утворився гібридний дуплекс ДНК-РНК, то інформація з цієї мРНК не буде зчитуватися. За допомогою процедури, яка отримала назву HART, клоновані рекомбінантні ДНК очищають, денатурують і відпалюють з препаратами мРНК до початку трансляції *in vitro*.

Другий метод ідентифікації рекомбінантних молекул за допомогою трансляції *in vitro* отримав назву гібридизаційної селекції. З популяції рекомбінантів виділяють і очищують рекомбінантні ДНК. Отримані препарати ДНК піддають денатурації і кожен з них фіксують на твердій основі, на нітроцелюлозному фільтрі. Кожен з препаратів інкубують з сумішшю мРНК. Гібридизація і зв'язування РНК на фільтрі відбуваються тільки в тих випадках, коли РНК виявляється комплементарною клонованій ДНК. Всі інші РНК видаляються з фільтру при промиванні. Пов'язану РНК відокремлюють від ДНК і тестують на синтез специфічного поліпептиду в трансляції *in vitro*. Це дозволяє ідентифікувати відповідні рекомбінанти.

Для полегшення ідентифікації поліпептидів, що утворюються при трансляції суміші мРНК *in vitro*, використовують різні методи. Якщо препарат мРНК збагатити специфічною мРНК, то поліпептид, на якому кодується така мРНК, іноді вдається ідентифікувати серед продуктів трансляції за його розміром і кількістю. Коли використовується складна суміш мРНК і поліпептидів, яка цікавить нас, поліпептид можна ідентифікувати за його здатністю взаємодіяти зі специфічними антитілами. У таких випадках застосовують метод білкових блотів, аналогічний до блотів ДНК. При іншому підході потрібний поліпептид осаджують у присутності специфічних антитіл із суміші продуктів трансляції *in vitro*, осад розчиняють і піддають електрофорезу. У принципі в гелі повинні бути присутніми тільки два білки - цікавий для нас поліпептид і імуноглобулін.

Визначення експресії гена в клітинах. Експресується ген, що входить до складу рекомбінантної ДНК, при певних умовах надає клітині-хазяїну специфічні фенотипічні властивості. Метод відбору, заснований на виявленні цього фенотипу, дозволяє

ідентифікувати та виділяти відповідний клон точно так само, як стандартні селективні маркери у векторних молекулах дозволяють відбирати трансформовані клітини. До стандартних селективних маркерних систем відносяться клітини *E.coli*, що втратили β -лактамазу, які використовуються для відбору трансформантів, що містять вектори з геном *amp*; також клітини ссавців, які мають фенотип ТК, дозволяють відібрати трансформанта, що містить вектори з геном тимідинкінази. За допомогою фенотипового відбору можна відбирати специфічні клони безпосередньо з популяцій бактерій, дріжджових або тваринних клітин, трансформованих сумішшю рекомбінантних векторів, які містять різні гени бактерій, дріжджів або тварин відповідно. Можливість проведення такого відбору залежить від наявності хазяйських клітин з певним фенотипом, найчастіше клітин, дефектних щодо продукту гена, який повинен бути клонований. Якщо відсутні потрібні хазяйські клітини, то замість фенотипового відбору можна використовувати імунологічний скринінг. У таких випадках клони відбирають за допомогою антитіл, специфічних у відношенні продукту даного гена.

Фенотиповий добір. Фенотиповий відбір з популяції трансформованих клітин – це найпряміший шлях виділення потрібного клону. На практиці цей метод, взагалі, обмежується клонуванням прокаріотичних генів і деяких генів дріжджів та інших грибів у клітинах прокаріот та еукаріотичних генів в клітинах еукаріотів. Щоб клонувати ген А, суміш фрагментів ДНК вбудовували в векторні молекули і трансфіцирували ними клітини, мутантні по гену А. Клітини вирощували в умовах, які вимагають присутності продукту гена А. Так що колонії могли утворювати лише ті клітини, в яких синтезується продукт гена А, присутнього у векторі. Найбільш відповідними для проведення такого відбору є клітини-хазяїна, в яких делетований або весь ген А, або його частина. В іншому випадку доводиться виявляти і розмежовувати ревертантів і трансформантів. Крім того, делеційні мутанти виключають ймовірність прояви фенотипу А+ в результаті супресії фенотипу А якимись іншими генами.

Експресія еукаріотичних генів в бактеріальних системах хазяїн-вектор. Ні фенотиповий відбір, ні імунологічний скринінг зазвичай не застосовні при виділенні клітин *E.coli*, які містять певний рекомбінантний еукаріотичний ген. Виняток становлять деякі гени дріжджів та інших грибів, здатні експресуватися в клітинах *E.coli*. Однак більшість генів еукаріот не можуть належним чином експресуватися в клітинах *E.coli*, оскільки вони втратили функціональні промотори і містять некодуючі ділянки у складі кодуючих послідовностей. Інша справа, якщо рекомбінанти містять кДНК-копії еукаріотичних мРНК, оскільки некодуючі ділянки вищеплюються під час дозрівання мРНК в еукаріотичних клітинах. Клітини *E.coli* не здатні здійснювати такий сплайсинг. У результаті кДНК транскрибуються в правильні поліпептиди в *E.coli*. Для того щоб клітини *E.coli* змогли забезпечити транскрипцію і трансляцію клонованої еукаріотичної кДНК, у відповідні сайти вектора зазвичай включають *E. coli*-промотор і сигнали трансляції. Подібним же чином, для того щоб кДНК еукаріот могла експресуватися в еукаріотичних клітинах, вектор необхідно забезпечити відповідними сигналами регуляції транскрипції. Оскільки в нормі геномні регуляторні сигнали зазвичай знаходяться поза транскрипційної частини гена, в 5'- або 3' - фланкуючий ділянці, вони відсутні в мРНК або кДНК.

Інші методи фенотипового скринінгу в еукаріотичних клітинах. Фенотиповий скринінг рідко застосовується при роботі з диплоїдними еукаріотичними клітинами, оскільки для цього необхідна лінія клітин, у яких пошкоджені обидва алелі необхідного нам гена. Ідентифікувати трансформовані клітини можна за допомогою котрансформації, застосовуючи селективний маркер і відповідні мутантні клітини або домінуючий маркер і клітини, які пригнічуються антибіотиком. Однак при цьому неможливо розрізнити потрібний котрансформант і супутні контрансформовані колонії, які містять різні рекомбінантні молекули ДНК. Тому зазвичай скринінг ґрунтується на використанні специфічних

властивостей. Як приклад можна навести морфологічні зміни, які спостерігаються при перетворенні нормальних клітин у пухлинні, що спостерігається при застосуванні векторів на основі папіломавірусів великої рогатої худоби і ретровірусів. Клітини, трансформовані до онкогенного фенотипу, утворюють характерну колонію, або фокус, на відміну від звичайних клітин, які утворюють моношар. Цей метод використовували, наприклад, при відборі рекомбінантів, які містять клітинні онкогени з геномної ДНК тварин.

Інший метод скринінгу застосовують при клонуванні клітин тварин, в яких експресується рекомбінантний ген, що кодує поліпептид. При цьому використовують клітини хазяїна, які в нормі не утворюють поліпептид, і тестують середовище в якому знаходяться трансформовані клітини, на присутність в ньому даного поліпептиду. Якщо продуктом є гормон, то його присутність у середовищі можна виявити за допомогою будь-якого зручного високочутливого біологічного методу. Таким же способом були клоновані гени, що кодують фактори росту, які стимулюють проліферацію специфічних клітин-мішеней. Якщо активність поліпептиду важко виміряти, то використовують специфічні до нього антитіла. Цей метод непридатний для одночасного скринінгу на велику популяцію клонованих клітин, які містять різні рекомбінантні молекули, оскільки для цього довелося б проводити занадто багато окремих тестів. Замість цього суміш трансформованих клітин поділяють на зручне число окремих груп і тестують ці групи. Групу, що дає позитивну відповідь, знову поділяють на підгрупи, знову виділяють позитивну підгрупу, поділяють її, тестують і так далі до тих пір, поки не буде ідентифікований один позитивний клон.

Імунологічний скринінг. Для скринінгу рекомбінантної популяції експресії певного гену використовують більш загальний метод, в основі якого лежить імунологічний підхід. Білок, що синтезується в цьому випадку не повинен бути функціонально активним; необхідні лише специфічні антитіла до нього і клітини хазяїна не синтезують відповідний антиген. Антитіла взаємодіють з білковими молекулами одного клону. Їх виявляють по акумуляції радіоактивності, джерелом якої служать або мічені антитіла, або специфічні мічені реагенти, що впізнають імуноглобуліни. Було розроблено кілька модифікацій техніки скринінгу за участю антитіл стосовно E.coli - системам хазяїн-вектор. Всі вони подібні між собою, хоча застосовані прийоми залежать, наприклад, від того, якого роду клони – бактеріальні або фагові – будуть тестуватися.

В одній з модифікацій цього методу антитіла рівномірно розподіляють по поверхні твердого носія, наприклад пластикового або паперового диска, і потім притискають його до агаровому шару, який містить спеціалізовані колонії або фагові бляшки. Якщо специфічний антиген синтезується яким-небудь клоном, він буде зв'язуватися з антитілом на диску. Антиген можна локалізувати, обробивши знятий з агару диск іншими радіоактивно міченими антитілами, промивши диск і отримавши радіоавтограф. Ця процедура залежить від здатності двох антитіл зв'язуватися з різними антигенними детермінантами на одному і тому ж поліпептиді. Як і при скринінгу шляхом відпалювання з ДНК - або РНК-зондами, позитивний клон дає чітку темну пляму на рентгенівській плівці.

Якщо нас цікавить ген, що кодує поліпептид, розташований на поверхні тваринної клітини, то за допомогою високоспецифічних методів можна провести імунологічний скринінг та відбір трансформованих клітин. Поверхневі білки можуть взаємодіяти зі специфічними антитілами, а якщо ці антитіла зв'язуються з будь-якою флуоресцентною міткою, то клітини, що синтезують цей білок, будуть відрізнятися від інших трансформантів за своїми флуоресцентними властивостями. Життєздатні флуоресцентні клітини виявляють серед величезного числа нефлуоресцентних клітин за допомогою спеціального приладу.

Далі життєздатні клітини розмножують і отримують популяцію клонованих клітин. Деякі поверхневі білки є рецепторами, з якими зв'язуються специфічні ліганди. Якщо

досліджуваний ген кодує такий рецептор, то, використовуючи флуоресцюючий ліганд, можна відокремити трансформовані клітини за допомогою приладу FACS.

ДНК-бібліотеки геномів і кДНК бібліотеки. Підібравши відповідні умови рестрикції і клонування можна добитися того, що в наборі клонованих фрагментів будуть знаходитися практично всі гени даного генома. Такі колекції клонів, отримані від конкретного генома, називають «бібліотеками» геномів. Бібліотека генома готується з тотальної ДНК клітинної лінії або тканини.

На відміну від бібліотеки генома, бібліотека кДНК готується з мРНК тканини. Бібліотека кДНК, яка складається зі всіх генів даного генома готується у декілька етапів. Спочатку виділяють тотальну мРНК тканини. Потім за допомогою зворотної транскриптази і ДНК-полімерази проводять зворотну транскрипцію мРНК в дволанцюгову ДНК (кДНК).

Для цілеспрямованого синтезу на матричних РНК комплементарних молекул ДНК (кДНК) в генетичній інженерії широко використовується ревертаза. Для підвищення ефективності цієї процедури додатково застосовують і інші ферменти (рис. 12.11).

Якщо включити отриману таким чином кДНК у, генетичні елементи (плазмід), що швидко фіксуються, то в них можна виростити клони кДНК. З використанням різних мРНК у такий спосіб отримують бібліотеки кДНК. Бібліотека кДНК відрізняється від бібліотеки ДНК генома, яку отримують після обробки ДНК рестриктазами.

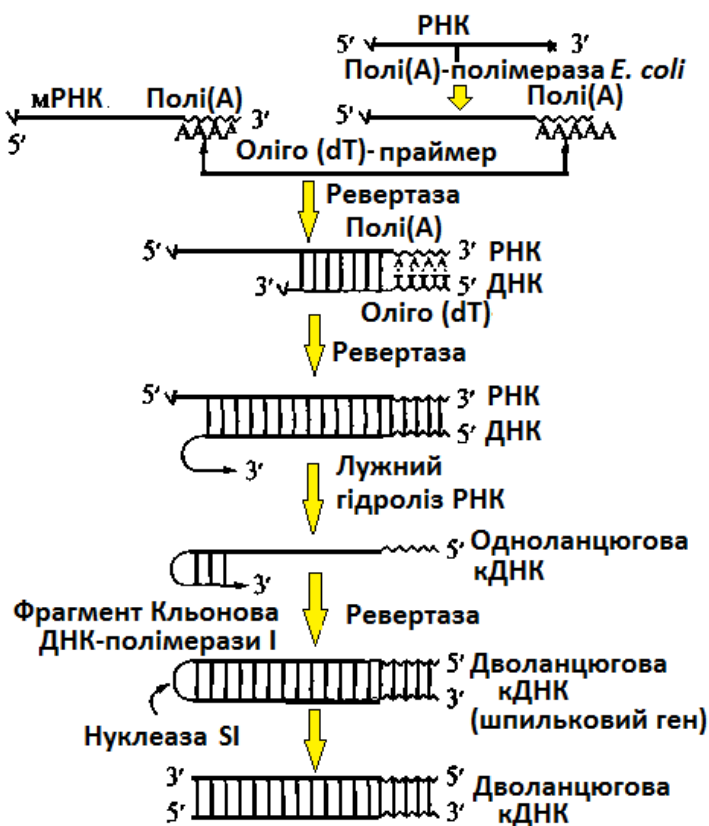


Рис. 12.11. Схема отримання кДНК з використанням ревертази вірусу пташиного мієлобластозу і трьох додаткових ферментів: полі(А)-полімерази, фрагмента Кленова ДНК-полімерази I і нуклеази S1 (руйнує характерну шпильку в молекулі кДНК, яку утворює ревертаза).

У бібліотеці ДНК генома знаходяться мільйони клонів-колоній, в яких обов'язково присутні дискретні гени, оскільки рестриктази розрізають ДНК усередині генів. Зворотна транскриптаза дає можливість отримати прогресивнішу бібліотеку генів, що транскрибуються, в якій неважко ідентифікувати клон, якщо ген кодує певний білок, по якому (біохімічними методами) і ідентифікують клон. ДНК в

таких бібліотеках не містить інтронів, і по ній легко визначити амінокислотну послідовність білка.

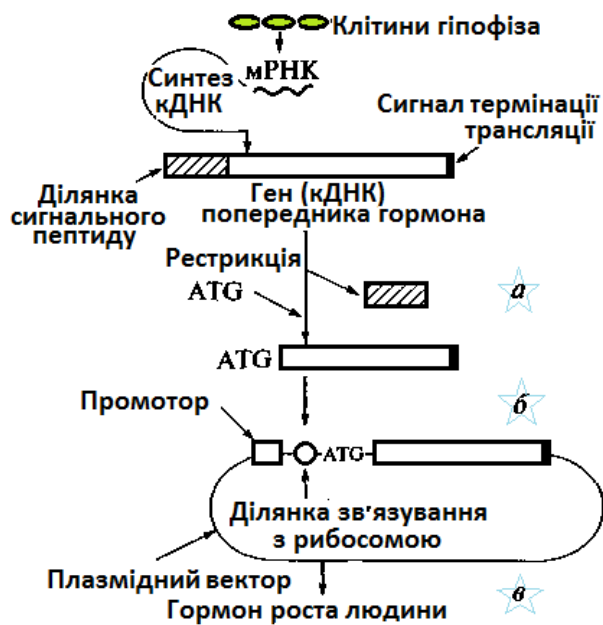
Вказані "бібліотеки" використовуються для вивчення нуклеотидної послідовності, локалізації генів, їх структури і патології.

Досягнення і перспективи генної інженерії.

Генна інженерія не лише відкрила можливості для конструювання генів, але і заклала основу нових альтернативних технологій одержання біологічно активних сполук (гормонів, релізинг-чинників, регуляторних пептидів, інтерферонів та ін.). Багато які з цих сполук містяться в біологічних об'єктах в не великих кількостях, і їх препаративне виділення традиційними біохімічними методами є занадто трудомістким, а іноді і неможливим. Методи генної інженерії дозволяють здолати ці труднощі шляхом ампліфікації відповідних

генів, їх клонування і експресії в клітинах бактерій, дріжджів і клітинах багатоклітинних організмів, що швидко реплікуються, і таким чином отримати значну кількість фізіологічно активних молекул, придатних для практичного використання як медичних препаратів, харчових продуктів і так далі. Прикладами практичного використання методів генної інженерії є отримання біологічно активних сполук, пептидних гормонів і інтерферонів. Одним з перших методами генної інженерії був отриманий гормон росту людини - соматотропний гормон (HGH). У організмі він синтезується клітинами гіпофіза. Цей гормон складається з 121 амінокислотного залишку, його мол. маса – 20 кДа.

Схема отримання HGH з використанням генно-інженерних методів приведена на рис. 12.12. Відправною точкою для отримання гормону росту було виділення відповідної мРНК з клітин гіпофіза. Далі здійснювали синтез кДНК, з якої надалі відщеплювали ділянку, яка кодувала сигнальний пептид, а замість неї вбудовували триплет ATG, який кодує метіонін і є



сигналом початку трансляції в білоксинтезуючій системі клітини.

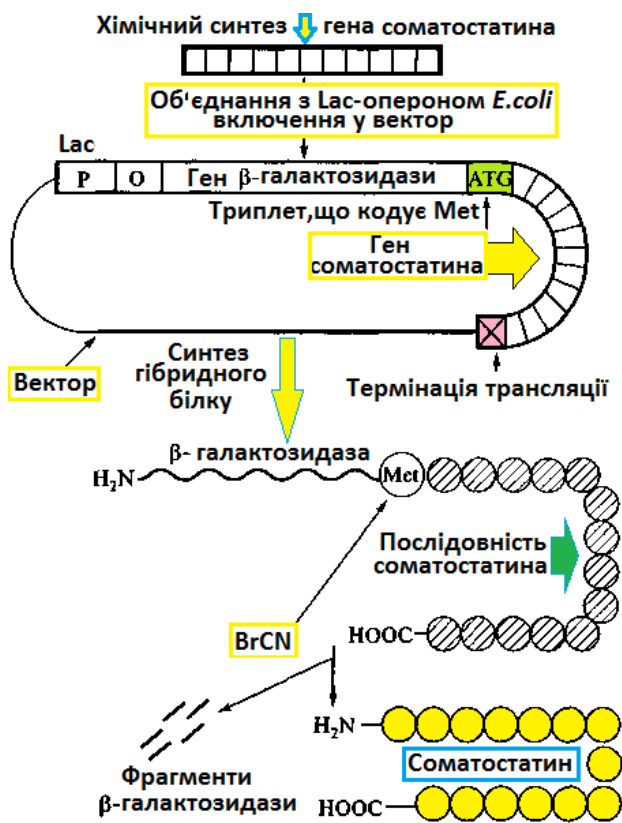
Рис. 12.12. Схема отримання гормону росту людини: а - вищеплення рестриктазою ділянки, що кодує сигнальний пептид, і приєднання триплету ATG, що кодує метіонін; б - приєднання до гена промотора і ділянки, необхідної для зв'язування мРНК з рибосомою *E.coli*, включення у вектор; в - експресія гена в клітинах бактерії.

До отриманого таким чином гена приєднували необхідні для його ефективної експресії регуляторні елементи (промотор і лідерну послідовність, яка служить для прикріплення мРНК до рибосоми) і потім включали усю цю конструкцію у відповідну плазмиду, отримуючи таким чином вектор молекулярного клонування. Подальша

трансформація і клонування цього вектора в бактеріальних клітинах, де здійснюється інтенсивна реплікація, транскрипція і трансляція, дозволяє отримати необхідну кількість гормону, який потім використовують не лише в медичних цілях, але і в практичному тваринництві, підвищуючи з його допомогою інтенсивність росту тварин.

Отримання соматостатина є цікавим прикладом цілеспрямованого конструювання білків, яке виконується за допомогою методів генної інженерії. Соматостатин являє собою короткий пептид (містить 14 амінокислотних залишків), який синтезується в шлунково-кишковому тракті і гальмує вивільнення з гіпофіза гормону росту. Отримати соматостатин у клітинах бактерій в значних кількостях спочатку не вдавалося, оскільки він швидко руйнувався протеолітичними ферментами. Щоб «обійти» внутрішньоклітинні бактеріальні протеази, довелося сконструювати химерний білок - штучний попередник соматостатина. У цьому білку як N-кінцевою ділянкою використовували білок бактерії, який легко синтезувався, а до нього приєднали сам соматостатин. Усе це було зроблено на рівні генетичного матеріалу (ДНК), який потім клонували у відповідному векторі (рис. 12.13). Для синтезу соматостатина його ген був отриманий методом хімічного синтезу, а потім поєднаний з бактеріальним геном β-галактозидази, до якого додатково приєднали фрагмент бактеріального оперону, який містив промотор і оператор. Триплет ATG використали як з'єднувальний елемент в цій конструкції.

Трансформований у складі плазмідного вектора в бактерійні клітини, цей ген служив джерелом для синтезу в них химерного білку, який містить послідовності β-галактозидази і



соматостатина, сполучені через залишок метіоніну.

Рис. 12.13. Схема отримання соматостатину в бактерійні клітини за допомогою плазмідного вектору. Пояснення див. в тексті.

Після виділення з клітин бактерії цей білок обробляли бромціаном, внаслідок чого відбувалося його розщеплення по залишках метіоніну і таким чином, досягалося виділення з його складу фізіологічно активного пептиду – соматостатина. Успіх роботи забезпечувався попереднім аналізом первинної структури соматостатина, у складі якого відсутні залишки метіоніну.

Особливе значення для практичної медицини мав генно-інженерний синтез інсуліну, від нестачі якого, повсюдно страждає величезна кількість людей (діабет). Інсулін синтезується в підшлунковій залозі у формі одноланцюгового білка-попередника -

препроінсуліна. Препроінсулін містить сигнальний пептид, амінокислотні послідовності А і В, відповідні поліпептидним ланцюгам зрілого гормону, а також сполучний пептид С. В клітинах підшлункової залози після синтезу білка-попередника сигнальний пептид відщеплюється і утворюється проінсулін - молекула, в якій зберігається з'єднувальний пептид С, необхідний для правильної орієнтації А- і В-ланцюгів гормону. Після утворення двох дисульфідних містків між ланцюгами А і В віддаляється пептид С і утворюється зріла молекула інсуліну, така, що має гормональні властивості. Інсулін можна виділяти з тварин (свиней і телят), але деякі люди мають алергію до препаратів, отриманих з тварин, та і самі можливості виділення і очищення гормону не безмежні.

У 1978 р. в США шляхом хімічної синтезу були отримані гени, що кодують амінокислотні послідовності зрілого гормону, і далі здійснено їх клонування в клітинах *E. coli*. Проте вихід біологічно активного гормону був незначний, ймовірно, у зв'язку з відсутністю С-пептиду, без якої погано проходило утворення - S - S -містків між А- і В-ланцюгами інсуліну. У 1980 р. з тканин людини була виділена мРНК інсуліну, а в 1982 р. в Канаді була завершена робота по повному хіміко-ферментативному синтезу гена проінсуліна генно-інженерними методами. Схема цієї роботи практично аналогічна тій, що застосовується для синтезу соматостатина, і ми на ній не зупинятимемося.

У Росії синтез гена проінсуліна був завершений в 1983 р. в Інституті біоорганічної хімії ім. М.М.Шемакіна під керівництвом академіка Ю.А.Овчинникова. Лікарські препарати інсуліну людини, отримані методами генетичної інженерії, уперше поступили в продаж в Англії (компанія Eli Lilly). Інсулін став першим препаратом у лікарській практиці, створеним за допомогою технології рекомбінантної ДНК. Бурхливий розвиток цих робіт привів до виникнення генно-інженерної ендокринології, внаслідок чого було здійснено клонування генів рилізінг-факторів гормону росту, кортикотропіну і соматокриніна. Введення цих генів у генетичний апарат мишей дозволяє регулювати рост тварин. Таким чином, відкриваються перспективи генотерапії – виправлення спадкових дефектів шляхом введення в геном повноцінних генів.

Великі успіхи досягнуті в питаннях отримання методами генної інженерії біологічно активних пептидів. Створені штами *E.coli*, які синтезують у складі химерних білків нейропептид лейкенкефалін, а також пептидні гормони брадикінін і ангіотензин.

Значне місце в практичному використанні методів генної інженерії займає синтез інтерферонів. У 1957 р. Ісаакс і Ліндерманн виявили, що клітини тварин, які піддавалися дії вірусів, виділяють в середовище чинник, який здатний надавати новим (не зараженим) клітинам стійкість до вірусної інфекції. Цей чинник, який перешкоджає розмноженню вірусів в клітині, був названий інтерфероном. Пізніше з'ясували, що існують три групи інтерферонів: α -інтерферони (утворюються при дії вірусів на лейкоцити), β -інтерферони (синтезуються при дії вірусів на фібробласти) і, γ -інтерферони, або так звані імунні інтерферони, які продукуються Т-лімфоцитами у відповідь на дію бактерійних і вірусних антигенів. Інтерферони - це невеликі за розміром білки, що складаються з 146-166 амінокислотних залишків. α -інтерферони є протеїнами, які не містять простетичних (небілкових, неамінокислотних) груп, а β - і γ -інтерферони – глікопротеїнами.

Інтерферони мають високу цінність для лікування цілого ряду захворювань: вірусного і хронічного гепатитів, розсіяного склерозу, мієломи, остеосаркоми. Відмічається позитивний ефект застосування інтерферонів для лікування раку легенів, мозку і гортані. В той же час біологічні дослідження показали, що інтерферони видоспецифічні, тобто для лікування людей потрібні інтерферони, отримані з клітин людини. Проте з 1 л донорської крові можна отримати всього 1 мкг інтерферону (тобто 1 дозу для ін'єкції). Розв'язати проблему виявилось можливим тільки з використанням сучасних біотехнологічних підходів.

Клонування інтерферонів людини - завдання дуже складне. Це пов'язано з тим, що в суміші мРНК, які кодують різні білки, доля мРНК, що кодує інтерферони і є необхідною для отримання кДНК, не перевищує 0,1%. Тому складність виділення достатніх кількостей мРНК - перша (але не єдина) складність при виробництві інтерферонів. Проте з часом вдалося клонувати гени усіх трьох типів інтерферонів, що полегшило паралельно завдання вивчення структури цих білків.

Первинні структури інтерферонів були спочатку визначені на основі аналізу нуклеотидних послідовностей їх генів, а потім підтверджені прямим секвенуванням амінокислотних послідовностей. Потім у ряді країн, у тому числі і у нас, були здійснені роботи по отриманню α -інтерферона людини в клітинах *E.coli*.

Фізико-хімічні властивості інтерферону, виділеного з бактерій, виявилися близькі до властивостей інтерферону, виділеного з крові донорів. Далі вдалося отримати такі штами бактерій, з 1 л бактеріальної суспензії можна виділити 5 міліграм інтерферону (тобто в 5 разів більше, ніж з 1 л крові людини). Це дозволило налагодити у ряді країн промислове виробництво інтерферонів з використанням *E.coli*. Гени інтерферонів клонували в клітинах дріжджів і вищих еукаріот, які здатні здійснювати глікозилування цих білків, необхідне для точного відтворення структури β -інтерферонів і γ -інтерферонів.

Японськими дослідниками розроблена цікава система одержання α -інтерферона з крові (гемолімфи) гусениць шовковичного шовкопряда, уражених вірусом ядерного поліедроза. У цій роботі ген білку вірусу (поліедрина) клонували у складі плазмід, а потім генно-інженерними методами конструювали рекомбінантну плазмиду, що несе ген інтерферону, який примикає до промотора поліедринового гена.

Цю плазмиду використовували для зараження культури клітин шовковичного шовкопряда. Далі з клітин виділяли вірусні частки, які містять ген інтерферону, і реплікували їх в личинках шовковичного шовкопряда, у яких в міру розвитку вірусної інфекції інтерферон накопичувався в гемолімфі (50 мкг на 1 мл гемолімфи). Нижче приведені деякі білки людини, отримані генно-інженерними методами (Б.Глік, Дж.Пастернак, 2002):

| Білок | Застосування в медицині |
|---|---|
| Адренокортикотропний гормон | Ревматизм |
| α 1 - антитрипсин | Емфізема |
| Гемоглобін | Анемія |
| Гормон росту (соматотропін) | Затримка росту |
| Інсулін | Цукровий діабет |
| Інтерлейкіни | Злоякісне новоутворення, імунні захворювання |
| Інтерферони (α , β , γ) | Вірусні захворювання, злоякісні новоутворення |
| Кальцитонін | Остеомаляція |
| Лімфотоксин | Злоякісне новоутворення |
| Релаксин | Пологи |
| Рецептор інтерлейкіна- 1 | Астма, ревматоїдний артрит |
| Соматоліберин | Затримка росту |
| Соматомедин 3 | Затримка росту |
| Сироватковий альбумін | Дефіцит білків плазми |
| Тиреотропний гормон | Рак щитовидної залози |
| Тканинний активатор плазміногена | Тромбоутворення |
| Тромбоцитарний чинник росту | Атеросклероз |
| Урогастрон | Виразки |
| Урокіназа | Тромбоутворення |
| Чинник, що активує макрофаги | Злоякісне новоутворення |
| Чинник некрозу пухлини | Злоякісне новоутворення |
| Чинник росту нервів | Ушкодження нервової тканини |
| Чинник росту епідермісу | Опіки |
| Чинник VIII | Гемофілія |
| Чинник IX | Гемофілія |
| Чинники росту В-лімфоцитів | Імунні захворювання |
| Хоріонічний гонадотропін | Жіноче безпліддя |
| Ендорфіни і енкефаліни | Біль |
| Еритропоетин | Анемія, захворювання нирок |

Таким чином, розвиток генної інженерії сприяв вирішенню певних проблем – штучному створенню інформаційних біологічних систем, які мають важливі властивості.

Системна РНК-інтерференція.

РНК-інтерференція — феномен пригнічення експресії генів у присутності певних коротких фрагментів РНК. За відкриття і вивчення цього явища Ендрю Файер (Andrew Fire) і Крейг Мелло (Craig Mello) отримали Нобелівську премію по фізіології і медицині в 2006 році.

Системна РНК-інтерференція у «модельної» нематої *C.elegans* (відключення гена майже в усіх клітинах цього черв'яка).

Такий вражаючий ефект досягається за допомогою введення в клітину дволанцюгових молекул РНК (дцРНК), один з ланцюгів в кожній з яких комплементарний ділянці мРНК гена, що «вимикається». Це відкриває можливості для вивчення функцій генів. Раніше для відключення генів доводилося створювати «нокаутних» тварин (н., мишей). Проте створення нокаутів досить складний процес, а назад включити ген у таких організмів вже неможливо. За допомогою РНК-інтерференції відключити ген дуже легко, — так само як і включити, припинивши вводити в організм відповідні дцРНК.

Існує три основні способи введення дцРНК в організм. Найпоширенніший — введення в тварину розчину дцРНК. Користуються також «вимочуванням» нематод в розчині РНК. Проте виявилось, що можна робити все набагато простіше: згодувувати нематодам ці

молекули. Причому зручно те, що це так само працює, якщо нематод годувати бактеріями (*E.coli*), що синтезують ці дцРНК (рис. 12.14).

В принципі те, що молекули РНК з кишечника поширюються практично по усіх тканинах, досить дивно. Відомо, що за потрапляння молекул РНК в клітини кишечника відповідає білковий канал *sid-1*. Проте яким чином РНК поширюються по організму черв'яка, достовірно не відомо, — швидше за все, за участю білку *rsd-8*. Цікаво, що усі відомі білки, які беруть участь в системній РНК-інтерференції у *C.elegans*, є і у людини, проте таку ефективну систему штучного пригнічення активності генів на системному рівні у людини спостерігати не вдається. Використання РНК-інтерференції саме на культурі клітин людини дозволило виявити, що багато генів людини сприяють розвитку вірусу грипу.

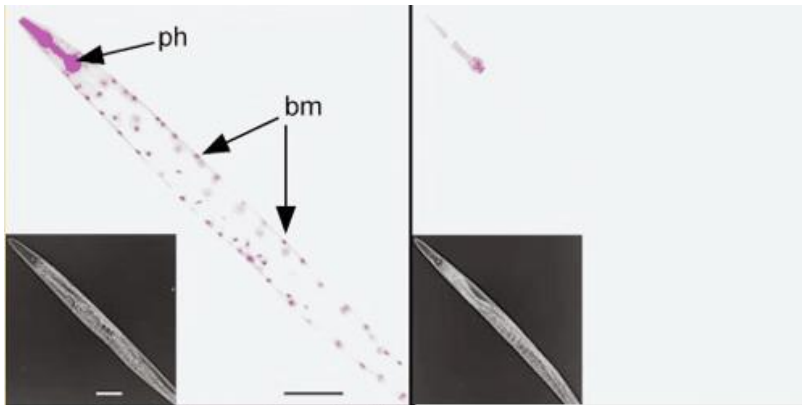


Рис. 12.14. Системна РНК-інтерференція. Черв'як *C.elegans* експресує флуоресцентний (що світиться) білок в клітинах глотки(*ph*) і м'язах стінки тіла(*bm*). Ліворуч — первинний зовнішній вигляд. Справа — при РНК-інтерференції за допомогою «підгодівлі» бактеріями ген інактивується.

В перспективі системна РНК-інтерференція може стати механізмом регуляції активності генів без зміни спадкового матеріалу. Використання системної РНК-інтерференції у людини могло б стати методом боротьби з величезним набором захворювань, від застуди до раку.

Трансгенні організми. Генотерапія

Трансгенні організми. Принцип конструювання трансгенних організмів. Трансгенні бактерії. Головні напрями застосування в народному господарстві і медицині. Рекомбінантні лікарські препарати. Трансгенні рослини. Головні напрями використання трансгенних рослин. Трансгенні тварини як моделі захворювань і біореактори. Проблеми екологічної безпеки.

Генна терапія. Принципи генної терапії. Генотерапія ex vivo і in vivo. Вірусні і невірусні вектори в генотерапії. Перспективи і обмеження генної терапії. Генні вакцини. Генна терапія в онкології.

Трансгенні організми. Принцип конструювання. Трансгенез – штучне перенесення гена (групи генів) з одного організму в іншій і створення умов для його експресії. Досягнення в області генної інженерії (тобто технології маніпулювання з рекомбінантною ДНК) стали основою для розвитку дослідницьких робіт по міжвидовому переміщенню генів, з метою отримання організмів з новими ознаками і властивостями, зміна генетичного матеріалу складних багатоклітинних організмів. Організми сконструйовані такими методами називають трансгенними.

Процедура отримання трансгенних організмів включає в себе кілька основних етапів:

1) Виділення та ідентифікація окремих генів (фрагментів ДНК або РНК), які збираються перенести іншим організмам. Для цього з організмів, що володіють такими генами, за допомогою спеціальних хімічних методів виділяють нуклеїнові кислоти. Їх розрізають на окремі фрагменти, використовуючи набори ферментів-рестриктаз. Найбільше значення мають рестриктази, здатні розрізати нуклеїнові кислоти з утворенням, так званих липких (комплементарних) кінців. Утворені фрагменти мають короткі одноланцюгові кінці,

що складаються з декількох нуклеотидів. Якщо об'єднати в одній пробірці фрагменти ДНК будь-якого походження (н., фрагменти плазмід бактерій і фрагменти тваринної або рослинної ДНК), отримані за допомогою однієї і тієї ж рестриктази, яка утворює липкі кінці, і додати лігази, то ці фрагменти з'єднуються між собою. У результаті вийде химерна (рекомбінантна) ДНК, яка може містити фрагменти ДНК, виділені з різних організмів або синтезованих штучно. Описана технологія дозволяє створювати на основі плазмід або інших типів векторів складні генетичні конструкції для перенесення в клітини інших організмів.

2) Клонування (розмноження) створеного гена. Щоб розмножити створені в пробірці нечисленні химерні молекули ДНК, вектори з вбудованими в них фрагментами необхідно перенести в реципієнтні клітини. Плазмідні вектори вводяться в реципієнтні клітини методом генетичної трансформації. Трансформація застосовується для клонування векторних ДНК в клітинах кишкової палички (*E. coli*) і заснована на спільній інкубації «компетентних» клітин бактерій (клітин здатних до трансформації) і рекомбінантної ДНК. У результаті трансформації ДНК «поглинається» бактеріальними клітинами і автономно розмножується в їх цитоплазмі.

На селективному середовищі проводять відбір трансформованих бактеріальних клітин, що несуть селективний маркер, який вже був на векторі або повинен з'явитися в процесі утворення рекомбінантної молекули. Наприклад, вектор містить ген стійкості до антибіотика ампіциліну, то в селективне середовище, додають цей антибіотик, і всі клітини, що вижили будуть містити даний вектор.

Для того, щоб з'ясувати, чи несуть трансформовані клітини рекомбіновану ДНК, з клітин виділяють векторну плазмиду і піддають її електрофорезу. За допомогою цієї простої техніки можна в агарозному гелі розділити, ідентифікувати і очистити фрагменти векторної ДНК різної молекулярної маси.

3) Перенесення гена (або трансгена конструкція) в середину клітини і вбудовування його в ДНК реципієнтного організму. Основний спосіб перенесення генів (генних конструкцій) з клітин організму-донора в клітини організму-реципієнта – трансформація. Трансформація включає в себе кілька основних етапів і вимагає дотримання низки умов: наявності ДНК, здатної до трансформації; «компетентних» клітин; інтеграції донорської (трансформуючої) ДНК в ДНК реципієнта та експресії перенесених генів. Існують різні методи трансформації: шляхом гібридизації соматичних клітин; інкубації реципієнтних клітин з чужорідним генетичним матеріалом; мікроін'єкції генетичного матеріалу в ядра клітин тварин та ін. Застосування цих методів залежить від біологічних особливостей реципієнта.

Наприклад, для трансформації клітин рослин використовують два основні методи:

1) Метод біологічної балістики. На найдрібніші частинки металу (золота або вольфраму) напильюється ДНК, що містить «цільовий» ген. Потім ці частинки з напиленими ДНК поміщають в генну «гармату». У результаті «пострілу» вони з величезною швидкістю «бомбардують» клітини рослин, проникаючи в їх цитоплазму і ядра. Деякі з цих клітин вбудовують «цільовий» ген у свою ДНК. З кожної такої клітини можуть бути створені нові трансгенні рослини.

2) Трансформація рослини за допомогою, так званої, Ті-плазмиди, що несе «цільовий» ген, який доставляється в клітини за допомогою ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. Ті-плазміда – це кільцева молекула ДНК, яка міститься в клітинах *Agrobacterium tumefaciens*, вона викликає утворення пухлин у рослин при їх зараженні цією бактерією. При зараженні бактеріями рослин, невеликий фрагмент Ті-плазмиди вбудовується в геном рослинних клітин, викликає порушення гормонального балансу і перехід до неконтрольованого поділу і росту, що і призводить до утворення пухлини.

«Цільовий» ген, здатний змінювати ту чи іншу властивість рослини, вбудовується генно-інженерними методами в Ті-плазмиду, яка потім переноситься в агробактерії. У процесі спільного культивування агробактерії та культури клітин рослини-хазяїна Ті-плазміда

потрапляє в клітини рослин, а «цільовий» ген з додатковими фрагментами ДНК вбудовується в рослинний геном. Кожна така клітина може дати цілу трансгенну рослину, яка буде містити генетичну інформацію з двох або кількох різних організмів. Цей метод застосовується для трансформації дводольних рослин.

Однак цей метод «працює» не на всіх рослинах: агробактерії, н., не заражають такі важливі сільськогосподарські рослини, як рис, пшениця, кукурудза. Тому розроблені інші способи вбудовування ДНК. Н., ферментами розчиняють товсту клітинну оболонку рослинної клітини, що заважає прямому проникненню ДНК, і поміщають такі очищені клітини в розчин, який містить ДНК і хімічну речовину, яка сприяє проникненню у клітину ДНК (найчастіше застосовується поліетиленгліколь). Іноді в мембрані клітин роблять мікроотвори короткими імпульсами високої напруги, а через отвори в клітину можуть проникнути ділянки ДНК, також застосовують контрольоване введення у клітину ДНК мікрошприцом під контролем мікроскопа.

При створенні трансгенних тварин використовують методи: введення генів в яйцеклітини або в стовбурові клітини; введення генів за допомогою вірусних векторів; трансфекція ДНК, що стимулюється кальцієм або електричним струмом; клонування за допомогою пересадки ядер; використання ліпосом і рецепторопосередковане перенесення ДНК; перенесення генів за допомогою штучних дріжджових хромосом та інші (рис. 13.1).

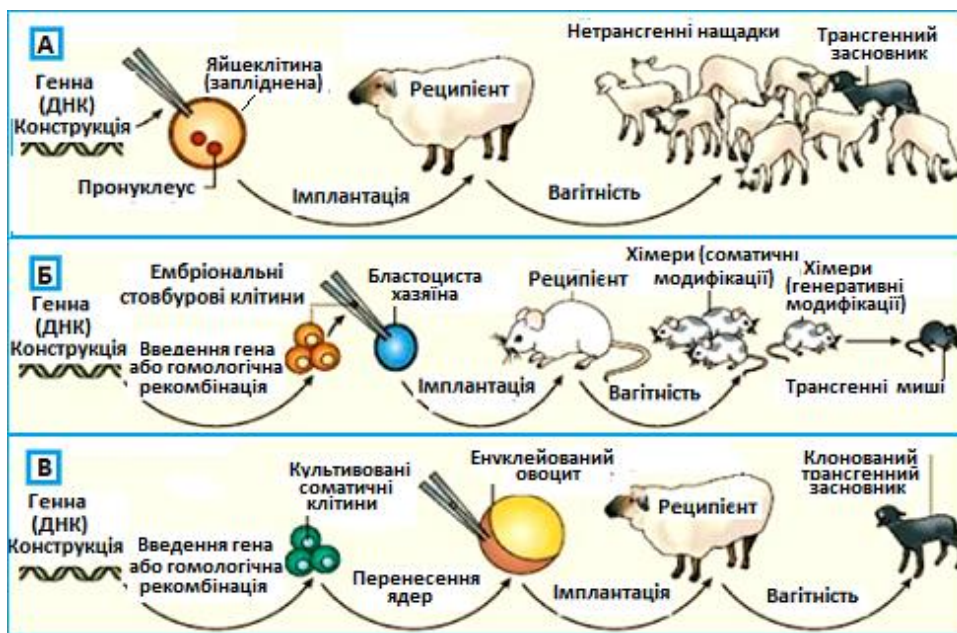


Рис. 13.1. Шляхи отримання трансгенних тварин: А – проядерна ін'єкція; Б – з використанням ембріональних стовбурових клітин; В – перенесення ядер.

Найчастіше для створення трансгенних тварин використовують метод мікроін'єкції молекул ДНК у пронуклеус заплідненої яйцеклітини. В 1980 році Дж.Гордон і

співавтори ін'єкціювали у пронуклеус мишачих зигот рекомбінантну ДНК, що складалася із фрагментів ДНК вірусу простого герпесу, вірусу SV40 і плазміди рBR322. У деяких мишей, які розвинулися з таких зигот знайшли рекомбінантну послідовність ДНК. Цей експеримент довів, що «чужі» гени можуть бути включені в мишачий геном шляхом прямої ін'єкції ДНК у пронуклеус ранніх ембріонів.

Подальші дослідження різними групами дослідників показали, що рекомбінантні молекули різних типів можуть бути вбудовані в ембріони миші на одноклітинній стадії.

У 1985 році методом мікроін'єкції ДНК у пронуклеуси зигот отримані перші транс-генні тварини інших видів ссавців: кролів, свиней і вівців.

Дана технологія включає декілька етапів:

1) **Отримання гена і його підготовка для мікроін'єкції** (клонування ДНК у клітинах бактерій з використанням векторів). Вірогідність інтеграції залежить від конформації ДНК – лінійні фрагменти ДНК характеризуються більшою здатністю до інтеграції (Брінстер, 1985).

2) **Отримання зигот від тварин-донорів** (стимуляцію гормонами гіперовуляції у

самок-донорів, схрещування, отримання запліднених яйцеклітин).

3) **Мікроін'єкція ДНК у пронуклеус заплідненої яйцеклітини** (чужорідну ДНК вводять перед злиттям чоловічого і жіночого пронуклеусів). У ссавців після проникнення сперматозоїда в яйцеклітину чоловічий пронуклеус і ядро яйцеклітини знаходяться роздільно. Чоловічий пронуклеус зазвичай значно більше жіночого, його легше відокремити і ввести в нього чужорідну ДНК.

4) **Трансплантація зигот після ін'єкції ДНК реципієнта.** Після введення ДНК зиготи імплантують мікрохірургічним шляхом у «сурогатну» матір, в якій викликають помилкову вагітність схрещуванням з вазектомованим самцем. Ембріони розвиваються тільки з уведених яйцеклітин.

5) **Скринінг трансгенного потомства.** Для ідентифікації трансгенних тварин виділяють ДНК і тестують її на наявність трансгена за допомогою методів Саузерна та ПЛР. Для виявлення трансгена у клітинах зародкової лінії тварини, трансгенну мишу схрещують з іншою мишею. Схрещуванням потомків отримують гомозиготні трансгенні лінії.

Описаний метод, разом із значними перевагами при отриманні трансгенних мишей, має низку недоліків: складність виконання операцій і трудоємкість, незначну частоту отримання трансгенних тварин (1-5%) та інші.

Інший підхід до перенесення генів у зародки заснований на використанні ембріональних стовбурових клітин (клітин ранніх зародків). У 1981 році Еванс і Кауфман розробили метод виділення цих клітин із внутрішньоклітинної маси бластоцисти миші і спосіб вирощування їх *in vitro*. У 1986 році Робертсон встановив, що клітини, виділені з ембріонів на стадії бластоцисти, після ін'єкції в порожнину бластоцисти іншого ембріона, беруть участь у формуванні всіх тканин плоду. Такі клітини називаються тотипотентними ембріональними стовбуровими клітинами (ES). ES можуть трансформуватися в будь-яку клітину організму і давати початок дорослому організму.

ES-клітини в культурі легко модифікуються і в них можна вбудувати функціональний трансген, а потім використовувати для отримання трансгенних тварин. Це виключає випадкове вбудовування ДНК, що можливе при мікроін'єкціях і використанні ретровірусних векторних систем, яке може привести до розвитку химерних тварин – мозаїків, що мають клітини із нормальним і зміненним генотипом.

Включення генів в геном ES-клітин *in vitro* проводять різними методами: за допомогою техніки кальцій-фосфатної преципітації, мікроін'єкції ДНК, ретровірусними векторами, електропорацією. При *трансфекції* ES-клітин у культурі вектором, призначеним для інтеграції в специфічний сайт хромосоми, ДНК може вбудовуватись випадково, в інших клітинах - в потрібний сайт, у більшості ES-клітин інтеграції не відбувається. Для збільшення ймовірності одержання потрібних клітин використовують позитивно-негативну селекцію, яка полягає в позитивній селекції клітин, які несуть векторну ДНК вбудовану в потрібний сайт, і негативну селекцію клітин із векторною ДНК, що інтегрувалася у випадковий сайт.

Сайт-мішень для інтеграції з вектором вибирають з урахуванням його значення для генома. Він не повинен кодувати важливі білки, щоб інтеграція чужорідної ДНК не вплинула на процеси розвитку або клітинні функції і не порушувалася реалізація інформації з відповідної ділянки генома.

Інший спосіб ідентифікації трансгенних ES-клітин заснований на використанні ПЛР. ДНК-вектор повинен мати дві ділянки, гомологічні сайту-мішені (одну - з боку трансгена, іншу - з боку клонованої бактеріальної або синтетичної послідовності, відсутньої в геномі миші). Скринінг трансфікованих ES-клітин проводять методом ПЛР.

ES-клітини можна культивувати і ввести в ембріон на стадії бластоцисти, а потім імплантувати такі ембріони в матку «сурогатних» матерів. Схрещуванням нащадків з ES-клітин одержують трансгенні лінії, з яких можна отримати гомозиготні за трансгеном

організму.

У специфічній хромосомній сайт ES-клітин можна не тільки вбудувати трансген, що буде визначати нову функцію, але і направлено зруйнувати цей сайт (нокаут гена) інтеграцією з його структурною ділянкою селективного маркерного гена (рис. 13.2).

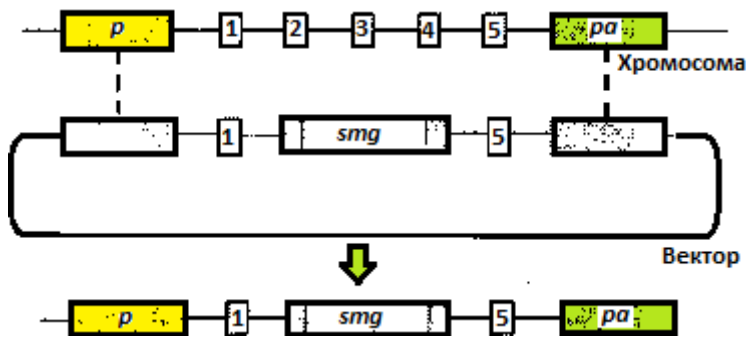


Рис. 13.2. Схема «нокауту» гена за допомогою направленої гомологічної рекомбінації (Воронін Л.Н. та співавт., 2004): вектор несе селективний маркерний ген (*smg*) і фланкувальні його послідовності, гомологічні відповідним ділянкам гена-мішені. Ген-мішень містить п'ять екзонів (1,2,3,4,5). У результаті гомологічної рекомбінації (штрихові лінії) ген-мішень переривається («нокаутується» – 2,-3,-4).

Одне із завдань направленої порушення («нокауту») гена полягає в дослідженні впливу цього процесу на розвиток організму і фізіологічні процеси, що проходять у ньому.

Введення генів в тваринну клітину і їх експресія. Після розчинення захисної оболонки протеолітичними ферментами з яйцеклітиною можна проводити різні маніпуляції і вводити в неї мікрокількості нуклеїнової кислоти (рис. 13.3). Яйцеклітину діаметром близько 0,1 мм поміщають на кінець мікропіпетки, і експериментатор за допомогою скляного капіляра із зовнішнім діаметром не більше декількох десятків мікрон під контролем мікроскопа вводить в яйце декілька піколітрів (10-12 пл.) чужих фрагментів ДНК. Ін'єкція — найбільш відповідальний етап експерименту, оскільки у цей момент можна нанести значні пошкодження яйцю або ембріону. Найкраща інтеграція і експресія генів досягається при ін'єкції в чоловічий пронуклеус, що дозволяє звести до мінімуму пошкодження ооцита, оскільки пронуклеус розташовується поблизу його мембрани. Таким чином, вдається добитися включення генів в геном ембріонів ссавців. Ці гени можуть експресуватися і передаватися нащадкам. Процес інтеграції генів в геном клітин ссавців маловивчений, інтеграція відбувається випадковим чином і не пов'язана з певними ділянками хромосоми.



Рис. 13.3. Мікроінєкція екзогенної ДНК в пронуклеус заплідненої яйцеклітини ссавців під мікроскопом (А) і схема експеримента (Б) (Воронін Л.Н. і співавт., 2004).

Інша складність обумовлена нестабільністю структур клітин, в які вводиться ген (або гени), де він може бути загубленим, видозміненим або неактивним, оскільки активність генів визначається взаємодіями з іншими генами в групі зчеплення. Також для досягнення повної експресії гена необхідно мати в геномі трансгенних організмів регулюючі та активуючі гени.

Виявлення трансгенних клітин (організмів). Процес перенесення і включення в генетичний матеріал клітин рослин чужорідної ДНК відбувається з досить низькою частотою, в кращому випадку трансформованою виявляється 1 клітина на 1000. Тому необхідно відокремити такі клітини від інших створити для їх розподілу і розвитку найбільш сприятливі умови. У цьому випадку разом з «цільовим» геном (н., стійкості до гербіцидів, вірусів і комах-шкідників) вводять і другий, так званий селективний ген. Найчастіше для цього використовують гени стійкості до антибіотиків. Якщо після введення чужорідної ДНК помістити клітини на поживне середовище з антибіотиком, то на ньому можуть рости тільки трансформовані клітини.

Для одержання трансгенних тварин частіше використовується наступний метод: з материнського організму (н., миші) беруть щойно запліднену яйцеклітину, у зону чоловічого пронуклеуса шляхом ін'єкції вводять клоновані гени, потім самкам пересаджують ембріони, які розвивалися в культуральних середовищах. При цьому досягається досить високий рівень імплантації і народження повноцінних мишей.

В процесі трансгенеза відбувається вбудовування нового гена в геном зародка, отримують тварин з новим включеним геном і вони забезпечують передачу його наступному поколінню при статевому розмноженні (введений ген зазвичай вбудовується в одну з гомологічних хромосом, тому трансгенними будуть не всі нащадки).

У перспективі є можливість отримувати так званих трансгенних тварин, до зиготи яких буде внесено декілька генів (політрансгенні тварини), проте виникає небезпека руйнування еволюційно збалансованого генома тварин, які важко поки що прогнозувати.

Трансгенні бактерії. У різних сферах господарської діяльності людини використовуються трансгенні бактерії. Крім того, що бактерії використовуються для клонування генів і виробництва білка, вони реконструюються і для інших цілей.

Для створення трансгенних бактерій використовуються плазмідні вектори, які необхідні для створення рекомбінантних ДНК і подальшої їх трансформації в бактеріальні клітини. Трансформація — це процес введення вільної ДНК в бактеріальну клітину. Найчастіше при трансформації рекомбінантними ДНК використовуються клітини *E.coli*. Щоб забезпечити трансформацію рекомбінантних ДНК в клітини кишкової палички їх обробляють холодним розчином CaCl_2 і витримують при 42°C протягом 1,5 хв. За такої обробки здійснюється локальне порушення клітинної стінки, що й забезпечує проникнення ДНК в клітини. Цей метод дає максимальну частоту трансформації, $\approx 10^{-3}$, тобто на кожну 1000 клітин припадає одна трансформована. Ефективність трансформації, яка визначається як число трансформантів на 1 мкг взятої для дослідження ДНК, складає приблизно 10^7 - 10^9 /мкг ДНК.

Клітини, які здатні поглинати чужорідну ДНК, називають компетентними. Компетентність *E.coli* потрібно індукувати. Деякі інші бактерії мають постійну компетентність щодо чужорідної ДНК. Число компетентних клітин можна підвищувати, якщо використовувати спеціальне поживне середовище чи умови культивування. Зокрема, для підвищення компетентності бактерій, стійких до хімічних індукторів, використовують електропорацію. Збільшення проникності клітинних мембран досягають дією на них електричного струму. Умови електропорації відрізняються для різних видів бактерій. При роботі з *E.coli* клітинну суспензію і ДНК вносять у пробірку з електродом і подають одиничний імпульс струму тривалістю $\sim 4,5$ мс. Після такої обробки ефективність трансформації підвищується до 10^9 для коротких плазмід (приблизно 3 тис.п.н.) і до 10^6 для великих плазмід (приблизно 100 тис.п.н.). Вважають, що як і за хімічною індукцією трансформації, механізм проникнення ДНК шляхом електропорації є результатом утворення тимчасових отворів в клітинній стінці, через які ДНК проникає в клітину.

Рекомбінантні ДНК, побудовані на основі фагових векторів, проникають у клітини шляхом трансфекції. Більш ефективно передача фагових геномів досягається в тому випадку, коли вони попередньо упаковуються у фагові голівки *in vitro*, а потім вводяться в клітину за допомогою стандартної процедури інфікування. Дуже важливою вимогою у цьому випадку є здатність клітин адсорбувати і реплікувати бактеріофаг.

Генну інженерію використовують для отримання як бактеріальних, так і еукаріотичних продуктів. До теперішнього часу не склалося чіткого уявлення про механізм впливу локальної структури ДНК на ефективність транскрипції генів. Не з'ясовані до кінця також причини нестабільності векторів і рекомбінантних ДНК в реципієнтних клітинах. Часто нестабільним у бактеріальних клітинах є і сам чужорідний білок. Встановлено, що склад кодонів еукаріотичних генів не є оптимальним для їх експресії в бактеріальних клітинах. У

зв'язку з цим приймаються заходи з *оптимізації експресії чужорідних генів*, тобто підбираються придатні промотори, оператори, термінатори транскрипції, сайти зв'язування рибосом, фізіологічні та інші умови. Добре налагоджена система експресії приводить до створення суперпродуцентів, в яких вихід чужорідного продукту може досягати 10-40% від сумарного білка. Найважливішими завданнями при культивуванні суперпродуцентів є підтримання їх стабільності і забезпечення секреції синтезованих ними продуктів.

Експресія генів є складним багатоетапним процесом, який залежить від багатьох факторів, що впливають на нього на рівні ДНК, мРНК або білка.

На рівні ДНК ефективність експресії залежить від сили промотору, наявності термінатора транскрипції, відсутності внутрішньогенних термінаторів транскрипції, кількості копій гена, суперспіралізації рекомбінантної ДНК, від розташування чужорідного гена відносно напрямку руху реплікативної вилки.

На рівні РНК ефективність експресії чужорідного гена залежить від структури сайта-зв'язування рибосом, стабільності транскрипта, наявності в мРНК оптимальних кодонів.

На рівні білка ефективність експресії залежить від стабільності поліпептида, його внутрішньоклітинної агрегації, можливості правильної модифікації чужорідного білка, включаючи його процесінг та здатність до секреції.

Головні напрями застосування в народному господарстві і медицині. Генетично модифіковані мікроорганізми використовуються здебільшого як біореактори, що продукують білки для потреб медицини. В основному це невеликі білки, що не піддаються посттрансляційним модифікаціям. Одним із перших промислових застосувань генетичної інженерії було отримання шляхом експресії у клітинах *E.coli* гормону росту людини - соматотропіну. В організмі він секретується передньою часткою гіпофіза, а його дефіцит є причиною захворювання – гіпофізарної карликовості. Це короткий пептид (14 амінокислотних залишків), який синтезується у шлунково-кишковому тракті й гальмує вивільнення з гіпофізу гормону росту. В клініці застосовували гормон росту людини, який отримували з гіпофіза трупів. Після деяких смертельних випадків у 70-х роках минулого століття використання екстрактів гіпофіза померлих людей для лікування карликовості заборонено (препарат був забруднений інфекційним білком-пріоном, який викликав хворобу Крейтцфельда-Якоба).

У 1978 році вперше Гедделем з колегами фірми «Генентек» отримали соматотропін за допомогою генної інженерії. Отримати соматотропін у клітинах бактерій було складним завданням, оскільки він швидко руйнувався протеолітичними ферментами. Щоб «обійти» бактеріальні протеази, було сконструйовано химерний білок-попередник. У його складі в N-кінцеву ділянку входив білок бактерії, до якого приєднали соматотропін: звичайно, на початку була зроблена химерна ДНК, в який зв'язувальним елементом між генами використали триплет ATG (кодує метіонін). Після виділення з клітин бактерій химерний білок розщепляли за метіоніном, і одержували фізіологічно активний поліпептид.

Рекомбінантну ДНК одержували таким чином: спочатку клонували дволанцюгову ДНК-копію (одержану з матриці іРНК) і розщеплюванням рестрикуючими ендонуклеазами отримали послідовність, яка кодувала амінокислотну послідовність гормону починаючи з 24 амінокислоти. Потім клонували синтетичну ділянку ДНК, що кодувала від 1-ї до 23-ї амінокислоти гормона. Два фрагменти об'єднали разом і «підстроїли» до пари Іас-промоторів і ділянки зв'язування рибосом. Синтезований у бактеріях гормон мав потрібну молекулярну масу і не був пов'язаний з бактеріальним білком. Синтетичний гормон в порівнянні з природним містив на N-кінці поліпептидного ланцюга додатковий залишок метіоніну, але дослідженнями було показано, що такий соматотропін із додатковим залишком метіоніну має таку ж саму біологічну активність, як нативний гормон.

У 1982 році гормон росту людини був отриманий з клітин кишкової палички і з

культури тваринних клітин в інституті Луї Пастера в Парижі і пізніше – в Інституті молекулярної біології АН СРСР. Налагоджено його промислове виробництво. Використовуючи методи створення рекомбінантних ДНК, можна синтезувати й інші чинники росту і диференціювання тканин, отримуючи необхідні гени (ДНК) за одержаними мРНК.

Шляхом експресії генів людини в *E.coli* отримують також інтерферони: α -, β - та γ -інтерферони - антивірусні білки, які синтезуються імунокомпетентними клітинами. Проте недоліком використання бактеріальних клітин для отримання β - і γ -інтерферонів (вони - глікопротеїди) є відсутність у бактеріальних системах посттрансляційної модифікації білків. Роль глікозилування β - і γ -інтерферонів не до кінця зрозуміла і, хоча неглікозильовані форми цих білків практично повністю зберігають противірусну активність, це спонукає до розробки й використання систем експресії рекомбінантних інтерферонів в еукаріотичних клітинах.

Важливе місце в генній інженерії мікроорганізмів посідає виробництво **рекомбінантних вакцин**. Вони мають ряд переваг перед традиційними вакцинами: характеризуються відсутністю (або значним зниженням вмісту) баластних компонентів, майже не шкідливі та низької вартості. Можна назвати три основні підходи, які використовують для отримання таких вакцин:

- модифікація мікроорганізму шляхом делеції генів, що відповідають за вірулентність. При цьому зберігається здатність викликати імунну відповідь, і мікроорганізм можна використовувати як живу вакцину;
- перенесення антигенних детермінант патогенного мікроорганізму на непатогенний, який можна використовувати як вакцину;
- клонування та експресія генів білків, котрі містять антигенні детермінанти. Білки використовують як вакцину, що провокує імунну відповідь.

Мікроорганізми використовуються для **промислового виробництва органічних сполук**. У такому виробництві широко використовують технологію рекомбінантних ДНК, які дозволяють спрямовано змінювати метаболізм мікроорганізмів, включаючи нові гени або модифікуючи вже існуючі. Прикладами є використання рекомбінантних мікроорганізмів для промислового синтезу L-аскорбінової кислоти (вітаміну С), барвника індиго, антибіотиків, цінних біополімерів, бактерії продуценти амінокислот (н., фенілаланіну).

Мікроорганізми можуть приносити користь не тільки завдяки певному продукту, який ними синтезується, а й своєю дією на довкілля. Зокрема, бактерії можна використовувати для деградації ксенобіотиків (синтетичних хімічних речовин - гербіцидів, пестицидів, холодоагентів, хімічних відходів). Головну групу ґрунтових мікроорганізмів, що руйнують ксенобіотики, становлять бактерії роду *Pseudomonas*. Різні штами *Pseudomonas* здатні розщеплювати понад 100 органічних сполук, але кожен окремий штам використовує як джерело вуглецю тільки певну групу споріднених сполук.

Перенесенням плазмід, які кодують ферменти різних катаболічних шляхів, в один реципієнтний штам було створено «супербацилу», що має надзвичайні катаболічні властивості - здатність руйнувати більшість вуглеводнів нафти. Генетично модифіковані штами природних ґрунтових мікроорганізмів використовуються для комплексного біологічного очищення стічних вод. Бактерії-редуценти – можуть розщеплювати будь-які органічні речовини. Бактерії відбираються за здатністю розщеплювати певну речовину, а потім ця властивість посилюється біотехнологічними маніпуляціями. Таким шляхом були створені бактерії, які здатні розкладати нафтопродукти, що забруднюють середовище після техногенних катастроф.

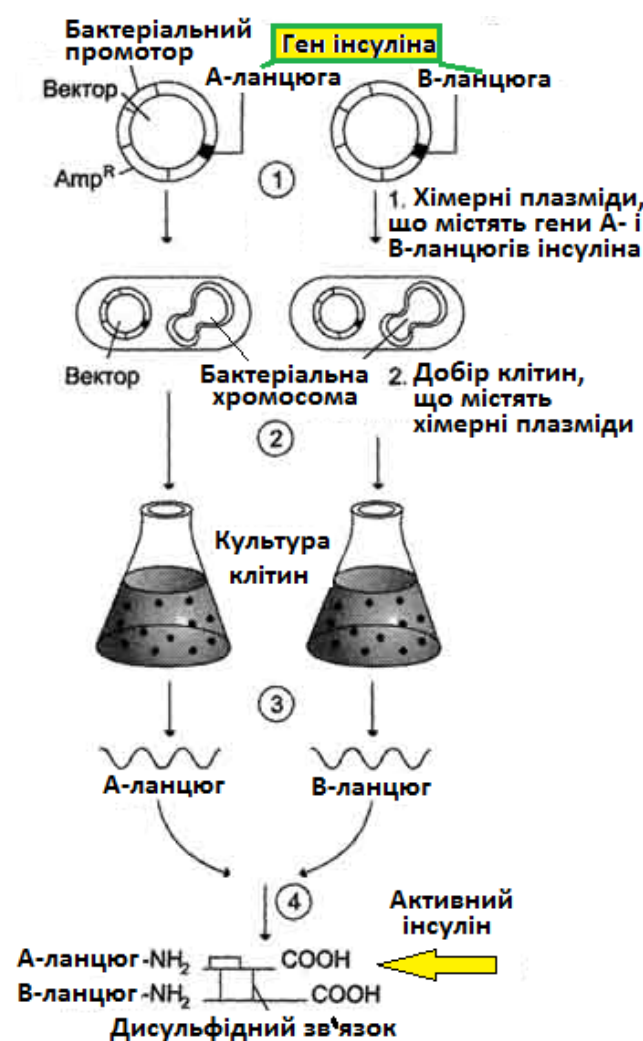
Трансгенні бактерії використовуються для підвищення стійкості рослин. Наприклад, відомі бактерії, що живуть в рослинах і стимулюють утворення шматочків льоду, але вони були модифіковані і набули властивість захищати вегетативні частини рослин від морозу. Симбіотичним бактеріям корінців кукурудзи, були введені гени, що кодують токсин

небезпечний для шкідливих комах.

Широке використання рекомбінантних бактерій обмежується непередбачуваними можливими негативними результатами в природних екосистемах. Тому досліджується вплив штучних мікроорганізмів в екосистемах та механізми блокування діяльності їх клітин в навколишньому середовищі.

Рекомбінантні лікарські препарати. Серед багатьох досягнень генної інженерії в медицині, найбільше значення має отримання людського інсуліну в промислових масштабах. До появи технології рекомбінантних ДНК багато лікарських препаратів на основі білків людини вдавалося отримувати в невеликих кількостях, їх виробництво обходилося дуже дорого, а механізм біологічної дії іноді був недостатньо вивчений. Генна інженерія відкрила можливості отримання всього спектра таких препаратів у кількостях, достатніх для їх застосування в клініці.

Генні інженери, як перше практичне завдання, вирішили клонувати ген інсуліну.



Клоновані гени людського інсуліну були введені з плазмідом в бактеріальну клітину, де почався синтез гормону не притаманного природним мікробним штамом. Перші публікації про експресію гена інсуліну людини в *E.coli* з'явилися в 1979 році. Отриманий на основі рекомбінантних ДНК інсулін людини випробували на добровольцях, які не страждали на діабет, у 1980 році, а вже в 1981 році велися широкі клінічні випробування. Для виробництва інсуліну людини використовують технологію рекомбінантних ДНК. На першому етапі дослідниками відтворювались послідовність ДНК за амінокислотною послідовністю інсуліну, роздільно синтезовані штучні гени його А- і В-ланцюгів (рис.13.4).

Рис. 13.4. Отримання інсуліну людини в клітинах *E.coli* на основі рекомбінантних ДНК (Воронін Л.Н. і співавт., 2004). 1 – трансформація клітин *E.coli* плазмидами, які містять гени, кодуючи структуру А- і В-ланцюгів інсуліну; 2 - синтез А- і В-ланцюгів інсуліну в процесі вирощування культури трансформованих клітин *E.coli*; 3 - виділення А- і В-ланцюгів інсуліну; 4 - просторове упаквання А- і В-ланцюгів інсуліну і окислення залишків цистеїну.

На 5'-кінці кожного з них розташовується кодон метіоніну (який у синтезованому білку стає N-кінцевим), а на Р-кінці – термінуючі послідовності. Кожен із генів був вбудований потім у ген β -галактозидази плазмід, а їх, у свою чергу увели в клітини *E.coli*.

Оскільки бактерії вирощували на середовищі з галактозою, то в них відбувався синтез β -галактозидази, а разом з нею – А- і В-ланцюгів інсуліну, приєднаних через залишок метіоніну. Після лізису бактерій і обробки бромціаном, який специфічно розщеплює білки за залишком метіоніну, ланцюги інсуліну відокремлювали від β -галактозидази (інсулін метіоніну не містить).

Потім ланцюги очищували і об'єднували для утворення нативного дволанцюгового

інсуліну. Він не містить побічних продуктів: білків Е.соїї, ендотоксинів і пірогенних речовин, а за властивостями не відрізняється від інсуліну з підшлункової залози людини і в тест-системі (у тварин з гіпоглікемією) проявляє повну біологічну активність.

Пізніше випробували альтернативний метод: синтезували ген молекули-попередника, проінсуліну, який уводили в Е.соїї. Після очищення проінсуліну його розщеплювали ферментами (трипсином і карбоксипептидазою) і отримували інсулін.

Встановлено, що «генно-інженерний» інсулін безпечний, не викликає алергічних і інших небажаних реакцій. З 1982 року в США, Японії, Великобританії і інших країнах виробляють генно-інженерний інсулін (100 літрів бактеріальної культури дають 20 грамів інсуліну, що дорівнює його кількості, яка міститься в 160 кг підшлункової залози тварин).

До 1980-х років препарати інтерферону отримували, головним чином, з лейкоцитів людини. Інтерферони утворюють хребетні, проте вони характеризуються видовою специфічністю, у зв'язку з чим інтерферони тварин не можуть бути використані для лікування людини. В організмі людини виробляється декілька класів інтерферонів: α -інтерферони, ($I\Phi_a$) - лейкоцитарні, β -інтерферони ($I\Phi_b$) – фібробластні і γ -інтерферони ($I\Phi_\gamma$) – імунні, яких одержують з Т-лімфоцитів. $I\Phi_a$ і $I\Phi_b$ синтезуються вірусіндукованими клітинами, тобто обробленими препаратами вірусів або вірусною РНК, а $I\Phi_\gamma$ виробляється у відповідь на дію речовин, що стимулюють ріст клітин. Показано, що $I\Phi_a$ кодується родиною генів, що включає більше 20 неалельних генів, тоді як $I\Phi_b$ кодується декількома, а $I\Phi_\gamma$ - одним геном.

У 1980 році Гілберт і Вейсман отримали інтерферон людини в генетично сконструйованих клітинах кишкової палички. З мРНК, виділеної з лейкоцитів, дослідники отримали дволанцюгову ДНК-копію, яку вбудували в плазмід, і отримали клони. З багатьох (>20 000 клонів) окремі клони кишкової палички містили ген лейкоцитарного інтерферону і синтезували цей білок. Були встановлені нуклеотидні послідовності генів лейкоцитарного ($I\Phi_a$) і фібробластного ($I\Phi_b$) інтерферонів, які досить близькі за структурою. У 1981 році Геддель у співавторстві з групою дослідників визначив послідовність ДНК, яка кодує $I\Phi_\gamma$, і показав, що якщо цю послідовність увести в геном бактерій, дріжджів або клітин ссавців, вони синтезують γ -інтерферон. Пізніше вдалося досягти експресії гена лейкоцитарного інтерферону людини в клітинах дріжджів, а ген фібробластного інтерферону був включений в Е.соїї. При виділенні кДНК інтерферонів розробили новий підхід. Процедура виділення кДНК інтерферонів полягала в наступному. Із лейкоцитів людини виділили мРНК і фракціонували її за розмірами; проводили зворотну транскрипцію і вбудували в сайт PstI плазміди рBR 322.

Отриману рекомбінантну ДНК вводили в Е.соїї. Тисячі одержаних клонів поділили на 12 груп по 512 клонів у кожній. Тестування проводили в кожній групі клонів, що дозволило прискорити процес їх ідентифікації. Кожну групу клонів гібридизували з неочищеним препаратом ІФ-мРНК. Із гібридних клонів, які містили клоновану ДНК і мРНК, виділили мРНК і проводили її трансляцію в безклітинній системі синтезу білка.

Визначили інтерферонну противірусну активність кожної суміші, отриманої в результаті трансляції. Групи, які проявили інтерферонну активність, містили клон із кДНК, що гібридизувалася з ІФ-мРНК.

Позитивні групи поділили на 8 підгруп (по 64 клонів в кожній) і далі проводили тестування. Ділення на групи повторювали до того часу, поки не ідентифікували клон, що містив повнорозмірну ІФ-кДНК людини.

На сьогоднішній день клоновано і отримано декілька сотень генів (кДНК) різних білків людини, які є лікарськими препаратами. Більшість цих генів вже експресовані в клітинах-хазяїнах і зараз їх продукти проходять перевірку на можливість застосування для лікування різних захворювань людини. До таких білків відносяться: гемоглобін, АКТГ, інтерлейкіни, кальцитонін, релаксин, соматоліберин, сироватковий альбумін, тиреотропний гормон, тромбоцитарний фактор росту та ін.

Також зроблено декілька спроб створити інтерферони з комбінованими властивостями, використовуючи той факт, що члени родини ІФ_α різняться за ступенем і специфічністю своєї противірусної активності (відносно клітин людини ІФ_β в сім разів активніший, ніж ІФ_α). Це було досягнуто в результаті поєднання частин послідовностей генів різних ІФ_α, що призвело до утворення гібридного білка з іншими властивостями, ніж у кожного з початкових білків. Так отримано декілька гібридних генів. Деякі з них проявляють більшу, ніж батьківські молекули антипроліферативну активність у культурах різних ракових клітин людини. Інтерлейкін – ефективний протираковий препарат виробляється в Японії і США. На сьогодні американський ринок медичних препаратів, отриманих методами генної інженерії, зрівнявся із виробництвом антибіотиків.

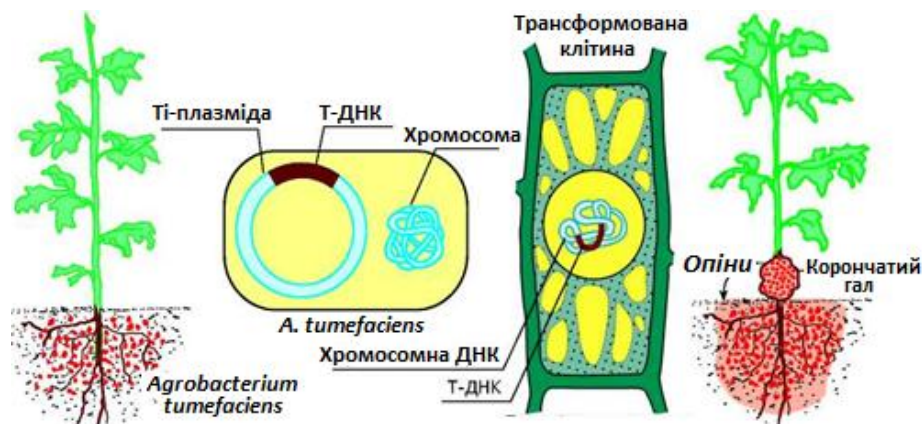
Трансгенні рослини. Розвиток науково-дослідних робіт по трансгенезу у еукаріотичних організмів пов'язано з конструюванням векторів-носіїв для перекидання «корисних» генів. Ця проблема була вирішена, що дало можливість трансгенних маніпуляцій з рослинами і тваринами. В генній інженерії у рослин використовують не тільки ядерний спадковий матеріал, але і цитоплазматичну ДНК (хлоропластів і мітохондрій).

Для рослин найбільше використовують вектори – Ti (tumor inducing) і Ri (root-inducing) плазміди симбіотичних бактерій. Ti плазміди мають у складі ДНК Т-ділянки (від англійського transfer - перенесення), здатні вбудовуватися в ядерний геном деяких рослин. Вбудовування в Т-ділянку потрібного гена перетворює Ti-плазміди на вектор для трансгенних маніпуляцій.

В результаті детального вивчення молекулярно-генетичних основ пухлинного росту у рослин за участю бактерій роду *Agrobacterium* виявилось, що пухлиноутворюючі плазміди агробактерій (Ti-плазміди) - міні-кільцеві ДНК (12-22 тис. п. н.) – природна векторна система, яку зараз широко використовують для трансгенезу генів рослин. За допомогою цього унікального вектора вже отримано велике число трансгенних рослин.

Грунтові бактерії – природний генний інженер. Плазміда агробактерії переносить частину своєї ДНК в ДНК клітини рослини клітини, в яку вбудовується «потрібний» ген. Вона кодує ферменти синтезу фітогормонів і опінів – похідних амінокислот, які використовуються бактерією як джерело вуглецю, азоту і енергії. Трансформація Т-ДНК з бактерії в цитоплазму рослинної клітини здійснюється за 30 хв. У геном рослини можуть вбудовуватися декілька копій Т-ДНК. Після вбудовування в хромосому Т-ДНК стає звичайною частиною генома рослини. Т-ДНК транскрибується в рослинній клітині РНК-полімеразою II. Транскрипти мають властивості еукаріотичних матриць. Сама бактерія в клітину не проникає, а залишається в міжклітинному просторі і використовує рослинні клітини з вбудованою Т-ДНК для синтезу опінів (рис 13.5).

Т-ДНК Ti-плазмід мають дві властивості, що роблять її ідеальним вектором для трансгенезу. По-перше,



агробактерії трансформуються практично в усі клітини дводольних рослин. Також можна добитися зараження однодольних (н., деяких злаків).

Рис.13.5. Генетична колонізація вищої рослини бактерією *A.tumefaciens*: 1 - *A.tumefaciens* в ризосфері рослини; 2 - в хромосомі бактерії є Ti-плазміда; 3 - Ti-плазміда проникає в ядро клітини рослини і Т-ДНК вбудовується в геном рослини; 4 - утворення пухлини - корончатого гала і синтез опінів.

По-друге, інтегрована до складу генома рослини Т-ДНК має домінуючі гени, які мають власні промотори, під контролем яких можуть експресуватися вставлені в Т-ДНК чужорідні гени.

Введення Т-ДНК в клітини рослин відбувається дуже просто – необхідно заразити їх *A. tumefaciens*, які містять відповідну Ті-плазмиду. Ідеальна векторна система на основі Ті-плазмиди повинна:

а) містити всі сигнали, необхідні для перенесення і стабільної інтеграції в ядерну ДНК рослин; систему для експресії чужорідних генів в рослинах: промотор, який впізнається рослинними полімеразами; маркер, який необхідний для селекції трансформованих клітин;

б) не містити онкогенів, які б пригнічували диференціювання рослинних клітин. Це досягається за допомогою транспозонного мутагенезу. В результаті введення транспозона в Т-ДНК можна вимкнути гени, які призводять до пухлиноутворення. Дана маніпуляція не впливає на механізм перенесення Т-ДНК (в експериментах використовують бактеріальні транспозони).

При конструюванні векторних молекул мають бути включені в геном промотори, що працюють в рослинах. Промотори повинні мати здатність до активної експресії та можливості регуляції, володіти тканно- і органоспецифічною експресією. До регульованих промоторів відноситься промотор генів білків теплового шоку (їх активність індукується підвищенням температури). Для генів, контролюючих синтез запасних білків насіння злаків (н., зеїну) характерна тканинно-специфічна експресія. Гени, підшиті до промотора гена вірусу мозаїки цвітної капусти 12 (СМV) активно експресуються у всіх тканинах.

У векторі мають бути маркери (репортерні гени), за допомогою яких можливий відбір трансгенних рослин. З ДНК світляків виділені гени *luxA* і *luxB*, які визначають синтез люциферази, що забезпечує перехід люциферинів з окисленої форми в основну і це викликає світіння. Інший репортерний ген – *pgfp*, виділений з ДНК медузи *Acquorea victoria* контролює синтез GFP-білка (green fluorescent protein). Трансгенні рослини з цим геном світяться в ультрафіолеті зеленим світлом.

Традиційний спосіб трансформації рослинних клітин за допомогою Т-ДНК полягає в нанесенні агробактерій з Ті-плазмідом на спеціально пошкоджений організм. Зараз використовують широкий арсенал методів для отримання трансгенних рослин, вже розроблені спеціальні прилади-трансформатори, які стріляють найдрібнішими вольфрамовими кульками, одягненими в молекули ДНК і здійснюють трансформацію рослин.

Обеззброєння Ті-плазмід агробактерій: пухлино-індукуючу ділянку плазмиди, видаляють і замінюють на штучний вектор, в який включений необхідний ген для перенесення в ядерний геном рослин.

Всі трансгенні рослини отримані за схемою агробактеріального перенесення – дводольні рослини. Для однодольних, в основному злакових рослин, розроблені інші способи перенесення, н., балістичний - за допомогою «генної гармати». На мікрочастки золота або вольфраму поміщається ДНК-вектор і «вистрілюють» в рослинні клітини.

Головні напрями використання трансгенних рослин. Вперше трансгенні рослини отримані в 1982 році (Інститут рослинництва в Кельні і компанія Monsanto). Трансгенні рослини набули стійкості до канаміцину, що інгібує ріст. Зараз в компанії Monsanto отримано більше 50 тис. ліній трансгенних рослин.

Основний напрямок розробки трансгенних рослин – підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. Дозволено використання трансгенних сої, кукурудзи, бавовни, рапсу, картоплі, томатів, буряку, гарбуза, тютюну, папаї, льону, рису, пшениці та ін. Трансгенні рослини вирощуються в США, Китаї, Аргентині, Канаді, Австралії, Мексиці, Іспанії, Франції, Південній Африці, Португалії, Румунії та інших країнах.

З використанням трансгенних рослин вирішені такі проблеми, як стійкість до гербіцидів, до комах, до вірусів, до грибкових і бактеріальних захворювань; регуляція процесу і термінів дозрівання, підвищення загальної продуктивності, створення їстівних вакцин. В даний час близько 200 видів рослин мають трансгенні форми. У розвинених країнах вже використовуються генетично модифіковані сорти кукурудзи, пшениці, цукрового буряка і рапсу, стійкі до гербіцидів. Поля, що засівають такими культурами, обробляють гербіцидами і знищують тільки бур'яни. Генетично змінені рослини зі стійкістю до різних класів гербіцидів на теперішній час є найбільш успішним біотехнологічним продуктом.

Вже клоновані гени, які кодують нечутливі до дії гербіцидів ферменти-мішені, що дало можливість отримувати трансгенні рослини, стійкі до різних груп гербіцидів (дотліфосату, хлорсульфурунових і імідазолінових). Виділені також гени, які кодують ферменти деградації деяких гербіцидів, що дозволило отримувати трансгенні рослини, стійкі до фосфінотрицину і далапону.

Один з напрямів трансгенезу рослин - отримання білків тваринного походження. Трансгенні рослини вже можуть виробляти білки тваринного походження: імуноглобуліни, нейропептиди та інші. Для медицини розроблені рослини, в яких утворюється людський β -інтерферон. Одержана картопля, що утворює олігомери нетоксичної субодиниці Р-токсину холери. Такі трансгенні рослини можуть бути використані для отримання вакцини проти холери, імунізація проти якої буде відбуватися при пероральному прийомі вакцини.

Найважливішою сировиною для отримання різного роду хімічних речовин є жирні кислоти, які є основним компонентом рослинних олій. Вже вирощують трансгенний рапс із підвищеним вмістом лаурату (жирна кислота, що широко використовується для виробництва косметики, пральних порошків, шампунів). Вчені клонували ген специфічної тіоестерази з рослини *Umbellularia californica*, в якій вміст лаурату в олії насіння досягав 70%. Структурна частина гена цього ферменту під контролем промотора і термінатора гена білка, специфічного для ранньої стадії утворення насіння, була вбудована в геном рапсу і арабідопсису, що збільшило вміст лаурату в маслі цих рослин. Інші проекти, які мають перспективу - зміна складу і вмісту ненасичених жирних кислот у рослинної олії.

Розроблена технологія отримання «їстівних» вакцин. На перших етапах роботи отримані трансгенні рослини тютюну і люцерни з геном Р-інтерферона людини. Потім приступили до створення трансгенних рослин тютюну і люцерни з генами імуногенних білків мікобактерій, що викликають туберкульоз, і з генами оболонки вірусу гепатиту В. При експресії подібних генів в рослинах, які з'їдаються тваринами, в їх організмі передбачається імунна відповідь з утворенням антитіл на продукований антиген (природна вакцинація по стійкості до захворювання туберкульозом або гепатитом В).

Цікавий підхід запропонувала генна інженерія рослин, щодо забезпечення стійкості рослин до комах. Давно відома бактерія *Bacillus thuringiensis*, яка продукує токсичний білок для багатьох видів комах і у той же час безпечний для ссавців. Білок (дельта-ендотоксин, CRY-білок) продукується різними штамми *B.thuringiensis*. Це прототоксин, який протеолітично розщеплюється в кишечнику комах, утворюючи активований токсин, що лізує клітини кишкового епітелію, він у 80 000 разів сильніший, ніж фосфорорганічні інсектициди, які використовують для захисту від комах-шкідників сільськогосподарські культури. Вбудовування гена цього білку в геном рослин дає можливість отримати трансгенні рослини, які не поїдаються комахами.

Практичне застосування генно-інженерних методів зі створення рослин, стійких до конкретних комах-шкідників, вимагає великої роботи по підборі необхідних штамів *B.thuringiensis* і створенню генно-інженерних конструкцій (Bt-рослин, від *Bacillus thuringiensis*), які дають найбільший ефект для конкретних видів комах. Так, наприклад, була отримана картопля, стійка до колорадського жука. Bt-рослини бавовни і кукурудзи займають

основну частку в загальному обсязі генетично модифікованих рослин тих культур, які вирощують на полях. За допомогою методів генної інженерії розробляється захист рослин і від інших паразитів, таких, як гриби, бактерії і віруси.

Перспективне завдання сільського господарства - введення в культурні рослини генів фіксації азоту. Азотфіксація - це процес перетворення атмосферного азоту до амонію, який використовується для синтезу амінокислот, білків та інших органічних речовин. Цей процес здійснюють азотфіксуючі бульбочкові бактерії бобових рослин (гороха, бобів, люцерни й конюшини). У результаті такого симбіозу бобові рослини не потребують підживлення азотними добривами, потреби на які збільшуються (н., в 1987 р. у світі було використано більше 60 млн.т. азотних добрив). Це дуже складне завдання, оскільки азотфіксація контролюється 13-15 генами (nif-гени). Молекулярні генетики вирішують проблеми правильного функціонування цих генів у рослинних клітинах.

Ведуться роботи по створенню біоінженерних рослин, які могли б мати високу пристосованість до умов зовнішнього середовища; вміщати більшу кількість необхідних для людини поживних речовин; зберігатися довгий час. Розробляються трансгенні рослини, які здатні продукувати для людини різні речовини і ліки. Реконструйовано картоплю для продукції альбуміну людини. Прогнозується, що в майбутньому рослини зможуть утворювати в своєму насінні гормони людини.

Рослини є найважливішим джерелом моно-, ди- і полісахаридів і продуктів на їх основі (целюлози, крохмалю, глюкози, сахарози та ін.). Проводиться робота по створенню трансгенних рослин картоплі та інших культур, що накопичують крохмаль, в яких ця речовина буде представлена у вигляді амілопектину (розгалужена форма крохмалю) або у вигляді амілози (лінійна форма крохмалю).

Напрямів генної інженерії рослин дуже багато, але існують різні проблеми, а перспективи вражають та вимагають бути обережними.

Трансгенні тварини як моделі захворювань і біореактори.

Лабораторні тварини здавна використовувалися в експериментальних дослідженнях у біології та медицині. Тварини слугували моделями, н., на тваринах, у яких була гемофілія (собаки, миші, копитні) вивчали гемофілію та дію різних препаратів для її лікування. Використання трансгенних тварин як моделей захворювання розширило можливості для експериментального дослідження та збільшило кількість захворювань, які могли досконало вивчити в лабораторних умовах. Отримання трансгенних організмів є альтернативою традиційним методам селекції тварин і рослин.

У 70-х роках обґрунтовано можливість отримання ферментів з тканин людини в тваринах і розроблені системи спостереження за долею ферментів в організмі ссавців. Перші клінічні випробування були проведені при різних лізосомальних порушеннях: гангліозидозі 2 типу, глікогенозі 2 типу, хворобі Фабрі і хвороби Гоше.

Перед клінічним випробуванням було встановлено, що високоочищені ферменти людини гідролізують природний субстрат. Перевірка показала, що ферменти виявляються в тканинах печінки при їх внутрішньовенному або підшкірному введенні. При цьому концентрація ферментів в крові зменшується, а в печінці підвищується. Вони не проникають в мозок завдяки бар'єрним функціям мозкових оболонок. Зроблено висновок, що при кожній хворобі потрібна специфічна доставка ферментів в клітини-мішені. Це може вимагати специфічного очищення або будь-якої хімічної модифікації ферментів.

Велика роль у дослідженні проблем генетики людини і медичної генетики належить генетичним лініям мутантів тварин і, особливо, генетичним лініям мишей (Конюхов, 1980; Корочкин, 1978). У різних лабораторіях світу, у т.ч. і в Україні, створені і підтримуються колекції, що налічують десятки і сотні генетичних ліній різних експериментальних тварин – мишей, щурів, кроликів, собак та ін. Серед них генетичні лінії мишей найбільш численні.

Цінним об'єктом для медико-генетичних досліджень стали трансгенні миші. Вони дають інформацію необхідну для планування генної терапії людини. Шляхом обробки сильними мутагенами (етилнітрозсечовиною, триетиленмеламіном) самців мишей, на них змодельювали β-таласемію, поліцитемію, нирковий ацидоз та ін. (Erickson, 1988).

Вчені виділили ген, який відсутній у хворих на м'язову дистрофію Дюшена. Завдання, яке вже не викликало складності – створення генетично модифікованих організмів з геном синтезу дистрофіну. Але що буде, якщо у хворих дистрофін потрапить в інші тканини, або його утворюватиметься забагато? Як модель захворювання були створені трансгенні миші, в м'язах яких вироблялося дистрофіна в 50 разів більше, а також відбувалася продукція цього білка в інших тканинах. Дистрофін не викликав у таких мишей патологічних відхилень і запропонований спосіб лікування (ін'єкції дистрофіна) став використовуватися для дітей хворих на м'язову дистрофію.

Трансгенних тварин із порушенням у певному гені можна використовувати як модель для вивчення хвороб людини на молекулярному рівні. Наприклад, направлений «нокаут» гена родопсину миші призводить до інактивації паличок сітківки, що імітує пігментний ретиніт людини. На мишах із «нокаутованим» геном родопсину можна вивчати процес дегенерації сітківки, а також терапевтичний ефект лікарських засобів при лікуванні ретиніту.

В наукових лабораторіях створено декілька сотень ліній мишей із «нокаутованими» генами, які використовуються як моделі для вивчення різних захворювань людини.

Для отримання трансгенних мишей, що синтезують людські антитіла, використовували штучні дріжджові хромосоми (YAC). Такі миші стали модельними системами для вивчення генетичних хвороб, н., хвороби Альцгеймера.

Трансгенних мишей створювали трансфекцією ES-клітин за допомогою YAC, що несуть декілька споріднених генів або один великий ген. Н., є трансгенні миші, що несуть кластер із п'яти функціональних генів β-глобіну людини довжиною ≈250 тис. пар нуклеотидів, всі ці гени експресуються тканиннспецифічно і в потрібний час, як це відбувається у людини. Така активність визначалася їх фланкувальними послідовностями, які містили промотор і інші регуляторні елементи.

Трансгенні миші допомагають при вивченні злоякісних пухлин, моногенних і мультифакторіальних хвороб людини. Але трансгенна технологія має недоліки. Введення ДНК відбувається не точно на потрібний локус хромосоми. Ген, що трансформується, може потрапити в різні ділянки хромосоми і порушити функцію інших генів або потрапити під контроль інших генів. Навіть якщо трансген вбудовується в хромосому і експресується, його ефект може бути перекритий таким же геном клітини-хазяїна. Тому була розроблена технологія точнішого «прицілювання» гена, при якій ген, що вводиться, займає місце свого алеля в хромосомі – процес гомологічної рекомбінації. Така технологія, працює тільки на

ранніх етапах розвитку зародка, до його імплантації в стінку матки.

Рис. 13.6. Схема одержання лінії трансгенних мишей з використанням ретровірусних векторів.



Інший варіант – створення трансгенних організмів з «вимкненими» генами. Тварин з «вимкненим» геном використовують у вивченні захворювань, у яких задіяно багато генів. Н., атеросклероз вивчають шляхом інактивації та поєднання генів, продукти яких контролюють ліпідний обмін. У мишей замінюють в генотипі активний ген на інактивований і визначають ефект його відсутності на різних етапах онтогенезу. Таким методом вивчають функції білків

імунної системи, механізм взаємодії онкогенів у виникненні пухлин, розвиток полігененних і мультифакторіальних ознак та захворювань. Особливо зручними є трансгенні тварини для аналізу експресії генів-мутантів *in vivo* і оцінки їх біологічної дії.

Ретровірусні вектори можуть бути альтернативою для ефективною трансдукції генів у сільськогосподарських тварин. Інфекція зигот чи предімплантаційних ембріонів здебільшого призводить до отримання трансгенних тварин-мозаїків внаслідок інтеграції, яка відбувається під час мітозу після попередньої реплікації ДНК. Усі нащадки, народжені з інфікованих ооцитів, були трансгенними. Не дивлячись на обмежену кількість отриманих трансгенних тварин, було доведено передачу трансгена у спадок і експресію рекомбінантного продукту (рис. 13.6).

Перші трансгенні миші за допомогою ретровірусних векторів були створені методом інфікування доімплантаційних ембріонів ретровірусами (Р.Яніш, 1976). Ретровіруси мають особливості, які дозволяють використовувати їх векторами для перенесення генів. Застосування ретровірусів має переваги: ретровірус сам вбудовується в геном; здатний заражати клітини ембріонів на ранніх стадіях розвитку як *in vivo*, так і *in vitro*; провірус стабільно вбудовується в хромосому, а ембріони, заражені вірусом здатні передавати вірус потомству. Іноді, як показали дослідження (Р.Яніша та співав., 1981) ретровіруси дикого типу інфікують клітини зародка, проте їх експресія в цих клітинах інгібується, що створює проблеми. Недоліком використання ретровірусів є малі розміри нуклеїнових кислот, н., розмір гена, який може бути включений у ретровірусний геном, не повинен перевищувати 8 тис. пар нуклеотидів. Довгі кінцеві повтори провіруса містять сигнали транскрипції, які можуть пригнічувати експресію вбудованого гена. Тварини, що отримують за допомогою ретровірусної технології, зазвичай мозаїчні (одні клітини організму містять трансген, а в інші – трансгену не мають).

Нарешті, використання ретровірусних векторів має ще один великий недолік. Хоча ці вектори створюються так, щоб вони були дефектними за реплікацією, геном штаму ретровірусу (вірусу-помічника), який необхідний для отримання великої кількості векторної ДНК, може потрапити в ядро разом з трансгеном. Ретровіруси-вектори можуть реплікуватися в організмі трансгенних тварин, що неприпустимо, якщо цих тварин передбачається використовувати в їжу. Оскільки існують інші методи трансгенезу, ретровірусні вектори не використовують для створення трансгенних тварин, що мають комерційну цінність.

У правильно підібраних умовах фрагменти ДНК можуть бути поглинені клітиною за допомогою фагоцитозу. Даний метод підходить для генної терапії, коли необхідно модифікувати тільки деякі клітини в організмі. Для трансформації клітин використовують процес електропорації (стимуляція клітини короткочасними імпульсами слабого електричного струму), при цьому в мембрані утворюються пори через які проникає ДНК.

Технологія вирощування та пересадки стовбурових клітин дозволила зробити новий крок в лікуванні багатьох хвороб. Стовбурові клітини (СК) мають унікальні властивості, що перетворює їх на безцінний об'єкт для медицини. «Чужі» стовбурові клітини відторгаються набагато слабше, ніж пересаджені цілі органи, що сформовані з диференційованих клітин. Тому з СК можна вирощувати в лабораторних умовах попередників найрізноманітніших клітин: імунних, серцевих, нервових, печінкових і потім трансплантувати їх хворим людям замість донорських органів.

В хірургії і трансплантології вже розроблені методи пересадки пацієнтам клонуваних органів, які вирощуватимуть із клітин самих хворих. Розроблений метод лікування серцевих захворювань на основі стовбурових клітин, які беруть або з ембріонів, або зі спинного мозку людини. Фахівцями отримані кардіоміоцити – клітини серцевого м'яза, які здатні допомогти в лікуванні хворих, що перенесли інфаркт міокарда.

Модифіковані стовбурові клітини здатні руйнувати ракові клітини. Джон Ю. та співавт.

(2000 р.) генетично модифікували стовбурові клітини мишачих зародків і вони почали виробляти стимулятор імунної системи організму – інтерлейкін 12, який руйнує гліоми. Введення модифікованих стовбурових клітин мишам з пухлинами мозку збільшує тривалість їх життя, а іноді приводить до вироблення постійного імунітету до даної патології.

Французькі учені за допомогою ін'єкцій суспензії стовбурових клітин у поєднанні з імунодепресантами розробили метод лікування серпоподібно-клітинної анемії, їм вдалося досягти 85% виживання пацієнтів протягом 10 років, що значно перевищує стандартне виживання хворих на серпоподібно-клітинну анемію.

В Техаському університеті вчені за допомогою стовбурових ембріональних клітин, уведених в мозок, створили нову нервову тканину. Культуру людських ембріональних стовбурових клітин, після обробки спеціальними реагентами, ввели в мозок здорових щурів. Гістологічний аналіз показав, що введені стовбурові клітини сформували нейрони тих типів, які типові для даних ділянок нервової системи.

Використання стовбурових клітин для відновлення пошкоджених структур – перспективний метод генної інженерії та генотерапії тому і досліджується великою кількістю наукових лабораторій.

Клонування за допомогою пересадки ядер проведено в декількох лабораторіях. Проведені на амфібіях експерименти (Стейварт, 1997) свідчили, що ядра, які вилучаються із ранніх ембріонів, можуть бути використані для отримання клонованих дорослих особин. Проте ядра, взяті з більшості тканин пуголовка, а тим більше тканин дорослої амфібії, виявилися здатними забезпечувати розвиток не далі ювенільної стадії.

Спроби застосувати методи клонування ссавців мали суперечливі результати. Ядра з ембріонів миші пізніше за стадію восьми бластомерів, з ембріональних стовбурових клітин або з внутрішньоклітинної маси бластоцисти виявилися не здатні дати початок життєздатним ембріонам (Шонг та співавт., 1993). Проте при роботі з іншими видами ссавців (корова, вівця) досягнуто більших успіхів. Завдяки перенесенню ядер ембріональних клітин великої рогатої худоби, що культивуються нетривалий час, отримані життєздатні особини. У 1997 році Уїлмутом та ін. була клонована вівця на ім'я Доллі за допомогою перенесення ядра клітини молочної залози (вимиені) дорослої тварини в енуклеювану яйцеклітину. Так вперше була доведена плюрипотентність ядра диференційованої дорослої клітини.

Клонування тварин – це отримання точних копій тієї або іншої тварини. Методика клонування полягає в наступному: ядро яйцеклітини видаляють мікропіпеткою, культивують епітеліальні клітини молочної залози дорослої особини й індукують їх перехід у фазу G_0 . Далі здійснюють злиття клітин у S_0 -фазі та яйцеклітин, позбавлених ядра, і вирощують відновлені яйцеклітини в культурі або в яйцепроводі з накладеною лігатурою до ранніх стадій ембріогенезу, а потім імплантують їх у матку «сурогатної» матері, де і відбувається подальший розвиток. В досліді Уїлмута проведено злиття 277 енуклеюваних яйцеклітин з клітинами молочної залози у фазі G_0 . Утворилося 29 ембріонів, з яких тільки один розвинувся до життєздатного плоду. Клонування Доллі з ядра диференційованої клітини вдалося здійснити завдяки перенесенню ядер із клітин, що знаходяться в стадії спокою (G_0), і, можливо, особливостям раннього ембріогенезу – в перші три поділи зиготи вівці відбувається тільки реплікація ДНК і жоден із генів не експресується, а також те, що цей період займає декілька діб. За цей час уведена ДНК звільняється від регуляторних білків, а гени ембріонального розвитку активуються ініціаторними ембріональними білковими чинниками з цитоплазми яйцеклітини.

Метод клонування ядер соматичних клітин дорослих тварин може бути використаний для створення і збереження цінних порід тварин.

Використання ліпосом і рецепторопосередковане перенесення ДНК вперше проведено у 1985 р (Роттманом та співавт.). Була створена конструкція з довгим кінцевим

повтором вірусу саркоми Молоні і фрагмента генома, що кодує поверхневий антиген вірусу гепатиту В. Ці ДНК інкапсулювали в ліпосоми, які потім ін'єктували в бластоцель мишачих ембріонів. З частотою 6% одержали трансгенних нащадків.

Перекоonstrуєвані організми, одержані методами генної інженерії (трансгенні тварини, рослини, мікроорганізми), клітини яких здатні виробляти потрібні білки називають біореакторами. Вони здатні розмножуватися і передавати цінні ознаки нащадкам.

Прикладом живого біореактора є свиня, яка продукує гемоглобін людини (Нь) (1991р.). Частина еритроцитів свині (15%) містять людський Нь, але не містить вірусів людини. Іншою трансгенною твариною стала корова, яка з молоком виробляє людський лактоферин. В результаті підсадки трансгенної яйцеклітини народився бик, від якого отримано багато трансгенних телиць, які виробляють і виділяють лактоферин з молоком. Трансгенних свиней із зміненою експресією генів гістосумісності, можливо, використовуватимуть для ксенотрансплантації.

Вже існують інші трансгенні тварини. В молоці трансгенних кіз є активатор плазміногена, який розчиняє тромби; трансгенні кролики виробляють фермент оксиглюкозидазу, необхідну для лікування хвороби Помпі; трансгенні кури несуть яйця з людськими антитілами. Розпочата розробка технологій приготування вискоєфективних і біологічно-безпечних лікарських препаратів нового покоління і біологічно повноцінного дитячого харчування на основі рекомбінантного лактоферину, що одержують з молока трансгенних тварин. Використання козячого молока, що містить лактоферин людини для грудних дітей на штучному вигодовуванні, дозволить у декілька разів знизити в них захворюваність на гастроентерит.

28 травня 2009 р. у журналі «Nature» опубліковані матеріали зі створення перших Success трансгенних приматів. Японські вчені (Ерік Сасака і Хідеюкі Окано) за допомогою вірусного вектора ввели в пробірці в ембріони мавп (*Callithrix jacchus*) ген, що кодує зелений флуоресціюючий білок (GFP). З'явилися на світ п'ять трансгенних мавп. Уведений ген був переданий наступному поколінню мавп.

Використання трансгенних приматів забезпечить розробку методів лікування хвороби Паркінсона і аміотрофічного склерозу, а також можуть бути корисними (модельними тваринами) у цитогенетичних дослідженнях і в трансплантології.

Британські й американські вчені вивели малярійного комара із зеленими очима. Він відкладає більше яєць, а зелений блиск очей відрізняє його від «прототипу». У ході дослідів рівне число модифікованих і звичайних комарів харчувалися кров'ю мишей заражених малярією. Із часом живими лишилися модифіковані комарі, і після дев'ятого покоління більшість комарів ($\approx 70\%$), що залишилися, не заражались паразитом.

Можливо, що комарі з додатковим геном, «відбиваючим» атаки малярійного паразита, можуть витіснити дикий тип і стати пануючою популяцією і, припинивши, таким чином, масове зараження людей.

Для створення трансгенних організмів необхідна колекція генетичного матеріалу. Банки і колекції генетичного матеріалу є в багатьох генно-інженерних лабораторіях. Наприклад, у Росії до складу лабораторії трансгенезу ІБГ РАН входить «Трансгенбанк», в якому зібрані унікальні гени людини і тварин, різні регуляторні елементи і генні конструкти.

Створені генні конструкти, які забезпечують тканиноспецифічну й економічну продукцію бактерицидного білка грудного жіночого молока лактоферину з молоком трансгенних мишей. В молоці трансгенних мишей концентрація рекомбінантного лактоферину майже в чотири рази більша.

Отримані миші, трансгенні за геном проурокинази людини, яка сприяє розсмоктуванню тромбів при гострому інфаркті міокарда. Дослідження молока трансгенних мишей показало, що в організмі тварин проурокиназа трансформується в зрілий продукт

урокиназу, втрачаючи при цьому свої лікарські властивості, і вже в такому вигляді продукується з молоком. Запропоновано блокувати трансформацію проурокинази в урокиназу в організмі тварин ферментним шляхом.

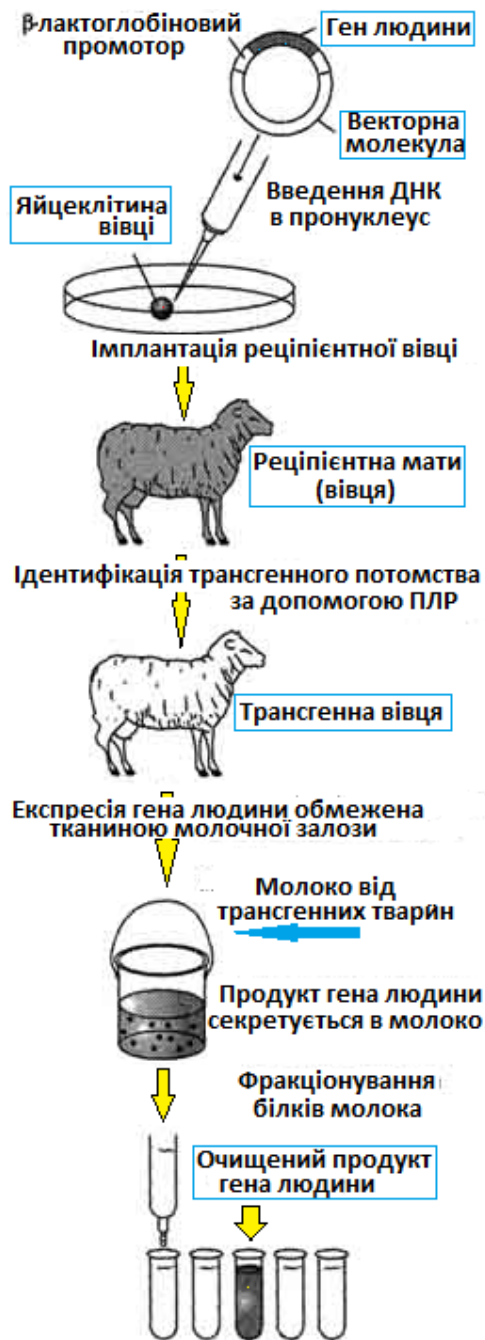


Рис. 13.7. Використання трансгенних тварин для одержання білків людини. Ген людини вбудовують в вектор під контролем β-лактоглобінового промотора, який активний тільки в клітинах молочної залози. Присутність в трансгенного потомства гена людини контролювали за допомогою метода ПЛР, з використанням праймерів до гену людини. Фракціонуванням білків молока одержують білковий продукт експресії гена людини.

З цієї метою були створені генні конструкти, що містять інгібітор екотин, а потім отримані трансгенні миші, що експресують екотин. У молоці гібридів, отриманих при схрещуванні мишей, трансгенних за геном проурокинази людини і гена екотину, спостерігалася секреція проурокинази людини. Подібний результат у світовій практиці отриманий вперше.

У практичних цілях трансгенні тварини використовуються також для виробництва різноманітних медичних препаратів (антибіотиків, факторів згортання крові та ін.). Крім того, перенесення нових генів дозволяє отримувати трансгенних тварин, що відрізняються підвищеними продуктивними властивостями (н., посилення росту шерсті у овець, зниження вмісту жирової тканини у свиней, зміна властивостей молока) або стійкістю до різних захворювань, що викликаються вірусами й іншими патогенами.

На теперішній час людство вже використовує медичні препарати, органи, продукти харчування, які отримуються за допомогою трансгенних тварин.

Здійснено успішне перенесення в генوم миші гена гормону росту людини. Маса трансгенних мишей і їх нащадків була в 1,5-2 рази більше. Нині широко ведуться дослідження по отриманню трансгенних кроликів, овець, птахів, свиней.

Швидкими темпами розробляються методи створення трансгенних тварин, які можуть синтезувати деякі препарати (інсулін, інтерферон, фактори згортання крові, гормони, незамінні амінокислоти).

Для отримання трансгенних тварин використовуються інші методи, до яких належать: обробка екзогенною ДНК сперматозоїдів, які будуть запліднювати *in vitro* яйцеклітини; використання ліпосом як векторів чужорідної ДНК. Проте, ці методи менш поширені ніж метод мікроін'єкції чужорідної ДНК в пронуклеус зиготи.

Останнім часом особлива увага приділяється створенню векторів на базі штучних хромосом ссавців. Завдяки наявності основних структурних елементів звичайних хромосом такі міні-хромосоми тривало утримуються в клітинах і здатні нести повнорозмірні гени (геноми) і їх природні регуляторні елементи, які необхідні для правильної роботи гена, в

потрібній тканині і в належний час.

Таким чином, трансгенні організми сприяють вирішенню завдань селекції сільськогосподарських рослин і тварин; вивченню механізмів і процесів, які відбуваються на молекулярно-генетичному, клітинному та організмовому рівнях; аналізу порушень при генних і мультифакторіальних хворобах; створенню ефективних препаратів та методів для лікування хвороб людини.

Проблеми екологічної безпеки. Вважається, що трансгенез у рослин і тварин - найбільш перспективна біотехнологія для вирішення продовольчих і медичних проблем на найближче десятиліття. Трансгенні тварини з промоторами «генів молока» (кози, вівці, свині, корови) використовуються для секреції високоактивних біологічних речовин для медицини і фармакології.

Вже пройшли ліцензування і поступили на ринок отримані через трансгенних тварин: антитрипсин, який використовується при легеневих захворюваннях, антитромбін III (для запобігання інфарктам і інсультам, згортання крові), білок С, що володіє захисними функціями, і ряд інших.

Проте у всьому світі в засобах масової інформації ведеться дискусія про небезпеку застосування генетично модифікованих організмів - трансгенних рослин і тварин. Наукової основи для такої стурбованості немає, оскільки наш організм вже давно користується продуктами цих генів у вигляді пулу амінокислот і коротких фрагментів нуклеїнових кислот, що не відтворюються, як основи для власних біосинтетичних процесів. Кожна трансгенна рослина, що рекомендується до застосування, проходить жорстку перевірку по багатьом параметрам з випробуванням на тваринах і лише після цього отримує ліцензію.

Приведемо дві, до кінця ще не розв'язані, проблеми пов'язані з використанням трансгенних рослин. Перша - витік трансгенів до інших диких видів-родичів через спонтанну гібридизацію. Хоча цей процес маловірогідний, він не виключається. Можна представити наслідки, коли гени гербіцидостійкості раптом опиняться в бур'янах.

Оскільки трансгенні рослини стійкі до хвороб і шкідників, то не виключається підвищення стійкості самих збудників хвороб і тих же комах-шкідників, тобто їх коеволуція.

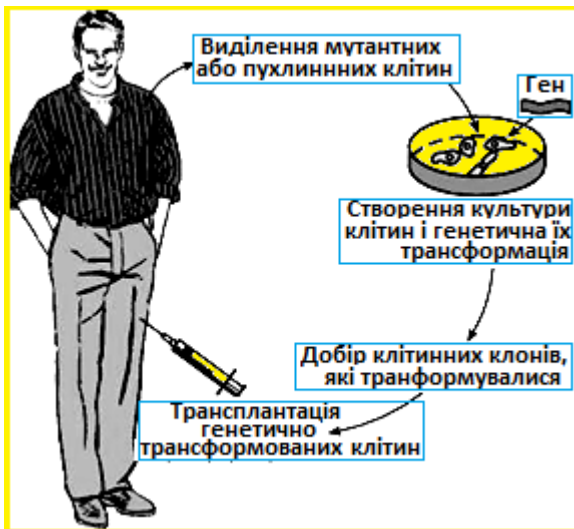
Генна терапія. Генна терапія – це генно-інженерна технологія направлена на лікування спадкових, мультифакторіальних та неспадкових захворювань, що здійснюється шляхом трансфекції в клітини пацієнта інших генів. Метою терапії є усунення генетичних дефектів або додавання клітинам нових функцій.

Генна терапія людини обмежується дослідженнями в соматичних клітинах і тканинах. Генетичні маніпуляції із статевими і зародковими клітинами можуть дати зовсім несподіваний і небажаний ефект. Застосовувані в даний час методики генної терапії ефективні при лікуванні як моногенних, так і мультифакторіальних захворювань (злоякісні пухлини, деякі види серцево-судинних і вірусні захворювання).

Основні методи, які розробляються в цих напрямках: генетичне удосконалення імунних клітин; підвищення імунореактивності пухлини; блок експресії онкогенів; захист здорових клітин від хіміотерапії; введення генів-супресорів пухлини; виробництво протипухлинних речовин здоровими клітинами; продукція протипухлинних вакцин; локальне відтворення нормальних тканин за допомогою антиоксидантів.

З 1997 року почалися клінічні випробування методів генної терапії (більше 2000 пацієнтів взяли участь в їх реалізації). 80% таких проектів стосуються лікування онкологічних захворювань, а також ВІЛ-інфекції (СНІДУ). Разом з тим в генотерапії необхідно враховувати, що не всі наслідки маніпулювання генами або рекомбінантними ДНК *in vivo* вивчені достатньо. Тому у країнах з розвиненим рівнем молекулярно-генетичних досягнень медичні протоколи з використанням генно-інженерних конструкцій ДНК обов'язково підлягають експертизі у відповідних комітетах і комісіях.

Принципи генної терапії. Залежно від способу введення екзогенної ДНК в геном пацієнта генна терапія може проводитися або в культурі клітин (*ex vivo*), або безпосередньо в організмі (*in vivo*). Клітинна генна терапія або терапія *ex vivo* припускає виділення і



культивування специфічних типів клітин пацієнта, введення в них чужорідних генів, відбір трансфецированих клітин і реінфузію їх тому ж пацієнтові (рис.13.8). В даний час в більшості допущених до клінічних випробувань програм генної терапії використовується саме цей підхід.

Рис.13.8. Генотерапія способом ex vivo. Клітини пацієнта, культивують in vitro, проводять генетичну трансформацію, відбирають потрібні клони клітин і трансплантують в організм пацієнта. У разі пухлин клітини трансформують генами, що підсилюють імунну відповідь організму, опромінюють і трансплантують підшкірно тому ж пацієнтові.

Генна терапія *in vivo* заснована на прямому введенні клонів певним чином упакованих послідовностей ДНК в специфічні тканини хворого. Особливо перспективним для лікування генних хвороб *in vivo* є введення генів за допомогою аерозольних або ін'єкційних вакцин. Аерозольна генотерапія розробляється для лікування пульмонологічних захворювань (муковісцидозу, раку легенів).

Розробці програми генної терапії передують ретельний аналіз тканеспецифічної експресії відповідного гена, ідентифікація первинного біохімічного дефекту, дослідження структури, функції і внутрішньоклітинного розподілу його білкового продукту, а також біохімічний аналіз патологічного процесу. Всі ці дані враховуються при складанні певного медичного протоколу. Апробацію генокорекції спадкового захворювання проводять на первинних культурах клітин хворого, в яких у нормі функціонально-активний даний ген. На цих клітинних моделях оцінюють ефективність обраної системи перенесення екзогенної ДНК, визначають експресію введеної генетичної конструкції, аналізують її взаємодію з геномом, відпрацьовують способи корекції на біохімічному рівні.

Використовуючи культури клітин, можна розробити систему адресної доставки рекомбінантних ДНК, проте перевірка надійності роботи цієї системи може бути здійснена тільки на рівні цілого організму. Тому така увага в програмах по генній терапії приділяється експериментам *in vivo* на природних або штучно отриманих моделях відповідних спадкових хвороб у тварин. Успішна корекція генетичних дефектів у таких тварин і відсутність небажаних побічних ефектів генної терапії є найважливішою передумовою для дозволу клінічних випробувань.

Таким чином, стандартна схема генокорекції спадкового дефекту включає серію послідовних етапів. Вона починається створенням повноцінно працюючої (експресуючої) генетичної конструкції, що містить структурну і регуляторну частини гена. На наступному етапі вирішується проблема вектора, який забезпечить ефективну, а по можливості і адресну доставку гена в клітини-мішені. Потім проводиться трансфекція в клітини-мішені, оцінюється ефективність трансфекції, ступінь корегованості первинного біохімічного дефекту в умовах клітинних культур (*in vitro*) і, що особливо важливе, *in vivo* на тваринах — біологічних моделях. Тільки після цього можна приступати до програми клінічних випробувань.

Генна терапія ex vivo і in vivo. Вперше генна терапія була проведена в травні 1989 року з метою генетичної маркіровки пухлино-інфільтруючих лімфоцитів у разі прогресуючої меланоми. Першим моногенним спадковим захворюванням, відносно якого були застосована генна терапія, виявився спадковий імунодефіцит (1:100000), обумовлений

мутацією в гені аденозиндезамінази (ADA). В вересні 1990 року в Бетесде (США) чотирилітній дівчинці з цим захворюванням, були пересажені її власні лімфоцити, трансдуковані *ex vivo* геном ADA (ген ADA + ген нео + ретровірусний вектор).

Схема генотерапевтичного протоколу АДА-недостатності була наступною (Blease et al., 1995). Методом лейкофореза у хворих виділяли мононуклеарні клітини. Потім їх культивували в умовах, що сприяють проліферації Т-лімфоцитів. Культуру Т-лімфоцитів обробляли *ex vivo* ретровірусним вектором, що мав нормальний ген. Через декілька днів проводили реінфузію модифікованих Т-лімфоцитів в кров хворого. Цю процедуру повторювали кожні декілька місяців. Імунна функція хворого за цей час значно покращилася, а дослідження лімфоцитів показало, що приблизно чверть Т-лімфоцитів є генно-інженерними. Необхідність повторних надходжень модифікованих клітин пояснюється тим, що Т-лімфоцити – зрілі диференційовані клітини, час життя яких в організмі невеликий.

Триваліший ефект можна отримати пересаджуванням трансдукуючих гемапоетичних стовбурових клітин кісткового мозку - попередників клітин крові усіх типів. Такі експерименти у разі АДА-недостатності також були успішно проведені. Метод генотерапевтичної корекції зараз використовується при лікуванні більш ніж двох десятків спадкових захворювань.

Наприклад, у випадках із захворюваннями серця, обумовленими генетичними причинами, ефективним заходом є так звана генна терапія *in vivo*, коли зміни генів здійснюються безпосередньо в організмі пацієнта. Для того, щоб виконати цю процедуру, генетична інформація доставляється безпосередньо в клітину за допомогою вектора – молекули нуклеїнової кислоти, що використовується в генній інженерії для передачі генетичного матеріалу. В більшості випадків, для того, щоб здійснити цю передачу, дослідники використовують віруси безпечні для здоров'я і життя.

Сімейна гіперхолістеринемія (СГХ) – аутосомно-рецесивне захворювання, що зустрічається в популяції з досить високою частотою (Фогель, Мотульски, 1990). Хвороба викликається різними мутаціями в гені рецептора ліпопротеїнів низької щільності (LDLR). Дефектний рецептор клітин печінки хворих не здатний зв'язувати ліпопротеїнові частки, що призводить до накопичення холестерину в крові, його відкладенню в судинній стінці, ранньому атеросклерозу і інфаркту міокарду. При СГХ клітинами-мішенями для генно-інженерної модифікації є клітини печінки (гепатоцити). Їх трансдукцію проводять *ex vivo*, використовуючи рекомбінантний ретровірус, що несе нормальний ген LDLR. Клінічний протокол генної терапії СГХ (Wilson et al., 1992, Grossman et al., 1994) представлений на рис. 13.9.

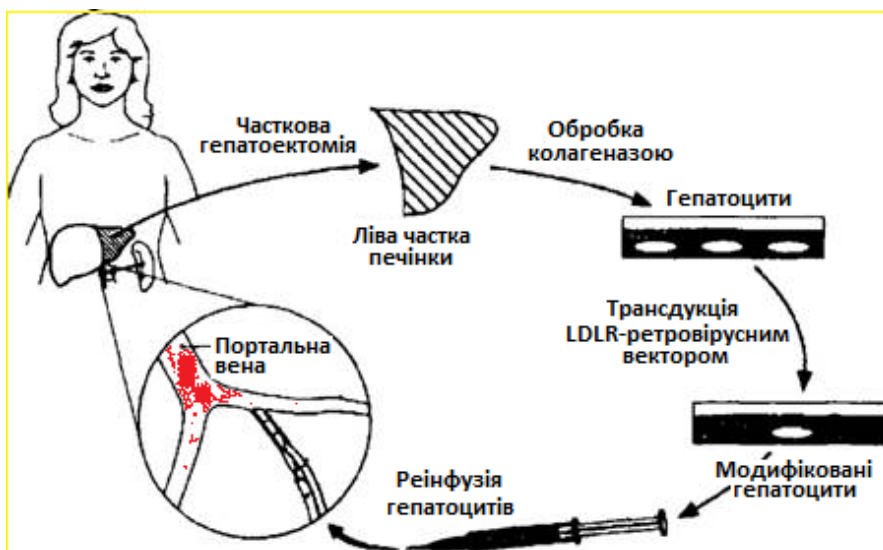


Рис.13.9. Стратегія терапії сімейної гіперхолістеринемії *ex vivo* (Grossmann et al. 1994)

Хворому проводили часткову гепатоектомію - видаляли лівий латеральний сегмент печінки (внаслідок регенерації через декілька тижнів її розміри повністю відновлюються). Видалений сегмент

(≈250 г, що відповідає близько 15% загальної ваги печінки) обробляли колагеназою, щоб

звільнити гепатоцити. Отримані таким чином приблизно 3,2 мільярда живих клітин культивували протягом двох діб. Потім в середовище додавали рекомбінантний ретровірус, що мав ген LDLR, промотор гена бета-актина курки і енхансер з генома цитомегаловіруса (регуляторні ділянки, що забезпечували експресію трансгенного LDLR).

Інкубацію з вектором проводили протягом 12-18 годин, після чого $\approx 20\%$ клітин виявилися транс-кованими. Через 3 дні після гепатоектомії проводили реінфузію модифікованих гепатоцитів в печінку хворого через комірну вену. Через 4 місяці хворому провели біопсію печінки і гібридизацію *in situ* з РНК-зондом, специфічним до рекомбінантного гена LDLR, і показали, що в середньому 1 з 1000-10000 гепатоцитів експресує нормальний рецептор. Через півтора року після початку генотерапії рівень ліпопротеїнів низької щільності в крові хворого знизився на 17%, що свідчило про активність LDLR, а співвідношення ліпопротеїнів низької щільності до ліпопротеїнів високої щільності (критерій атерогенності) знизився вдвічі і залишився стабільним протягом усього періоду лікування.

Вірусні і невірусні вектори в генотерапії. Вирішальною умовою успішної генотерапії є забезпечення ефективної трансфекції (у широкому сенсі) або трансдукції (при використанні вірусних векторів) чужорідного гена в клітини-мішені, забезпечення тривалого функціонування його в цих клітинах і створення умов для повноцінної роботи гена (його експресії). Трансфекція може проводитися з використанням чистої («голої» - naked) ДНК, легованої (вбудованої) у відповідну плазмиду, або комплексної ДНК (плазмідна ДНК, сполучена з солями, білками (н., трансферіном), органічними полімерами (DEAE-декстран, полілізин, ліпосомами чи частинками золота), або ДНК у складі вірусних частинок, заздалегідь позбавлених здатності до реплікації).

Методи доставки чужорідних генів поділяють на хімічні, фізичні і біологічні. Вірусні вектори або генетичні конструкції з вірусними послідовностями, здатні до активної трансдукції і до тривалої експресії чужорідних генів. Більшість технологій з генотерапії використовують вірусну трансдукцію або технології засновані на використанні ретровірусних векторів.

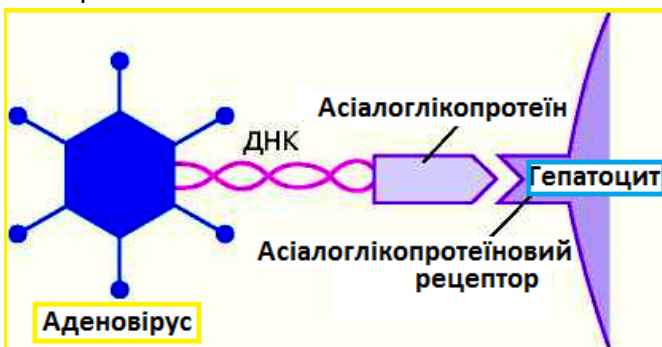


Рис. 13.10. Рецептор-опосередкована інтеграція гена. ДНК-послідовність потрібного гена з'єднується з певним мембранним рецептором (н., сіалоглікопротеїном клітин печінки), а також з аденовірусом, що забезпечує проникнення генної конструкції в ядро клітини. Такий комбінований вектор забезпечує ефективну адресну доставку гена в клітини печінки.

В багатьох лабораторіях світу вдосконалюються вже відомі і випробувані *in vivo* і *in vitro* векторні системи та створюються нові. Вже практично вирішена проблема доставки чужорідної ДНК *in vitro*, а її доставка в клітини-мішені різних тканин *in vivo* успішно вирішується шляхом створення конструкцій, що мають рецепторні білки і антигени, специфічні для тканин. Серйозного доопрацювання потребують такі властивості векторних систем, як стабільність інтеграції, регуляція експресії, безпека.

Інтеграція в геном досягалася шляхом використання ретровірусних або аденоасоційованих векторів. Стабільність інтеграції можна підвищити шляхом вдосконалення генних конструкцій по типу рецептор-опосередкованих систем (рис.13.10) або шляхом створення досить стабільних епісомних векторів – ДНК-структур, здатних до тривалого існування усередині ядер.

Перспективи і обмеження генної терапії.

Застосування генної терапії у лікуванні є достатньо складним процесом та включає ряд не вирішених проблем.

Широке використання вірусних генних конструкцій, як найбільш ефективних та таких, що дають швидкий ефект лікування, призводить до виникнення сильної імунної відповіді, неопластичної трансформації та знижує позитивний ефект генотерапії.

Проблемою є інтегрування терапевтичних генів у геном людини, що робить необхідним застосування трансфузії багато разів. Моногенні хвороби - ідеальні для лікування з використанням генної терапії. Але більшість хвороб - полігенні (зумовлені мутаціями кількох генів), що створює проблеми для встановлення впливу різних генів на хворобу та їх діагностику, а також створення працюючих генних конструкцій.

Проблемою розвитку генної терапії є надзвичайно великі фінансові витрати на проведення молекулярно-генетичних досліджень, діагностики та самої генної терапії. Результати молекулярно-генетичних досліджень, стосовно структури генів людини та їх діагностики запатентовані, а це вимагає великих фінансових витрат на отримання інформації та тестів.

Генно-інженерні технології дозволяють активно маніпулювати з генами і забезпечувати адресну доставку нових блоків генетичної інформації в задані ділянки генома, що створює перспективи для ефективного лікування різної патології.

На сучасному етапі розвитку теоретично і практично можливі втручання з метою модифікації і поліпшення деяких фізичних, психічних і інтелектуальних характеристик людини, але ми ще не можемо прогнозувати, які в майбутньому виникнуть проблеми після таких втручань в геном людини.

В генній інженерії використовують три головні шляхи, які відрізняються природою клітин-мішеней: соматичну генотерапію, при якій трансгени вводять в соматичні клітини і вони не потрапляють в статеві клітини; фетальну генотерапію, при якій чужорідну ДНК вводять в зиготу або ембріон на ранній стадії розвитку (при цьому очікується, що введений трансген потрапить в усі клітини реципієнта та забезпечить передачу інформації наступним поколінням) та *активацію власних генів організму* з метою пригнічення дії мутантного гена. Наприклад, використання гідроксисечовини для активації синтезу гемоглобіну F у хворих на серпоподібно-клітинну анемію і таласемію.

Фетальна генотерапія може бути перспективною для профілактики спадкових хвороб, але залишаються невирішеними методи точного введення гена в геном зиготи або клітини ембріону. Процес введення трансгена ще не достатньо точний. Усунення причини спадкової патології достатньо складне «маніпулювання» з генетичною інформацією в зиготі. Розробляються різні підходи: введення в геном шляхом трансфекції, зворотна мутація патологічного алеля, розблокування нормального гена, репресія мутантного гена та ін.

За останні роки вчені відкрили і досліджували новий механізм імунітету у бактерій, який назвали CRISPR. Перша робота з результатами досліджень була надрукована ще в 1987 році. Значний крок був зроблений коли один із варіантів цієї системи адаптували до клітин вищих організмів.

Механізм дії системи CRISPR/Cas полягає в тому, що ця ферментативна система розрізає ДНК і створює дволанцюговий розрив. Причому молекула ДНК розрізається тільки в певній точці, що програмується маленькою молекулою РНК, яка вводиться в клітину.

На відміну від традиційної генної інженерії, яка використовує ферменти-рестриктази, здатні впізнавати *in vitro* певні послідовності ДНК і робити в ній дволанцюгові розриви, CRISPR/Cas9 дозволяє робити ці генно-інженерні маніпуляції в живій клітині. Генетичний матеріал живої клітини змінюється без маніпуляцій на виділеній ДНК.

Це відкриває абсолютно нові перспективи і дозволяє говорити про реальну генну терапію, яка стає вже не футурологічним домислом, а дійсністю. Одночасно із застосуванням CRISPR до маніпуляції з геномом почали використовувати методи ZFNs і TALENs, які до цього моменту головним чином розроблялися в біотехнологічній індустрії. Зараз розроблений

цілий арсенал методів, за допомогою яких у тварин (у мишей і навіть мавп) вже проводиться генетична терапія хвороб.

В майбутньому генетична терапія буде проводитися методом введення CRISPR-системи, яка розрізає ДНК. Коротка молекула РНК направляє цей розрізаючий механізм в потрібне місце в геномі. Ці "ножиці" вирізають мутантний ген, і на його місце вбудовується нормальний. Така генотерапія вже проводиться в експерименті на тваринах і вони видужують.

Наступний етап – довести ці методи до застосування в медицині. Терміни виконання цих завдань залежать від багатьох обставин. Конкретне застосування на людях може відбутися через декілька років, в першу чергу ці методи застосовуватимуть для лікування летальних хвороб. У найближчій перспективі генотерапія залежатиме від тяжкості захворювання. Це не може бути таким же поширеним явищем, як пластична хірургія. Ми втручаємося в роботу клітини, і тут завжди будуть побічні ефекти. Клітина може перетворитися на ракову.

Система CRISPR/Cas застосовується не лише для лікування генетичних хвороб. Це дає абсолютно новий імпульс в синтетичній і системній біології, в тій області, де люди модифікують геном, щоб змусити клітину робити щось нове, чого вона до цього не вміла робити (Максим Франк-Каменецкий, доктор фізико-математичних наук, професор факультету біомедичної інженерії університету Бостона, 2014).

Інше медичне застосування CRISPR – створення тваринних моделей для медичних цілей. Це створення моделей тварин, які наділені властивостями, схожими на властивості хворих людей. За допомогою тваринних моделей можна вивчати хворобу і розробляти способи її лікування. З тваринами працювати набагато простіше, ніж з людьми: знімається велика кількість заборон. Створювати такі тваринні моделі з модифікованим геномом до того, як були розроблені методи з використанням CRISPR, було дуже важко, дорого та вимагало участі багатьох фахівців вищої кваліфікації.

Первинна розшифровка генома людини завершена, особливо на рівні секвенування нормальних і патологічних алелей. Можна сподіватися, що для більшості спадкових хвороб мутації будуть секвеновані найближчими роками. Інтенсивно розвивається функціональна геноміка, завдяки якій будуть відомі міжгенні взаємодії.

Будь-які гени людини неважко отримувати в чистому вигляді на основі хімічного або біологічного синтезу. Цікаво відзначити, що ген гемоглобіну людини був одним з перших штучно отриманих генів.

Розроблені методи включення генів в геном людини з різними векторами або в чистому вигляді шляхом трансфекції.

Методи направленої хімічної мутагенезу дозволяють індукувати специфічні мутації в певному локусі (отримання зворотних мутацій – від патологічного алеля до нормального).

В експериментах отримані докази ефективною трансфекції окремих генів у різних тваринах на стадії зиготи (дрозофіла, миша, коза, свиня і ін.). Введені гени функціонують в організмі-реципієнті і передаються у спадок. Наприклад, ген гормону росту щурів, введений в геном зигот мишей, функціонує у мишей, які народилися. Такі трансгенні миші значно більші за розмірами і масою в порівнянні з нормальними.

Генно-інженерна профілактика спадкових хвороб на рівні зигот розроблена поки слабо, хоча вибір способів синтезу генів і способів їх «доставки» в клітини достатньо широкий. Вирішення питань трансгенезу у людини сьогодні упирається не тільки в генно-інженерні складності, але і в етичні проблеми.

Вчені створюють штучні комбінації нових геномів не еволюційним шляхом. Ці геноми стануть часткою в генофонді людства. Яка буде їх доля з генетичної і соціальної точки зору? Чи будуть вони функціонувати як нормальні геноми? Чи готове суспільство перейняти на

себе наслідки невдалих результатів? Сьогодні відповіді на ці питання важко, а без відповіді на них не можна починати клінічні випробування. Адже мова йде про безповоротні втручання в геном людини. Без об'єктивної оцінки еволюційних наслідків генної інженерії не можна застосовувати ці методи на людині (навіть і з медичними цілями на стадії зиготи). Генетика людини ще далека від повного розуміння всіх особливостей функціонування генома. Нез'ясовано, як геном працюватиме після введення в нього додаткової генетичної інформації, як він поводитиметься після мейозу, під час якого відбувається редукція числа хромосом, при поєднанні з іншим геномом при утворенні зиготи.

Невирішені питання генної інженерії людини дало підставу фахівцям в області біомедичної етики на міжнародному рівні, включаючи ВООЗ, ЮНЕСКО, Раду Європи, тимчасово утриматися від проведення експериментів, а тим більше клінічних випробувань трансгенезом зародкових клітин.

Сучасний рівень знань не дозволяє проводити корекцію генних дефектів на рівні статевих клітин і клітин ранніх доімплантаційних зародків людини у зв'язку з реальною небезпекою засмічення генофонду небажаними штучними генними конструкціями або внесенням мутацій з непередбачуваними наслідками для майбутнього людства. Разом з тим в науковій літературі все частіше і наполегливіше лунають заклики до відновлення дискусії про доцільність генокорекції зародкових і статевих клітин людини.

Відносно застосування і розвитку генної терапії виникають деякі проблеми, які мають бути вирішені генетиками. Чи можлива генотерапія, яка забезпечить повноцінну генокорекцію без загрози для нащадків?

Генотерапія серцево-судинної патології займає друге місце після онкологічних захворювань, не дивлячись на значні зусилля генотерапії при серцево-судинній патології успіхи незначні. В основному за нездатність забезпечити доставку трансгенів в конкретні ділянки органів, тканин, та в адекватній терапевтичній дозі. Актуальним є пошук потенціальних терапевтичних генів для експресії в клітинах судин і міокарду та вибір ефективних векторних систем, які не мають побічних ефектів, здатних забезпечити ефективний вплив на експресію цих генів. Важливою перспективою є також розробка механічних або нанотехнологічних засобів, що дадуть можливість з меншими пошкодженнями доставити вектор до клітин-мішеней і попередити надходження генетичного матеріалу в системний кровоток. Перспективним є використання цільової доставки стовбурових клітин і клітин-попередників. Цей метод дає можливість використовувати як імплантуємий матеріал аутологічні клітини, що можуть трансдукуватися *in situ* скафолдімобілізованими екзогенними векторами (M. Hedman et al.). Відповідно даної концепції, подальший прогрес в генній терапії може бути досягнутий у разі поєднання методів доставки трансгенів і тканинної інженерії.

Використання генної терапії має багато плюсів і в деяких випадках є єдиним шансом на нормальне життя для хворих людей. Тим не менш, ця область науки до кінця не вивчена. Залишається невирішеною низка питань. Існують міжнародні заборони на експерименти на статевих клітинах і доімплантаційних зародкових клітинах людини. Це зроблено з метою запобігання небажаних генних конструкцій і мутацій.

Таким чином, розвиток генної інженерії та генотерапії, пропонують не тільки реальні шляхи лікування тяжких спадкових і неспадкових захворювань людини, але ставить перед людством нові проблеми, вирішити які необхідно в найближчий час.

Генні вакцини (ДНК-вакцина). Вакцини, які сьогодні використовуються можна розділити залежно від методів їх отримання на: живі аттенуировані вакцини; інактивовані вакцини; вакцини, що містять очищені компоненти мікроорганізмів; рекомбінантні вакцини, які містять компоненти мікроорганізмів, отриманих методом генної інженерії.

Для створення нових живих ослаблених вакцин застосовують технологію

рекомбінантної ДНК, при якій направлено мутують гени, що кодують вірулентні протеїни збудника захворювання. Технологія отримання живих рекомбінантних вакцин заснована на вбудовуванні генів, що кодують імуногенні протеїни, в живі непатогенні віруси або бактерії (вектори), які потім вводять людині.

Розробляються вакцини, які засновані на введенні «голої» молекули ДНК (трансформації). Експерименти довели, що введення чужорідної ДНК в організм тварин сприяє формуванню імунітету. Принцип застосування ДНК-вакцини полягає в тому, що в організм пацієнта вводять молекулу ДНК, що містить гени, які кодують імуногенні білки патогенного мікроорганізму («вакцини з нуклеїнових кислот», «генні вакцини»). Такі «генні вакцини» підрозділяють відповідно на ДНК - і РНК-вакцини.

При отриманні ДНК-вакцин ген, що кодує утворення імуногенного вакцинуючого протеїну мікроорганізму, вбудовують в бактеріальну плазмиду. Окрім гена, що кодує протеїн, в плазмиду вбудовують генетичні елементи, які необхідні для експресії цього гена в клітинах еукаріотів. Створюють бактеріальну культуру (для збільшення кількості копій плазмід), виділяють з бактерій плазмідну ДНК, очищають від інших молекул ДНК і домішок. Така очищена ДНК і є вакцина.

Введення ДНК-вакцини забезпечує синтез чужорідних протеїнів в організмі людини, що призводить до вироблення імунітету проти відповідного збудника. Плазмиди (ДНК-вакцини) не вбудовуються в ДНК хромосом людини. ДНК-вакцину можна вводити внутрішньом'язово або внутрішньошкірно.

Інший метод введення – використання генного пістолета. ДНК фіксують на мікроскопічних золотих гранулах, а потім за допомогою пристрою «вистрілюють» стислим гелієм безпосередньо всередину тканини. Спосіб введення ліків за допомогою струменя стислого гелію використовують і для розробки нових способів доставки лікарських засобів (з цією метою оптимізують розміри лікарської речовини і їх щільність для досягнення необхідної глибини проникнення у відповідну тканину організму).

Метод використання ДНК-вакцин вимагає невеликої кількості ДНК для імунізації (≤ 1 нанограм, а також за допомогою генного пістолета можна одноразово ввести десятки, сотні видів ДНК-вакцин і сформувати імунітет відносно різноманітних збудників.

Випадковий експеримент, який був проведений в лабораторії «Vical Inc.» у 1989р., показав, що введення «голої» вірусної ДНК мишам приводить до продукції великої кількості вірусних білків. Після цього фірма запатентувала метод прямого введення «голої» ДНК. У 1991р. «Vical Inc.» приступила до розробки ДНК-вакцин для профілактики інфекційних захворювань. Через 2 роки в журналі «Science» опублікували результати цих досліджень, що підтвердили ефективність застосування ДНК-вакцини проти грипу у мишей. Зараз компанія «Vical Inc.» розробляє і продає терапевтичні і профілактичні ДНК-вакцини проти ВІЧ/СНІДУ, туберкульозу, гепатиту В, гепатиту С, герпесу і папіломи людини.

Компанія також вдосконалює методи генної терапії (на основі технології «голої» ДНК) для створення вакцин і лікування хворих з деякими злоякісними новоутвореннями.

Широке застосування ДНК-вакцин можливе при умові, що вчені отримають достатню кількість даних клінічних досліджень, які будуть переконливо свідчити про ефективність і безпеку ДНК-вакцин.

Генотерапія в онкології.

У 2013 р. журнал «Science» назвав головним проривом в науковій медицині імунотерапію раку, а журнал «Nature» особливо відмітив успіхи досліджень в області генотерапії.

Одночасно з розвитком досліджень в області генокорекції спадкових дефектів набули успіху пошуки методів терапевтичного використання кодуючих послідовностей ДНК для лікування неспадкових захворювань і, головним чином, злоякісних пухлин і вірусних

інфекцій. Дослідження в цих напрямках проводяться особливо інтенсивно і значно перевершує дослідження та застосування генотерапії інших напрямків. Наприклад, у світі частка клінічних протоколів з генотерапії онкозахворювань складає 64,5%, тоді як генна терапія серцево-судинних захворювань складає 8,5%, моногенних захворювань – 8,3%.

Найважливіший елемент медицини 21 століття - генна терапія - розвивається у напрямку лікування як спадкових захворювань, так і таких набутих захворювань, як рак, атеросклероз або СНІД. Основні стратегії генної терапії дві - *ex vivo* і *in vivo*.

Генна терапія злоякісних новоутворень вже розпочата, хоча на її шляху багато труднощів, обумовлених необхідністю забезпечення селективності, специфічності, чутливості і безпеки перенесення генів. В даний час розвиваються наступні напрямки генної терапії раку:

1. розробка векторних систем, які дозволять без пошкоджень та побічних дій проводити генотерапію;
2. підвищення імуногенності пухлини шляхом трансфекції цитокинових генів, генів, що кодують головний комплекс гістосумісності, лімфоцитарних лігандів;
3. направлена доставка генів-регуляторів клітинного циклу клітини н., у лімфоцити, інфільтруючи пухлини;
4. точна трансфекція пухлиноспецифічних пролікарських активаторів, забезпечують контрольовану диференціальну пухлиноспецифічну транскрипцію;
5. розробка діагностики генів, які можуть забезпечувати ефективне виявлення пухлинних клітин/пухлин;
6. створення ефективних векторів, які б доставляли лікарські засоби до клітин-мішеней, н., з застосуванням нанотехнологій (РНК);
7. штучна репресія функцій генів шляхом вставки генів, що кодують комплементарну (антизмістовну) мРНК гена, що репресується (онкогени, гени лікарської резистентності);
8. створення тварин-моделей для медичних досліджень;
9. використання системи CRISPR/Cas, яка дозволяє використовувати для генних маніпуляцій живі клітини.

Одержані результати генної терапії злоякісних пухлин, які пов'язані з введенням в клітини пухлин генів інтерлейкіна-2 або фактору некрозу пухлини. Модифіковані клітини вводять підшкірно в область стегна. Через 3 тижні видаляють регіонарний лімфатичний вузол. Виділяють з нього Т-лімфоцити і культивують. Також розмножують інфільтруючи лімфоцити з пухлини. Пацієнту вводиться суміш лімфоцитів, що забезпечує імунну реакцію на пухлинні. Такий метод застосовують при лікуванні хворих злоякісною меланою, раком нирки та інших органів.

Розпочате вивчення білків ядерця людини, які можна використовувати як маркери проліферації пухлинних клітин, індикаторів ефективності протипухлинних препаратів *in vitro* і потенційних мішеней в генотерапії раку, спрямоване на розширення досліджень в області діагностики, прогностичної оцінки течії соціально значущих захворювань і сприятиме розвитку персоніфікованої медицини.

Вивчення ролі ключових ядерцевих білків людини в регуляції проліферації пухлинних клітин і їх відповіді на дію супресорів метаболізму, що викликають клітинну загибель, дозволить розробити нові підходи клініко-лабораторної діагностиці таких варіантів новоутворень, які важко діагностуються традиційними способами. Рішення цих завдань спрямоване на виявлення відмінностей (включаючи швидкість росту малігнізованих клітин і їх резистентність до використовуваних хіміотерапевтичних препаратів) між новоутвореннями однієї нозології у різних хворих. Ідентифікація ядерцевих білків - регулювальників проліферації пухлинних клітин також дозволить виявити нові мішені для генотерапії раку і створити плазмідні конструкції, які кодують білкові мішені і зможуть забезпечити їх адресну

доставку в пухлинні клітини

Одним з перспективних напрямків розвитку медицини є впровадження нанотехнологій. Одним з актуальних підходів до підвищення ефективності профілактики і терапії з застосуванням лікарських засобів є рання імунодіагностика і прогностична оцінка течії онкозахворювань різної нозології у людини і генотерапія раку.

Ядерцеві білки є унікальною протеомною біонаносистемою, яка представлена групою внутрішньоклітинних білків у ссавців і людини. Дослідження таких біонаносистем сприятиме вирішенню багатьох науково-практичних завдань, від з'ясування механізмів регуляції біогенезу рибосом в пухлинних клітинах до розробки інноваційних способів генотерапії раку і тестування протипухлинних засобів. Вивчення протеомних біонаносистем дозволить сформулювати нові підходи до персоналізації лікування онкохворих, а також забезпечити зниження вартості надання ефективної медичної допомоги.

Як видно з наведених прикладів, ера генної терапії людини вже почалася. Визначені принципи і методичні підходи до генної терапії, відібрані потенційні хвороби для такого лікування. Робота продовжується одночасно в різних країнах і в різних напрямках. Генна терапія успішно застосовується для лікування не тільки спадкових хвороб, але і злоякісних пухлин і хронічних вірусних інфекцій.

Практичні і теоретичні результати генної інженерії. В результаті інтенсивного розвитку методів генної інженерії отримані клони безлічі генів рибосомальної, транспортної і 5S РНК, гістонів, глобіну миші, кролика, людини, колагену, овальбуміну, інтерферону, інсуліну людини і інших пептидних гормонів. Це дозволило створювати штами бактерій для виробництва багатьох біологічно активних речовин, які використовуються в медицині, сільському господарстві і мікробіологічній промисловості.

Крім того, на основі численних мутантів по окремим генам, що виявляються при їх вивченні, створені високоефективні тест-системи для оцінювання мутагенної активності факторів середовища, зокрема для виявлення канцерогенних чинників.

За короткий час генна інженерія суттєво вплинула на розвиток молекулярно-генетичних методів і створила можливість одержати нові фундаментальні знання про організацію і функціонування генетичного апарату.

В Україні дослідження в галузі генної терапії проводяться під керівництвом В.А.Кордюма – член-кор. НАН України, академіка АМН України, завідувача відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Зокрема розробляється генна терапія гіперхолестеринемії. Виділений ген апопротеїну-1 (апо-1) ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), створена невірусна молекулярна конструкція його транспорту в клітини печінки та підібрані умови ефективної експресії апопротеїну. Виділений ген інсуліну, створено невірусну молекулярну конструкцію, що забезпечує його транспорт в клітини-мішені та підібрані умови ефективної експресії гена інсуліну. Спільно з науковцями Ізраїлю розробляються підходи генної терапії інсулінозалежного цукрового діабету.

Клонування організмів і клітин

Клітинна інженерія. Поняття про клонування. Природні і штучні клони. Історія клонування організмів. Терапевтичне клонування і його перспективи в медицині. Гематологічне клонування Біологічні і етичні проблеми клонування.

Клітинна інженерія. Поняття про клонування.

Клітинна інженерія — сукупність методів конструювання нових клітин на основі їх культивування, гібридизації та реконструкції. За допомогою клітинної інженерії вдається поєднати геноми різних видів (навіть тих, які належать до різних царств). Клітинну інженерію використовують для вирішення багатьох теоретичних та практичних проблем біології, промислової мікробіології, біотехнології (н., використання гібридів для отримання

моноклональних антитіл, які використовують у медицині, науці і виробництві).

Клітинна інженерія формувалася, як розділ сучасної молекулярної біології – генетичної інженерії, який вивчає процес і наслідки перенесення генетичного матеріалу від однієї клітини до другої. Клітинна інженерія розділяється на геномну (повний перенос генома) та хромосомну (перенос великих груп генів або хромосом) інженерію.

Завдяки бурхливому розвитку та значній кількості досліджень, які проводяться з використанням методів клітинної інженерії, вона трансформувалася в окрему галузь біотехнології і біологічної науки в цілому. Клітинна інженерія виділилася як самостійна галузь біологічних та медичних наук (Сассон, 1987). Історично клітинна інженерія пройшла наступні етапи: 1) розробка методів штучного злиття клітин, що ростуть в культурі; 2) отримання реконструйованих клітин шляхом злиття – об'єднання ядра та цитоплазми від різних клітин у раніше невідомих комбінаціях; 3) ефективна трансфекція соматичних та статевих клітин.

У завдання клітинної інженерії входить: отримання соматичних клітин різних видів, створення культурних клітин (тканин) для отримання цінних речовин; клонування організмів – перспективний напрям клітинної інженерії; гібридизація соматичних клітин – дає можливість створювати препарати, що підвищують стійкість організму проти різних інфекцій.

Основним методом клітинної інженерії є гібридизація клітин мікроорганізмів та соматичних клітин тварин і рослин. Розрізняють наступні гібридні клітини:

1) Типові гібридні клітини: гетерокаріон – це гібридна клітина, яка містить у своїй цитоплазмі два або декілька різних чи однакових ядер. Гетерокаріони не діляться; синкаріон – це гібридна клітина, в якій пройшло об'єднання хромосом різних клітин в одне ядро. Синкаріон часто дає початок проліферуючому клітинному клону.

2) Особливі типи гібридних клітин: а) гібридна клітина, що включає в себе каріопласт (ядро, оточене тонким шаром цитоплазми) + цитопласт (без'ядерна цитоплазма);

б) цибрид – гібридна клітина, що включає в себе цілу клітину + цитопласт іншої клітини; в) каріобрид – гібридна клітина, що включає в себе цілу клітину + каріопласт іншої клітини (Герасименко, 1989).

Гібридизація проводиться декількома способами з використанням фузогенних агентів різного походження: фізичного (змінне електричне або магнітне поле), хімічного (катіони, поліетиленгліколь), біологічного (віруси). Існують такі методи гібридизації клітин:

1. Використання інактивованого УФ–випромінюванням вірусу Сендай, який відноситься до групи вірусів парагрипу. Цей метод вже майже не використовується (лише у тих випадках, коли клітини іншими методами не зливаються – н., при роботі з ядерними еритроцитами птахів).

2. Основний метод – використання поліетиленгліколю (ПЕГ). Це стандартний спосіб, який використовується при злитті клітин тварин та рослин, між собою та один з одним, а також при отриманні гібридом.

3. Злиття клітин з використанням лазерного та нейтронного опромінення.

4. Електрозлиття – на клітини попередньо зближені між собою, впливають електричним полем; спочатку відбувається об'єднання мембран, потім об'єднуються цитоплазми і формується гібридна клітина.

Розробляються та впроваджуються також нові методи гібридизації клітин.

1. Авдин-біоносовий метод. Клітини одного типу (міелома) з'єднують з авдином, клітини іншого типу (імунні лімфоцити) безпосередньо або через антитіла з'єднують з біотином (вітамін Н). Такі мічені клітини у суспензії з'єднуються попарно і в результаті дії електричного поля, в яке їх поміщають, утворюються гібридомні клітини.

2. Метод проточної цитометрії. Цей метод застосовують:

а) для виділення клітин, що знаходяться на певній стадії клітинного циклу та їх синхронізації. Отримані таким шляхом клони життєздатні і дають початок клітинним клонам;

б) для відбору (селекції гібридних клітин). Не всі клітини, що піддаються різним впливам для злиття, зливаються. Для видалення клітин, що не злилися, суміш гібридних клітин і клітин, що не злилися, вирощують на селективному середовищі, де виживають лише гібридні клітини (Герасименко, 1989).

Рослинні і бактеріальні клітини перед злиттям перетворюють в протопласти (клітини, які не мають зовнішньої клітинної оболонки). Потім проводиться скринінг отриманих гібридних клітин, який дозволяє відібрати ті, які об'єднали геноми чи фрагменти ДНК батьківських клітин. У разі неповного злиття клітин (тобто клітина-реципієнт отримує окремі ділянки ядерного генетичного матеріалу або частини клітини-донора (органели)) виходять асиметричні гібриди. Це розширює можливості отримання нових сортів сільськогосподарських рослин, для створення яких раніше використовувалися методи класичної селекції.

Досягнення клітинної інженерії:

- отримання довгоживучих гібридних клітин, у тому числі, клонів, що розмножуються;
- встановлення правил комплементарності генів у гібридних соматичних клітинах;
- формулювання поняття про гени “розкоші” і гени “необхідності” та встановлення методик пригнічення функцій генів “розкоші” у гібридах;
- встановлення факту вибіркової втрати хромосом (сегрегації) у міжвидових гібридах та розробка підходів координування даного процесу;
- реконструкція клітин, створення реконструйованих клітин (гібридів та каріогібридів);
- отримання фактів про позитивний та негативний контроль проліферації гібридних клітин;
- отримання гібридних клітин між віддаленими організмами різних видів, класів та царств (наприклад, гібридів клітин рослин і тварин; гібридів тварин та дріжджів).

Першим практичним застосуванням досягнень клітинної інженерії стала розробка гібридомної технології та отримання з її допомогою моноклональних антитіл. Другим практичним застосуванням досягнень клітинної інженерії є доказ можливості направленої генетичної трансформації соматичних та статевих клітин тварин і рослин та отримання таким шляхом клітин-продуцентів заданих білкових продуктів.

Гібридома — це результат злиття злаякісних клітин та клітин імунної системи, які секретують імуноглобуліни. Гібридома має ряд селективних переваг: тривале розмноження в культурі; здатність синтезувати моноклональні антитіла. Мілетейн та Келер (лабораторія молекулярної біології Медичної науково-дослідної ради Кембриджського університету) першими запропонували спосіб отримання гібридом. Келер запропонував злити мієломну клітину з лімфоцитами із популяції, яка б мала попередній контакт з певним антигеном. За його розрахунками, отримана таким чином клітина повинна синтезувати антитіла відповідної специфічності, і одночасно бути здатною до необмеженого росту, що характерно для злаякісної мієломної батьківської клітини. У 1974 р. Келеру вдалось отримати гібридому, яка здатна продукувати антитіла певної специфічності (моноклональні антитіла) внаслідок злиття клітин мієломи та лімфоцитів селезінки миші, яка була імунізована еритроцитами барана з додаванням поліетиленгліколю (Сассон, 1987).

Застосування моноклональних антитіл – один із варіантів використання культури клітин в біотехнології. За допомогою гібридомної біотехнології стає можливою регуляція імунної відповіді завдяки отриманню моноклональних антитіл заданої специфічності. Гібридоми можна зберігати у замороженому стані. У деяких інститутах та лабораторіях для наукових цілей створені гібридомні банки. Моноклональні антитіла використовують:

- 1) для ідентифікації певного гормону, вірусних або бактеріальних антигенів, антигенів групи крові та тканинних антигенів;
- 2) для визначення доз ліків;
- 3) для «впізнання» злоякісних пухлин товстої та прямої кишки, діагностики деяких форм раку щитоподібної залози, епітеліальної форми раку;
- 4) для виділення біологічно активних речовин (білків, гормонів, токсинів) із складних сумішей;
- 5) для нейтралізації дії лімфоцитів, що відповідають за відторгнення трансплантанту, а також аутоантитіл, які утворюються при аутоімунних захворюваннях (деякі форми діабету, розсіяний склероз, ревматичні хвороби);
- 6) у поєднанні з лікарськими препаратами моноклональні антитіла можуть значно посилювати ефективність дії останніх на клітини-мішені, дозволяючи при цьому уникати серйозних побічних явищ, які, як правило, супроводжують хіміотерапію раку;
- 7) для діагностики та лікування захворювань, які викликаються патогенами, перш за все мікроорганізмами та їх токсинами;
- 8) для діагностики вагітності, виявлення схильності до діабету, ревматоїдного артриту, спадкових захворювань (Герасименко, 1989).

Клонування – це процес отримання ідентичних за організацією і функціями генетично однакових нащадків за допомогою безстатевого розмноження. Термін «клон» походить від грецького слова «klon», що означає гілочка, нащадок і має відношення до вегетативного розмноження. Розмноження мікроорганізмів діленням (дробінням) можна також назвати клонуванням, як і вегетативне розмноження рослин.

Клонування – це система методів, які застосовуються для отримання клонів. З точки зору молекулярної біології – це система методів, що застосовуються для отримання клонованої ДНК, або отримання генетично ідентичного матеріалу у великому обсязі. Розрізняють клонування генів, молекулярне клонування та клонування клітин та організмів. При клонуванні генів виділяють та багато разів копіюють окремі гени клітини. Цю технологію можна використовувати для отримання великої кількості білка, що кодується цим геном. Такий підхід є цінним для фармації, бо дозволяє штучно створити необхідний для організму білок, якщо його природний синтез пошкоджений. При молекулярному клонуванні здійснюється розмноження молекул ДНК у складі вектора, який є плазмідом або фагом (DNA cloning). Цю технологію використовують з подальшим уведенням клонованої ДНК у певну клітину – хазяїна, н., у клітину кишкової палички *E.coli*, яка починає продукувати невластивий їй білок. Перше практичне використання рекомбінантної ДНК пов'язано з отриманням у промислових масштабах деяких важливих білків. У 1982 р. у США був отриманий патент на виробництво першого такого білка – інсуліну, який необхідний для мільйонів хворих на діабет. Клоновану рекомбінантну ДНК використовують також для отримання інтерферонів, вакцин та інших фармацевтичних препаратів.

Клітинне клонування – клонування, при якому відбувається виведення популяції клітин із однієї клітини. В клітинній інженерії широко використовують методи клонування. У випадку простих одноклітинних організмів, чи то бактерій, чи то дріжджів, цей процес є достатньо простим. Однак, для клонування клітин багатоклітинних організмів докладається значно більше зусиль – такі клітини розвиваються дуже повільно у звичайних умовах.

Клонування багатоклітинних організмів базується на тотипотентності клітин. Клонування тварин – це процес пересадки донорського ядра у реципієнтну клітину, активація цього гібриду до поділу, його розвиток поза організмом та трансплантація у матку тварини для подальшого розвитку. Клонування буває ембріональне та соматичне. Як клітини-реципієнти в обох випадках використовують енуклеювані ооцити (з видаленим ядерним матеріалом). При ембріональному клонуванні донорами ядер є клітини морул або

бластоцист, а при соматичному клонуванні – соматичні клітини. Соматичне клонування – більш молодий напрямок порівняно з ембріональним. Перше успішне соматичне клонування пов'язано з отриманням вівці Доллі. Була також клонована трансгенна вівця Поллі, у якої активним ген фактора згортання крові людини, при цьому продукт цього гена виділявся з молоком. При клонуванні кіз були створені генетично модифіковані тварини, у яких активно працював трансген синтезу людського тромбіну. Таким чином, клоновані трансгенні організми можуть служити живим «фармацевтичним заводом», що природним шляхом виробляє ті чи інші біологічно активні речовини (БАР), і використовуються у фармації для лікування генетично обумовлених або набутих хвороб людини.

Природні і штучні клони. У природі є випадки клонування організмів, в основі якого лежить нестатеве розмноження шляхом ділення однієї клітини або вегетативне (з групи клітин одного організму). Клонування рослин – це їх вегетативне розмноження, яке широко розповсюджено у природі та здавна використовується людиною. У рослин на відміну від тварин по мірі їх росту, в ході клітинної спеціалізації - диференціювання - клітини не втрачають тотипотентні властивості, тобто, вони не втрачають здатності реалізовувати генетичну інформацію, закладену в ядрі. Тому практично будь-яка рослинна клітина, що зберегла в процесі диференціювання своє ядро, може дати початок новому організму. Ця особливість рослинних клітин лежить в основі багатьох методів генетики і селекції.

У природі також є випадки клонування ссавців і людини, це утворення монозиготних близнюків – справжніх клонів з одним і тим же геномом, що виникають при розділенні однієї зиготи на ранній стадії бластогенезу. Монозиготні близнюки мають однакову стать і завжди схожі один на одного. Відомо також, що у ссавців, у тому числі і людини на самих ранніх стадіях розвитку (до стадії 8 бластомерів), зародок може бути без видимих негативних наслідків розділений на окремі бластомери. З них можуть розвинути особини з ідентичним генотипом – монозиготні (однойцеві) близнюки.

При вегетативному розмноженні і при клонуванні спадковий матеріал (гени, хромосоми) не розподіляються по потоках, як у разі статевого розмноження, а зберігаються у повному складі протягом багатьох поколінь. Всі організми, що входять до складу клона мають однаковий генотип і фенотипово не розрізняються між собою.

В процесі диференціювання клітини тварин, позбавляються тотипотентності, і в цьому, одна з суттєвих відмінностей їх від рослинних клітин. Саме в цьому є головна перешкода для клонування дорослих хребетних тварин.

Штучне клонування – це створення людиною ідентичних (генетично однакових з материнською) копій клітин або організмів без їх статевого розмноження.

Історія клонування організмів. Використання клонування рослин бруньками, кореневими бульбами, живцями в сільському господарстві було відомо вже понад 4-х тис. років. З 70-х років нашого століття для клонування рослин стали використовувати невеликі групи і навіть окремі соматичні клітини. Клонування тварин викликає більшу складність.

Близько ста років тому, зроблено перші кроки по клонування тварин зоологом Московського Університету Олександром Тихоміровим, який відкрив на прикладі тутового шовкопряда партеногенез: розвиток без запліднення в результаті хімічних і фізичних дій. Проте партеногенетичні ембріони шовкопряда виявилися нежиттєздатними.

Академік Б. Астауров у 30-50 роках минулого століття проводив дослідження по отриманню генетично ідентичного партеногенетичного, а потім й поліплоїдного потомства тутового шовкопряда під дією високої температури (46 °С). Таким чином, були отримані перші генетичні копії. Надалі цей метод вдосконалив академік С.Струнниковим, роботи якого по клонуванню шовкопряда здобули світову популярність.

Досліди по клонуванню хребетних розпочалися в 40-х роках 20-го століття, коли російський ембріолог професор, Г.Лопашов на жабах розробив метод пересадки ядер, на

якому засновані всі сучасні експерименти по клонуванню. Метод полягає у виділенні ядра соматичної клітини і імплантації його в енукейовану (без'ядерну) яйцеклітину. Стаття, що написана по матеріалах цих експериментів, була відправлена до журналу «Загальна біологія» (серпень 1948 року), але не була надрукована. На початку 50-х вже американські ембріологи Кінг і Бріггс провели досліди подібні до експериментів Лопашова, вони «перевідкрили» метод пересадки ядер і продемонстрували можливість клонування ембріонів хребетних в дослідах на жабах. В 1962 році Дж. Гердон (зоолог Оксфордського університету) суттєво вдосконалив методику, коли в дослідах з південноафриканськими жабами використовував як донора ядра не зародкових клітин, а цілком спеціалізовані клітини епітелію кишечника пуголовка.

В цих експериментах виживали не більше 2 % клонованого потомства, та і у тих, що вижили спостерігалися різні дефекти. Проте це був величезний крок вперед до розробки технологій штучного клонування.

Використання яйцеклітин ссавців виявилось важкою задачею, головним чином з тієї причини, що розміри приблизно в тисячу разів менше, ніж у земноводних. Але до кінця 70-х ці труднощі вдалося подолати, на початок 80-х років освоєні експерименти по клонуванню ембріонів мишей, а далі почали експериментувати на ембріонах ссавців (кроликів і великих тварин, н., копитних). Уїландсин (1986 р.) показав, що ембріони овець на стадії дробіння (16 клітин розвитку) зберігають тотипотентність. Реконструйовані яйцеклітини, що містять ядра бластомерів таких зародків, розвивалися нормально до стадії бластули в перев'язаному яйцепроводі вівці (в агаровому циліндрі), а після звільнення від агару, їх пересаджували в матку вівці – другого реципієнта – ще на 60 днів. В інших експериментах донорами служили ядра 8-клітинних зародків, з яких було отримано трьох живих ягнят, фенотип яких відповідав породі вівці-донора.

Сміт і Уїлмут (1989 р.) трансплантували ядра клітин 16-клітинного ембріона і ранньої бластули в енукейовані яйцеклітини овець. У першому випадку отримано двох живих ягнят, фенотип яких відповідав породі овець-донорів. Одне клоноване ягня з клітини ранньої бластули (з фенотипом донора) загинуло під час пологів. Автори вважали, що в ході диференціювання ембріональних клітин відбувається інактивація деяких важливих для розвитку генів і в результаті ядра бластули вже не можуть репрограмуватися в цитоплазмі яйцеклітини і забезпечити нормальний розвиток зародка. Тому, на думку авторів, донорами ядер краще використовувати 16-клітинні ембріони або культивовані *in vitro* лінії ембріональних клітин, ядра яких ще тотипотентні.

У 1993-1995 рр., група дослідників під керівництвом Уїлмута отримала клон овець – п'ять ідентичних тварин, донорами ядер яких була культура ембріональних клітин. Мікрохірургічним шляхом виділяли ембріобласт з 9-денного овечого ембріона на стадії бластули і культивували клітини *in vitro* протягом багатьох ділень (до 25). Така клітинна культура нагадувала культуру стовбурових диференційованих ембріональних клітин, але після 2-3 ділень, клітини ставали ущільненими і морфологічно схожими з епітеліальними (лінія клітин TNT4).

Далі зупиняли ділення культивованих TNT4 клітин на стадії G_0 клітинного циклу щоб донорське ядро (з клітин створеної культури TNT4) і реципієнтна цитоплазма (яйцеклітини) знаходилася на схожих стадіях клітинного циклу. Ядра клітин TNT4 пересаджували в енукейовані яйцеклітини, які знаходилися на стадії метафази. З цих клітин утворювалися реконструйовані ембріони. Їх уклали в агар і трансплантували в перев'язані яйцепроводи овець. Через шість днів ембріони вимивали з яйцепроводів овець – проміжних реципієнтів і досліджували під мікроскопом. Відбирали ті, які досягали стадії морули і бластули і пересаджували їх у матку вівці – остаточного реципієнта, де розвиток ембріона продовжувався до народження. Всього народилося п'ятеро ягнят (самок), дві загинули після

народження, третя – у віці десяти днів, а дві нормально розвивалися і досягли 9-місячного віку. Фенотипово всі ягнята були схожі на вівцю, від якої отримували початкову лінію клітин TNT4. Генетичний аналіз показав їх генетичну ідентичність.

Цей експеримент, особливо в частині створення культури ембріональних клітин, став значним досягненням у клонуванні ссавців. Наступним етапом стало клонування вівці Доллі.

В 1997 році Уїлмут зі співавторами повідомили, що в результаті використання донорського ядра клітини молочної залози вівці була отримана клональна тварина – вівця Доллі (рис. 14.1.). Ця робота повторювала попередні дослідження, але в ній вчені використовували не тільки ембріональні, але і клітини сполучної тканини (фібробласти) плоду, і клітини молочної залози дорослої вівці. Клітини молочної залози отримували від 6-річної вівці (порода Фіни Дорсет), що перебували на останньому триместрі вагітності. Всі клітинні культури мали по 54 хромосоми, що характерно для геному овець. Ембріональні клітини використовували як донорів ядер на 7-9 пасажах культивування, фібробластоподібні клітини плода після 4-6 ділень і клітини молочної залози – між 3-6 діленнями. Ділення клітин в культурах зупиняли на стадії G₀ і ядра клітин пересаджували в енуклеїзовані ооцити (яйцеклітини) на стадії метафази-2 овогенезу. Більшість реконструйованих ембріонів спочатку культивували *in vivo* (в перев'язаному яйцепроводі вівці), але деякі з них культивували *in vitro* у спеціальному середовищі. Формування морул і бластул при культивуванні *in vitro* іноді давало кращий результат, ніж культивування в яйцепроводі, це вказувало на необов'язковість для реконструювання проміжного реципієнта.

Формування ембріонів (морул і бластул) у серії дослідів із культурою клітин молочної залози, було приблизно втричі менше, ніж в інших серіях, в яких донорами ядер використовували фібробласти плода або ембріональні клітини. Число живих ягнят порівняно з числом пересаджених у матку остаточного реципієнта (вівці породи шотландська чорноморда) морул або бластул було також у два рази нижче. У серії дослідів із клітинами молочної залози і реконструйованих яйцеклітин отримали тільки одне живе ягня, що свідчило про дуже низьку результативність експериментів із культурою клітин молочної залози. Аналіз генетичних маркерів всіх семи експериментальних живих ягнят в трьох серіях, показав, що клітини молочної залози були донорами ядер для одного, фібробласти плода - для двох і ембріональні клітини – для чотирьох ягнят. Вівця Доллі розвинулася з реконструйованої яйцеклітини, донором ядра якої була культивована клітина молочної залози вівці. Доллі фенотипово не відрізнялася від овець породи Фіни Дорсет, але суттєво різнилася від вівці-реципієнта породи шотландська чорноморда. Аналіз генетичних маркерів підтвердив цей результат.



Рис. 14.1. Схема клонування тварин (вівці Доллі).

Таким чином, колектив вчених, очолюваний Іеном Уїлмутом, продемонстрував, що їм вдалося, використовуючи соматичні клітини дорослої тварини (молочної залози), отримати

клональну тварину – вівцю Доллі з реконструйованої яйцеклітини. Відносний успіх (Доллі померла від передчасного старіння) авторів цієї роботи, перш за все, пов'язаний з використанням тривалих клітинних культур, оскільки після багатьох ділень в культурі клітин були відібрані малодиференційовані стовбурові клітини, які ймовірно і були використані як

донори ядер. Велике значення мав також той факт, що автори, враховуючи результат своїх минулих робіт, синхронізували стадії клітинного циклу яйцеклітин реципієнта і яйцеклітин донора.

Своєю роботою Уїлмут з колегами продемонстрували, що ядра клітин молочної залози дорослої вівці можуть бути за певних умов репрограмовані цитоплазмою ооциту і дати розвиток новому організму. Отримані дані змусили по-новому подивитися на процес диференціювання клітин. Чинники цитоплазми здатні ініціювати розвиток нового організму на основі генетичного матеріалу ядра диференційованої клітини. Таким чином, біологічний годинник може бути поверненим назад, і розвиток організму може початися на основі генетичного матеріалу дорослої диференційованої клітини, що суперечило загальноприйнятій раніше догмі.

Результати робіт Уїлмута і співавторів можуть мати революційне значення в біотехнології тварин і тваринництві (якщо буде підвищений вихід живих тварин при використанні донорами ядер диференційованих клітин дорослих тварин,). Клонування дозволить зберегти не лише генотипи цінних у практичному відношенні тварин, а також розмножувати їх.

Клонування високопродуктивних домашніх тварин, зокрема, молочних корів, може привести до революції в сільському господарстві, оскільки тільки цим методом можна створити не окремі екземпляри, а цілі стада елітних корів. Це допоможе при розмноженні порід спортивних коней, цінних хутрових звірів, збереженню рідкісних і зникаючих тварин в природних популяціях.

Клонування рослин, на відміну від клонування тварин, є звичайним процесом, з яким стикається будь-який квітникар або садівник. Часто рослини розмножують вегетативно (природне клонування): відростками, живцями, вусиками і т.д. Природа клонує організми мільярди років. Наприклад, коли кущ полуниці дає пагін, нова рослина виростає на місці, де пагін укорінився. Виростає нова рослина, і це є клон. Таке ж клонування відбувається з травою, картоплею і цибулею. Люди клонували рослини різними способами тисячі років. Рослини клонувалися споконвічно, особини нового покоління мають такий же генотип, що і у рослин-донорів. Отже, клонуванням можна вважати будь-який процес вегетативного розмноження у рослин. Процес цей у рослин простіший, ніж клонування тварин. У рослин (на відміну від тварин) по мірі їх зростання в ході клітинного диференціювання - клітини не втрачають тотипотентних властивостей. Тому практично будь-яка рослинна клітина, що зберегла в процесі диференціювання своє ядро, може дати початок новому організму.

Клонування рослин (культура тканин *in vitro*, клональне мікророзмноження рослин) здійснюється шляхом регенерації цілої рослини з каллусу (недиференційованих клітин, що є тотипотентними і здатними дати початок цілій рослині), шляхом зміни пропорціонального співвідношення цитокінінів і ауксинів в поживному середовищі. Для отримання первинного каллусу можна використовувати будь-які клітини і тканини рослини (окрім тих, що знаходяться в премортальному стані) з огляду на те, що клітини рослин здатні до дедиференціації при певних концентраціях фітогормонів в поживному середовищі. Але частіше використовують для цієї мети клітини меристеми. У поживне середовище для каллусоутворення обов'язково входять ауксин (для дедиференціації клітин) і цитокінін (для індукції клітинних ділень). Після отримання каллусної культури каллус можна розділити і кожен частину використовувати для регенерації цілих рослин. Оскільки каллус є безформенною недиференційованою клітинною масою, то для регенерації рослини необхідно індукувати морфогенез шляхом зміни концентрацій фітогормонів в середовищі.

Клонування рослин базується на новій технології вирощування рослин з ізольованих груп клітин і окремих соматичних клітин (рис.14.2). Для клонування рослинну клітину достатньо ізолювати від цілої рослини і помістити на живильне середовище, що містить

сольові компоненти, вітаміни, гормони і джерело вуглеводів, вона починає ділитися і утворює культуру каллусу. Надалі каллус можна розмножити і отримати необмежену кількість біомаси. Основна складність, з якою відразу ж доводиться стикатися досліднику – це те, що клітини в штучних умовах починають бурхливо ділитися і рости, але при цьому часто не в змозі продукувати вторинні метаболіти – біологічно-активні речовини даного виду рослин.

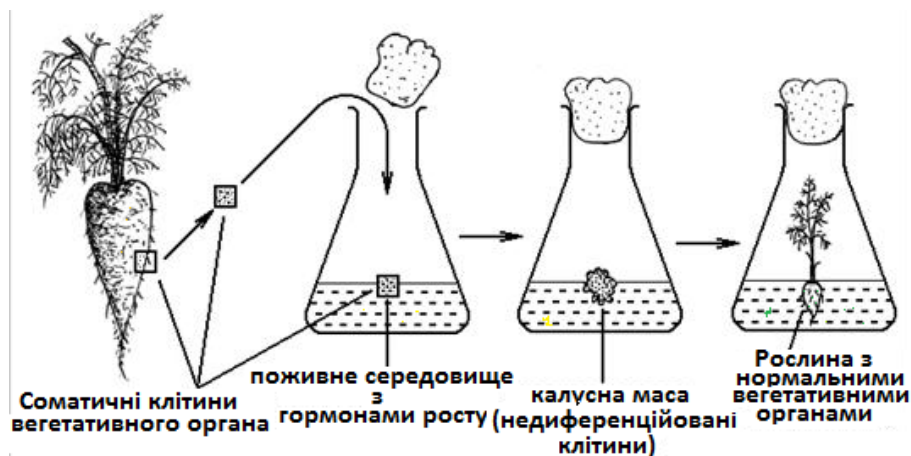


Рис. 14.2. Схема клонування рослин.

Клонування рослин частіше застосовується в комплексі з іншими біотехнологічними методами, такими як злиття клітин (гібридизація) і трансгенез (міжвидове перенесення генів). Цілу

рослину з клітини отримують потім методом клонування реконструйованих клітин.

Клітинна інженерія дозволяє отримувати гібридні штами, клітини або навіть цілі рослини, схрещуючи між собою філогенетично віддалені організми. У разі неповного злиття клітин, коли клітина-реципієнт отримує окремі ділянки ядерного матеріалу або частини протопласта клітини-донора, виходять асиметричні гібриди. Це роблять для того, щоб рослина реципієнт отримала нові властивості: підвищену стійкість до вірусів, до гербіцидів, до шкідників і хвороб рослин. Харчові продукти, отримані з таких генно-змінених культур, можуть мати поліпшені смакові якості, краще виглядати і довше зберігатися. Також часто такі рослини дають більший і стабільний урожай, ніж їх попередники. За останній час створено ряд міжвидових і міжродових гібридів тютюну, картоплі, томату, капусти, турнепсу, сої та інших. Використання досягнень клітинної інженерії, н., дозволило розробити технології отримання безвірусних рослин (н., картоплі) шляхом регенерації цілої рослини з однієї соматичної клітини. Вчені працюють над зміною генотипів злаків. Вони вводять в їх генотипи спеціальний ген бактерій, який сприятиме засвоєнню азоту з атмосферного повітря. Вирішення цієї проблеми дозволило б скоротити витрати коштів на виробництво азотних добрив та підвищити вміст білків в продукції.

Прогнозується швидке зростання споживання сільськогосподарських продуктів та зниження площі посівних земель. Можливе вирішення даної проблеми – отримання більш продуктивних трансгенних рослин, стійких до паразитів та несприятливих умов довкілля.

Багато хто вважає це перспективою розвитку агровиробництва, оскільки створення трансгенних рослин з необхідними властивостями, вимагає набагато менше часу і дозволяє отримувати рослини із заданими господарськими цінними ознаками, а також новими властивостями, які не зустрічаються в природі.

Культивування рослин на живильних середовищах дозволяє з невеликої частини (клітини) рослини отримати до 1 млн. рослин в рік. Цей метод використовують для швидкого розмноження рідкісних або новостворених цінних сортів сільськогосподарських рослин.

Спосіб мікроклонального розмноження – один з нових напрямків розмноження рідкісних і зникаючих рослин. Клонування рослин дозволяє отримувати безвірусний посадковий матеріал (при використанні апікальної меристеми як джерела клітин), швидкого розмноження рослин у великих масштабах (у тому числі рідкісних і зникаючих), клонування з пиляків і наступне відновлення диплоїдності дозволяє отримати гомозиготні за всіма генами

рослини, які можна використовувати в подальшій селекції. Також можна культивувати на штучних поживних середовищах протопласти рослин, з яких в деяких випадках можна регенерувати цілі рослини (протопласти зручні для трансгенезу, оскільки не мають клітинної стінки і можуть зливатися з іншими клітинами).

Отримані мікророслини в культурі *in vitro* женьшеня, кірказону, незабудочника, метаплексиса, гіностемії, василистника, родіоли, кодонопсіса і інших рідкісних рослин флори. Створення «банків» мікророслин допоможе зберегти зникаючі в природі види. Прогнозується, що покращення методів мікроклонального розмноження допоможе відновленню природних екосистем, а створені «банки» рослин будуть використані для реінтродукції в природних екосистемах типових для них рослин.

Терапевтичне клонування і його перспективи в медицині. Існують два різновиди клонування людини: репродуктивне клонування і терапевтичне. Репродуктивне клонування людини – передбачає, що індивід, який народився в результаті клонування, отримує ім'я, громадянські права, освіту – словом все як звичайні люди. Але таке клонування потребує вирішення великої кількості етичних, релігійних і юридичних проблем. Більшість держав своїм законодавством заборонили розробки з репродуктивного клонування людини.

Терапевтичне клонування передбачає, що розвиток ембріона людини зупиняється до 14 діб і подальші використовується для отримання стовбурових клітин. Законодавці багатьох країн побоюються що легалізація терапевтичного методу клонування призведе до переходу в репродуктивне, проте в деяких країнах (США і Великобританія) терапевтичне клонування дозволено. Терапевтичне клонування клітин людини викликає науковий інтерес серед вчених і медиків, тому що отримані шляхом клонування стовбурові клітини, недиференційовані, і можуть перетворюватися на клітини потрібних тканин. В результаті клонування отримують генетично ідентичні клітини пацієнта, і їх трансплантація не приведе до гістнесумісності і не потребуватиме застосування імунодепресантів (препарати, які перешкоджають відторгненню пересаджених органів чи тканин) та інших побічних ефектів.

Для «терапевтичного клонування» використовують метод створення клітинних культур-трансплантатів, який полягає у перенесенні ядра соматичної клітини пацієнта (н., шкірних фібробластів, лімфоцитів) в ооцит. Після такої реконструкції ядро набуває тотипотентності і визначає формування ембріона, який на початкових стадіях розвитку може бути використаний для створення культури ембріональних стовбурових клітин, які мають ядерний геном пацієнта. На ембріональні стовбурові клітини діють індукторами – речовинами, що викликають спрямовану диференціацію клітин. Наприклад, в кардіоміоцити для відновлення пошкодженого міокарду або в секреторні бета-клітини острівців Лангерганса, які синтезують інсулін. Розроблені і продовжують розроблятися інші методи отримання культур стовбурових клітин, наприклад, з використанням технології генетичної модифікації генома, а також методи діагностики з використанням різноманітних маркерів.

Успішно проведені експерименти по клонуванню макак-резус американськими ученими (Л. Менг і ін., Національний центр досліджень приматів в м. Орегон), що вказує на потенційну можливість перенесення технології трансплантації ядер на людину. Отримано дві макаки-резус в результаті перенесення ядер бластомерів з ранніх ембріонів. Зважаючи на значну схожість фізіології і генетики у людини і решти приматів для вивчення процесів репрограмування генома, розвитку клонів, як під час протікання вагітності, так і в постнатальний період і їх епігенетичній стабільності нелюдські примати можуть служити оптимальнішою моделлю.

Перш ніж стане можливим серйозно сприймати заяви про впровадження терапевтичного клонування в медицині необхідно добитися клонування мавп з використанням соматичних диференційованих клітин. Ефективність реконструкції ембріонів приматів залежатиме від оптимізації багатьох параметрів. Уявлення про процеси дозрівання

яйцеклітин в умовах *in vitro* все ще є неповними, вони вимагають удосконалення методів злиття каріопласта з цитопластом і активації генома. Злиття не вважають в даний час за найбільш ефективний метод для з'єднання донорського ядра з енуклеюваною яйцеклітиною: електричний імпульс викликає одночасно активацію реконструйованого ооциту, внаслідок чого в ядрі не встигають завершитися процеси репрограмування ядра. Вже розроблені методики по індукції злиття з використанням фітогемагглютиніну, етилгліколю і мікрохірургічними методами, які не викликають одночасну активацію. Це дозволяє відстрочити її індукцію у прооперованого ооциту на 4-5 ч.

В травні 2013 року здійснено терапевтичне клонування клітин дорослої людини. Клоновані ембріональні стовбурові клітини людини, джерелом для яких стали клітини дорослої людини. Шухрат Міталіпов (керівник досліджень з Орегонського національного центру досліджень приматів), ще в 2007 році отримав стовбурові клітини ембріона макаки. Він запропонував новий метод виробництва стовбурових клітин для пацієнтів з пошкодженими або нездоровими органами і тканинами. Такі стовбурові клітини можуть регенерувати і замінювати пошкоджені клітини, поліпшувати стан при поширених хворобах людей. Ш.Міталіпов і його колеги використовують технологію перенесення ядра клітини. Вчені пояснюють, що це не клонування людини, в Орегоні просто застосували методи клонування, для отримання стовбурових ембріональних клітин на базі донорської яйцеклітини і клітини шкіри пацієнта. У результаті вдалося виростити ембріон, з якого взяли стовбурові клітини.

Феліпе Проспер (Наварський університет, Іспанія) відзначив, що вже існує інший простий і дешевий метод створення тотипотентних стовбурових клітин, який був розроблений нобелівським лауреатом С.Яманакою.

Технологія перенесення незначної кількості цитоплазми від ооциту здорового донора в реципієнту яйцеклітину пацієнта в даний час піддається активній критиці із-за можливої дисрегуляції у взаємовідносинах між ДНК ядра і мітохондрій. Негативний ефект генетичного химеризму може бути ще сильнішим при тотальній заміні оточення цитоплазми каріопласта і виявитися у вигляді порушень різної природи як у пренатальний період онтогенезу, так і після народження організму.

Створення *ембріональних стовбурових клітин* (ЕС) відкривають величезні можливості для лікування багатьох захворювань, пов'язаних з дегенерацією певних типів клітин, втратою функцій тканин і цілих органів. Мільйони людей у всьому світі страждають нейродегенеративними захворюваннями, такими як хвороба Альцгеймера і Паркінсона, діабет і артрит, СНІД, інфаркт і інші захворювання, які можуть бути виліковані за допомогою застосування клітинних трансплантатів.

Прогнозується, що найбільш поширені захворювання невдовзі можуть бути вилікованими з впровадженням клітинної терапії. Методи терапевтичного клонування дозволяють уникнути імунного відторгнення трансплантатів, оскільки ЕС клітини мають такий же геном. Низька ефективність трансплантації ядер не важлива для здійснення клітинної терапії, оскільки для отримання лінії ЕС клітин достатньо одного або декількох передімплантаційних ембріонів. Розглядається питання про використання як цитопласти енуклеювані яйцеклітини тварин, наприклад, великої рогатої худоби, які підтримують реалізацію генетичного матеріалу ядра людської соматичної клітини до стадії 5-денного ембріона.

Гематологічне клонування. На початку розвитку ембріон складається з абсолютно однакових стовбурових клітин, які пізніше стануть диференційованими і відповідатимуть за розвиток різних органів. Стовбурові клітини присутні в кожному живому організмі на всіх стадіях його розвитку. Вони перетворюються у різні типи клітин (серця, печінки, шкіри тощо), формуючи таким чином органи, а також забезпечують відновлення пошкоджених ділянок

організму протягом життя. Запас стовбурових клітин з віком зменшується, що робить наше здоров'я більш уразливим. Втім, сьогодні батьки можуть зберегти певну кількість цих клітин, зібравши і передавши на зберігання пуповинну кров новонародженого малюка до сімейного банку пуповинної крові.

Після народження стовбурові клітини продовжують залишатися в організмі, забезпечуючи оновлення старіючих клітин, але з віком вони по різних причинах закінчуються або гинуть. Клітини перестають оновлюватися, що згубно впливає на здоров'я людини і імовірно є причиною старіння організму. Якби стовбурові клітини не гинули, можливо (це слід підкреслити) організм не був би схильним до старіння взагалі або цей процес проходив би не так швидко.

Гематологічне клонування направлене на заповнення втрачених стовбурових клітин, наявність яких повинна відтермінувати смерть пацієнта на довший термін. Також воно може бути використане для відновлення пошкоджених органів. Сам процес виглядає таким чином: з будь-якої клітини пацієнта вилучається ядро, яке потім поміщається в яйцеклітину, яка починає розвиток. Після закінчення чотирьох діб зародок представляє собою крихітну бульбашку (бластоциста), клітини якої плюрипотентні (недиференційовані). По мірі розвитку зародка клітини стають мультипотентними (диференційованими) і їх кількість достатньо збільшується. Такі клітини можна виділити і ввести пацієнту. Найважче, що потрібно зробити – це підштовхнути плюрипотентні клітини до розвитку в потрібному напрямку.

Важливі результати в цій області були отримані в США та інших країнах. Згідно з попередніми результатами, вчені знаходяться на завершальному етапі розробки технології, яка дозволить відновлювати пошкоджені віком або хворобою органи за допомогою клонованих клітин цього ж організму.

Так, дослідники компанії Advanced Cell Technology (штат Массачусетс, США) клонували клітини покривної тканини двох корів, після чого стовбурові клітини крові, отримані з клонованих ембріонів, імплантувалися початковим тваринам. При цьому імунна система однієї з корів пригнічувалася імунодепресантами. Згідно отриманих результатів, колонії клітин крові, які утворилися з клонів, проявляли дивовижні замісні властивості: зокрема, навіть у тварини з нормально функціонуючою імунною системою, вони незабаром складали до 50% всієї клітинної популяції. Механізм «омолодження» клітин не вивчений. Висуваються версії відносно того, що дане явище пов'язане із зміною стану кінцевих ділянок хромосом - теломерів.

Якщо нова методика зарекомендує себе як ефективна і безпечна, її можна буде використовувати для замісної терапії хворих лейкемією, а також автоімунними захворюваннями, зокрема, артритом. Крім того, наголошується, що клоновані стовбурові клітини крові можуть сприяти відновленню широкого кола інших органів. Ймовірно, такі регенеративні властивості пов'язані з тим, що «омолоджені» клітини крові інтенсивніше знищують старі і дефектні клітини і структури органів, тим самим, сприяючи їх оновленню.

Проте до того як описана методика зможе бути застосована в клініці, слід провести ще великий об'єм досліджень. Зокрема, зараз необхідно з'ясувати, чи можуть клоновані клітини набувати властивостей злоякісних клітин. Слід також відзначити, що у випадку з коровами, які були використані в дослідях масачусетськими дослідниками, стовбурові клітини вилучалися з 100-денних ембріонів, що не допустимо відносно людини. Зараз вчені вирішують питання отримання стовбурових клітин на максимально ранніх етапах розвитку зародка.

В жовтні 2011 року американські вчені застосували технологію перенесення ядра соматичної клітини для того, щоб виростити персоніфіковані ембріональні стовбурові клітини у незаплідненій яйцеклітині людини. За допомогою технології клонування стало можливим створення "персоніфікованих" ембріональних стовбурових клітин у людському організмі.

Генетичний матеріал, узятий із соматичної клітини шкірного покриву людини, був перенесений у людську яйцеклітину. Згодом її використали для створення ембріона на ранній стадії розвитку. Стовбурові клітини мають величезний потенціал для медицини, оскільки можуть давати початок будь-яким спеціалізованим клітинам у людському організмі.

Вчені витягли генетичний матеріал із ядра яйцеклітини і замінили його хромосомами соматичної клітини шкірного покриву, яйцеклітина почала ділитися, але на етапі 6-12 бластомерів ділення зупинялося. Коли ж вчені залишили у яйцеклітині її власний генетичний матеріал і додали хромосоми клітини шкірного покриву, яйцеклітина продовжувала розвиватися і досягала стадії бластоцисти, яка містить вже до 100 клітин. Іншими словами, така яйцеклітина ставала потенційним джерелом ембріональних стовбурових клітин.

Яйцеклітина і сперматозоїд мають по галоїдному набору хромосом. Під час запліднення яйцеклітини утворюється зигота, а потім ембріон, який успадковує одну половину хромосомного набору від матері, а іншу - від батька. У згаданих уже дослідах групи доктора Еглі створювали триплоїдні ембріони, що могло привести до великих проблем. Найчастіше ембріони із неправильною кількістю хромосом нежиттєздатні. В інших випадках три копії лише однієї хромосоми призводять до хромосомних захворювань.

Ученим потрібно створити такі ембріональні клітини, у яких буде тільки ДНК донора, тобто дорослої соматичної клітини. Однак, коли механізм поділу яйцеклітини запущений, і в її ядрі вже міститься певний набір хромосом, розділити їх практично неможливо. Створені доктором Еглі та його групою стовбурові клітини ще не можна використовувати в терапевтичних цілях, бо дослідження тільки розпочалися, а проведена робота є лише одним із проміжних етапів. Дослідники впевнені, що людська яйцеклітина здатна перетворити "дорослу" диференційовану клітину, н., клітину шкірного покриву на стовбурову.

Професор Мері Херберт із Центру старіння і здоров'я при Університеті Ньюкасла у Великобританії, говорить: «Це дослідження показує, що метод перенесення ядра соматичної клітини є недостатнім в умовах роботи із клітинами людського організму. Однак авторам вдалося зробити його більш ефективним, залишивши у яйцеклітині її власний генетичний матеріал. Хоча цей метод сам по собі не вирішує основну проблему, але він наближає нас до розуміння наших власних недоліків у дослідженнях».

З іншого боку, вчені досліджують і інший шлях отримання ембріональних стовбурових клітин. Замість використання людської яйцеклітини, "доросла" клітина поміщається у спеціальну «хімічну ванну», яка «ре програмує» її на стовбурову клітину (індуковані стовбурові клітини). Цей метод вважається більш етичним, але існують побоювання, що отримані таким чином стовбурові клітини не можна буде використовувати в терапевтичних цілях.

Між стовбуровими клітинами, отриманими цими двома методами, є відмінності. На відміну від ембріональних стовбурових клітин, індуковані стовбурові клітини більш схильні до прояву генів, що викликають ракові захворювання.

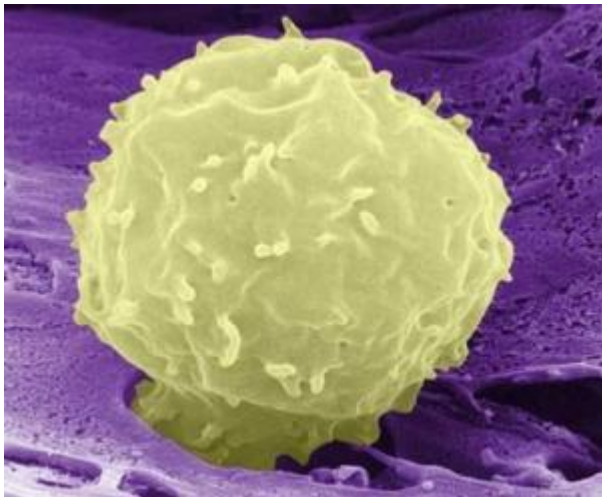
Результати цих досліджень по створенню лінії стовбурових клітин, генетично ідентичних клітинам пацієнта розглядаються як значний успіх експериментів з клонування клітин людини (Робін Лавелл-Бадж, Національний Інститут медичних досліджень Британії).

Перспективний напрямок одержання стовбурових клітин – використання пуповинної крові. Пуповинна кров відіграє важливу роль у внутрішньоутробному розвитку дитини. Вона, проходячи по судинах пуповини, забезпечує малюка киснем і необхідними поживними речовинами. Після народження дитини лікар перерізує пуповину, в якій зазвичай залишається 50-150 мл пуповинної крові. Саме ця кров, завдяки наявності в ній стовбурових клітин, стає цінним матеріалом для лікування багатьох хвороб. І якщо раніше пуповинна кров разом з пуповиною утилізувалися одразу ж після пологів, то сьогодні батьки все частіше

зберігають її стовбурові клітини, щоб забезпечити свого малюка персональним запасом лікувального матеріалу на випадок захворювання.

Вперше лікування стовбуровими клітинами пуповинної крові було застосовано в 1988 році у Франції. Сьогодні цей природний матеріал вже активно використовується у всьому світі. Тільки за перші три квартали 2013 року у світі здійснено близько 5 500 застосувань стовбурових клітин пуповинної крові з метою лікування.

Лікарі називають пуповинну кров рідким золотом медицини, а вчені – найбільшою історією успіху у сфері клітинних технологій. У всьому світі, зокрема в Україні, вивчення властивостей стовбурових клітин пуповинної крові не припиняється.



Стовбурові клітини – це незрілі клітини, здатні розвиватися в клітини різних тканин організму. У процесі внутрішньоутробного розвитку дитини стовбурові клітини перетворюються зі свого універсального недиференційованого стану в клітини серця, печінки, шкіри тощо (рис. 14.3).

Рис. 14.3. Стовбурова клітина (СК).

Стовбурові клітини є у всіх тканинах і органах на всіх етапах життя людини. Проте їх кількість і якість відрізняється залежно від віку людини – чим вона молодша, тим більше в її організмі таких клітин і тим «сильніша» їхня здатність до диференціації і поділу (СК може поділитися до 100 разів, а деякі клітини, н., нервової тканини, взагалі не мають такої здатності). Протягом життя у боротьбі з інфекціями, травмами та негативним впливом навколишнього середовища людина витрачає запас своїх стовбурових клітин, що відповідають за регенерацію пошкоджених тканин в організмі. До речі, сьогодні в медицині однією з причин старіння людини називають саме зменшення кількості та якості стовбурових клітин.

Існує кілька десятків видів стовбурових клітин, які відрізняються властивостями та джерелом отримання. Загалом їх можна розділити на стовбурові клітини дорослого організму й ембріональні стовбурові клітини. Питання використання ембріональних стовбурових клітин досі залишається відкритим, оскільки їх отримання – процедура, що насторожує з точки зору медичної етики й заборонена з точки зору релігії, а наслідки їх диференціації – непередбачувані.

Стовбурові клітини дорослої людини широко досліджуються і використовуються в усьому світі за рахунок безпеки і етичності їх отримання, а також більш контрольованої диференціації. Одні з найцінніших типів цих клітин – гемопоетичні стовбурові клітини та мезенхімальні стовбурові клітини. Гемопоетичні використовуються в лікуванні переважно захворювань крові (лейкемії, анемії тощо), при яких єдиний спосіб врятувати життя – трансплантувати гемопоетичні стовбурові клітини. Ці клітини у високій концентрації є в кістковому мозку і пуповинній крові. При цьому концентрація гемопоетичних стовбурових клітин в пуповинній крові в 10 разів більша ніж у кістковому мозку.

В останні роки лікування стовбуровими клітинами пуповинної крові набуває все більш широкого застосування в клінічній практиці завдяки таким властивостям:

- на відміну від стовбурових клітин кісткового мозку стовбурові клітини пуповинної крові, збережені при народженні дитини, ще не піддалися негативному впливу таких чинників, як навколишнє середовище, захворювання, неправильне харчування тощо.

Завдяки цьому вони більш активні і мають більш високу здатність до поділу і перетворення на потрібні організму клітини;

- збір пуповинної крові – абсолютно проста, безболісна і безпечна процедура як для матері, так і для дитини. Водночас для отримання кісткового мозку потрібна двогодинна операція під загальним наркозом, яка, як і будь-яка операція, завжди супроводжується ризиком розладу дихальної і серцево-судинної діяльності для донора;
- власні стовбурові клітини пуповинної крові на 100% підходять дитині і з 25%-ю вірогідністю – її братам, сестрам. Імовірність того, що буде знайдено сумісний донорський зразок стовбурових клітин кісткового мозку, складає всього від 1:1000 до 1:1000 000;
- підготовка власного зразка стовбурових клітин пуповинної крові до застосування займає менше одного дня, тоді як пошук донорського зразка триває місяці, а часом і роки;
- вартість забору, виділення і зберігання власних стовбурових клітин пуповинної крові протягом усього життя в 20 разів менша вартості донорського зразка стовбурових клітин кісткового мозку.



Стовбурові клітини, які містяться у пуповинній крові, вже застосовуються у лікуванні понад 100 тяжких захворювань. Жодні ліки не здатні замінити стовбурові клітини пуповинної крові.

Рис. 14.4. Збереження пуповинної крові.

Тільки у пуповинній крові містяться молоді стовбурові клітини, на відміну від інших джерел стовбурових клітин (н., кісткового мозку),

що забезпечує більш ефективне лікування.

Збір пуповинної крові – це проста і абсолютно безпечна для матері і дитини процедура. Її знає кожен акушер-гінеколог, вона здійснюється згідно з наказом МОЗ України. Сотні тисяч сімей по всьому світу вже подбали про здоров'я своїх дітей, зберігаючи їхню пуповинну кров. У таких країнах, як США, збереження пуповинної крові дитини – настільки ж буденна процедура турботи про здоров'я дитини.

Зберегти стовбурові клітини пуповинної крові можна лише один раз у житті – при народженні дитини. Збереження пуповинної крові – це можливість подбати про здоров'я не тільки дитини, а й інших членів сім'ї – з 25% ймовірністю пуповинна кров малюка підійде його рідним братам і сестрам.

Лікувальний потенціал пуповинної крові зростає з кожним днем – на сьогоднішній день проводяться дослідження з лікування ще 900 захворювань стовбуровими клітинами пуповинної крові. Тільки протягом трьох кварталів 2013 року в США здійснено понад 5 500 успішних лікувань різних захворювань з використанням стовбурових клітин пуповинної крові. Клієнти українського Сімейного банку пуповинної крові ГЕМАФОНД протягом кількох останніх років використовували свою пуповинну кров для лікування гепатиту С, ДЦП, родової травми, аутизму, гіпоксії мозку у зв'язку з нещасним випадком тощо.

Зберіганням пуповинної крові в Україні займається з 2005 року біотехнологічна компанія Сімейний банк пуповинної крові ГЕМАФОНД, яка працює згідно з ліцензією АВ № 611999 від 22.11.2011 р. і активно співпрацює з українськими клініками та банками пуповинної крові Євросоюзу.

На сьогоднішній день стовбурові клітини пуповинної крові використовуються у лікуванні багатьох тяжких захворювань, зокрема й смертельно небезпечних, серед яких: гострі хронічні лейкозії, рефрактерні анемії, важка форма апластичної анемії, анемія Фанконі, спадкові порушення метаболізму (мукополісахарозидози, хвороби: Гарлера, Шина, Гюнтера, Німана-Піка та ін.), спадкові патології тромбоцитів та онкозахворювання, неврологічні та аутоімунні захворювання, цироз печінки, розсіяний склероз та багато інших.

Біологічні і етичні проблеми клонування. За останній час створені ряд міжвидових і міжродових гібридів тютюну, картоплі, томату, капусти, турнепсу, сої і ін. Використання досягнень клітинної інженерії, наприклад, дозволило розробити технології отримання безвірусних рослин (н., картоплі) шляхом регенерації цілої рослини з однієї соматичної клітини.

Вчені працюють над зміною генотипів злаків. Вони вводять в їх генотипи спеціальний ген бактерій, який сприятиме засвоєнню азоту з атмосферного повітря. Вирішення цієї проблеми дозволило б скоротити витрати на виробництво азотних добрив.

Перенесення генів використовується і при виведенні нових сортів декоративних рослин. Так, в генотип петунії був перенесений ген, що порушує утворення пігменту в пелюстках. Таким шляхом була створена петунія з білими квітками. Завдяки методам клітинної інженерії терміни, необхідні для виведення нових сортів рослин, скорочуються з 10-12 років при використанні звичайних методів селекції до 3-4 років.

Особливо інтенсивно процес створення трансгенних організмів йде в США, Західній Європі, Японії, Китаї. Тільки у Китаї за деякими даними зареєстровано близько 120 генетично модифікованих сортів сільськогосподарських культур. У США генетично модифікована соя повністю замінила традиційну. Завдяки досягненням в області трансгенеза і клонування ми зможемо вже в найближче десятиліття повною мірою скористатися рослиною як найбільш дешевою і екологічно безпечною фабрикою для виробництва більшості необхідних людині матеріалів, їжі, лікарських препаратів, хімічних сполук, сировини і так далі.

Перспективи медичного застосування генетично модифікованих рослин, це найбільш популярне зараз питання про синтез вітаміну А в «Золотому рисі» — продукті спільних наукових розробок груп Інго Потрікуса з Федерального технологічного інституту (Швейцарія) і Пітера Бейера з Університету Фрайбурга (Німеччина). Отримані результати по експресії людського соматотропіну (гормону зросту) в хлоропластах тютюну. Це дослідження заклало нову тенденцію в біотехнології рослин, а саме: синтез фармацевтичних і діагностичних препаратів і оральних вакцин рослинами. Експресія соматотропіну тютюном — це робота Джеффри Стауба і його колег в Monsanto Co., результати якої опубліковані в журналі Nature Biotechnology (2000). Синтез рослинами антитіл і оральних вакцин вже був описаний раніше. Недолік попередніх робіт — відносно низький рівень експресії підібраних продуктів. І ось вперше важливий з фармацевтичної точки зору білок в значних кількостях синтезований шляхом використання нової системи експресії в хлоропластах.

Біотехнологія рослин відіграє важливу роль і у вирішенні продовольчої проблеми. Вона дає новий могутній інструмент, який доповнює вже існуючі способи підвищення продуктивності сільського господарства і, як наслідок, стимулювання економічного зростання в бідних країнах. Проте, тоді як медична продукція вже отримала загальне визнання, впровадження генетично модифікованих продуктів харчування в деяких розвинених країнах зустріло сильну опозицію, пов'язану, головним чином, з недоліком генетичних знань і, як наслідок, необґрунтованими страхами. Проте, певні побоювання

відносно трансгенних рослин існують.

Фахівці вважають, що трансгенні організми, переважно стійкі до шкідників (в основному за рахунок токсинів, що утворює *Bacillus thuringiensis*) здатні викликати зміни в популяції комах, проте куди більший вплив робить застосування інсектицидів. Поліпшення стійкості до несприятливих факторів довкілля (солей, води, засусі і ін.) робитимуть передбачений вплив, тому приступати до таких розробок слід з особливою обережністю. Крім того, слід мати гарантії, що будуть проведені всі запобіжні заходи у всіх випадках, коли продовольчі або кормові культури модифікуються з метою отримання фармакологічно-активних речовин, які можуть бути перенесені до інших рослин, або проникати в ґрунт і потім у воду.

Продукти селекції рослин значно менш агресивні, ніж початкові або дикі рослини. Це пояснюється тим, що в них людина прагне закріпити вигідні для себе властивості, а це обмежує їх здатність виживати за межами фермерського поля, де культивування і контроль за бур'янами значно полегшує їм життя.

Дослідження у Великобританії (тестування на виживання в природних умовах) показали, що сільськогосподарські генетично модифіковані рослини не мають переваг перед їх дикими родичами.

Але існують побоювання, що чужорідні гени ГМ-рослин можуть передаватися іншим диким рослинам, внаслідок чого можуть виникнути бур'яни, які буде складніше утримати під контролем. Ця небезпека має бути усвідомлена.

Окремим напрямком клітинної інженерії, що має величезне практичне значення, є отримання *гібридом*, тобто клітин, що виникають при злитті батьківських клітин з одного організму, але з різними програмами диференціації і розвитку. Методика була розроблена Келлером і Мільштейном. Це можуть бути клітини з різних типів тканин або пухлинні клітини. Найбільший розвиток *гібридомна технологія* знайшла в отриманні моноклональних антитіл (МКАТ).

Завдяки гібридомам виникли нові методи діагностики багатьох захворювань і відкрилися нові шляхи для вивчення злоякісних пухлин. І хоча гібридами швидше відносяться до винаходів, а не до відкриттів, вони були відмічені в 1984 році Нобелівською премією, вищою науковою нагородою, що присуджується за видатні відкриття. Особливо слід зазначити безкорисливість авторів. Якби Келер і Мільштейн запатентували свій метод, вони незабаром би стали мільярдерами, оскільки всі хто використовував б гібридами в комерційних цілях, повинні були б платити за право користуватися патентом. Метод гібридом безперешкодно увійшов до всіх сфер імунології, і самі автори всебічно сприяли цьому, надаючи свою клітинну лінію плазмочитома для досліджень всім охочим. І перші гібридоми в нашій країні, отримані в 1979-1980 роках, були створені на основі клітин, які походять з лабораторії цих авторів і з їх дозволу.

Клітини тварин, що диференціюються, позбавляються тотипотентності, і в цьому одна з їх суттєвих відмінностей від рослинних клітин. Саме тут головна перешкода для клонування дорослих хребетних тварин. Методи клонування цілих тварин досі не доведені до стадії практичного («промислового») застосування.

Успішними являються експерименти по клонуванню тварин з ембріональних недиференційованих клітин, що не втратили тотипотентних властивостей, проте є позитивні результати і із зрілими клітинами. Процес клонування протікає таким чином - ядро соматичної клітини пересаджують в позбавлену ядра (енуклейовану) яйцеклітину і імплантують її в організм матері (якщо це тварина, що вимагає виношування).

Енуклеація традиційно проводиться за допомогою мікрохірургії або шляхом руйнування ядра ультрафіолетом, пересадка проводиться за допомогою тонкої скляної піпетки або електрозлиттям. Останнім часом вчені з данського Інституту

сільськогосподарських наук розробили недорогу технологію клонування, яка набагато простіше використовуваної нині. За новою технологією, яйцеклітини розрізають навпіл, і половинки з ядрами викидаються. Обирається пара порожніх половинок, що залишилися, які «склеюються» в одну яйцеклітину після додавання нового ядра. Найдорожча частина устаткування, яке використовували в цьому експерименті, — машина для «зварки» клітин — коштує всього лише \$3,5 тисяч. Технологія може бути повністю автоматизована і поставлена «на потік».

Успішність пересадки залежить від виду тварини (амфібій клонують успішніше, ніж ссавців), методики пересадки і ступеня диференціювання клітини-донора. Так, ще Бріггс і Кінг в перших дослідах на амфібіях встановили, що якщо брати ядра з клітин зародка на ранніх стадіях розвитку бластули, то приблизно в 80% випадків зародок нормально розвивається далі і перетворюється на пуголовка. Якщо ж розвиток зародка, донора ядра, перейшов на наступну стадію - гастралу, то менш ніж у 20% випадків оперовані яйцеклітини розвивалися нормально. Ці результати пізніше були підтверджені і в інших роботах.

Досліди з амфібіями показали, що ядра різних типів клітин одного і того ж організму генетично ідентичні і в процесі клітинного диференціювання поступово втрачають здатність забезпечувати розвиток реконструйованих яйцеклітин, проте серійні пересадки ядер і культивування клітин *in vitro* якоюсь мірою збільшує цю здатність.

У ссавців як донори використовуються малодиференційовані стовбурові клітини або клітини ранніх ембріонів. Робота методично виявилася досить важкою, перш за все тому, що об'єм яйцеклітини у ссавців приблизно в тисячу разів менше, ніж у амфібій. Проте ці труднощі були успішно подолані. Експериментатори навчилися за допомогою мікрохірургічних методів видаляти пронуклеуси із зигот (запліднених яйцеклітин) ссавців і пересаджувати в них клітини.

Досліди на мишах закінчилися повною невдачею – клони гинули на стадії бластоцисти, що було пов'язане, очевидно, з дуже ранньою активацією генома зародка - вже на стадії 2-х бластомерів. У інших ссавців, зокрема, у кроликів, овець і великої рогатої худоби, активація першої групи генів в ембріогенезі відбувається пізніше, на 8-16-клітинній стадії. Можливо, тому перші значні успіхи в клонуванні ембріонів були досягнуті на інших видах ссавців, а не на мишах. Для кроликів (Стік і Робл, 1989) був отриманий результат - 3,7% реконструйованих яйцеклітин розвинулися до нормальних тварин.

Робота з реконструйованими яйцеклітинами великої домашньої худоби, корів або овець, йде дещо по-іншому. Їх спочатку культивують не *in vitro*, а *in vivo* - в перев'язаному яйцепроводі вівці - проміжного (першого) реципієнта. Потім їх звідти вимивають і трансплантують в матку остаточного (другого) реципієнта — корови або вівці відповідно, де їх розвиток відбувається до народження дитинчати. За даними одних авторів реконструйовані зародки краще розвиваються в яйцеклітині, ніж в культуральному середовищі, хоча деякі дослідники отримали непогані результати і при культивуванні.

Таким чином, була в цілому вирішена проблема клонування великої рогатої худоби. Наприклад, в одному з експериментів, 92 яйцеклітини з 463 розвинулися до дорослих корів.

З інших ссавців були успішно клоновані свині.

З викладеного вище виходить, що методично або технічно клонування дорослих ссавців розроблене ще недостатньо для практичного застосування. Для цього необхідно розширити коло досліджень, включивши в нього, окрім овець, представників і інших видів тварин. Такі роботи необхідні, щоб встановити, чи не обмежується можливість клонування дорослих ссавців особливостями або специфікою якого-небудь одного або декількох видів.

Потім необхідно істотно підвищити вихід життєздатних реконструйованих ембріонів і дорослих клонованих тварин, з'ясувати, чи не впливають методичні прийоми на тривалість життя, функціональні характеристики і плодючість тварин. Для клонів високий ризик

дефектного розвитку реконструйованої яйцеклітини, головною причиною якого може бути неповне репрограмування генома донорського ядра.

Що ж до можливості клонування людини, яка викликала бурхливу реакцію суспільства, то про неї говорити поки не доводиться. Перспективним напрямком в технології клонування тварин є вивчення генетичних механізмів розвитку і диференціювання клітин.

Вчені вбачають великі перспективи в поєднанні клонування і трансгенезу. Трансгенез - це техніка перенесення екзогенної ДНК, тобто генів, через клітини зародка в цілий новий організм. Використовуючи цей метод, можна отримувати тварин, що мають якісно нові ознаки. Наприклад, можливе створення порід, стійких до захворювань, які матимуть нові, корисні для промислової діяльності людини ознаки. Із застосуванням трансгенезу процес створення нових порід і ліній продуктивних тварин значно прискориться. Крім того, цей метод дозволяє вже в даний час перенести дослідження функціональної активності генів *in vitro* (на культурах клітин) в умови *in vivo* (на живих організмах), що важливе для розуміння фундаментальних основ життя. На думку багатьох видатних учених, технологія створення трансгенних тварин - це одна з найбільш захоплюючих галузей науки, що з'явилися в останні роки.

Виробництво людських рекомбінантних медичних препаратів, із молока трансгенних тварин потребує вирішення деяких ускладнень, які пов'язані з мікробними біореакторами, в яких відсутня посттрансляційна модифікація білків, неправильний фолдінг молекул речовин, що синтезуються, а також високі витрати на очищення. Використання клітинних культур тварин як біореакторів характеризується високими витратами на культуральні середовища і невисоким виходом продукту. Тому багато фахівців в області клонування головним завданням ставлять застосування технології перенесення ядер для створення і розмноження трансгенних тварин з корисними властивостями.

Зараз існують різні технології створення трансгенних тварин. Найбільш поширена - це мікроін'єкції генних конструкцій в пронуклеуси зигот ссавців. Серйозною перешкодою на шляху використання цього методу є низька ефективність його застосування у сільськогосподарських видів тварин (<1%). Покращення техніки перенесення ядер може допомогти у вирішенні і цієї проблеми.

Клонування цінних трансгенних тварин може швидко і економічно забезпечити людство новими лікарськими препаратами, що містяться в молоці, спеціально отриманих для цього генно-інженерними методами овець, кіз або корів. З'явилось повідомлення, що ученим з шотландської фірми PPL Therapeutics вдалося отримати успішні клони овець із зміненою ДНК. Введений ген, який додає в молоко овець фермент, що використовується в сучасній фармакології для лікування спадкової емфіземи легенів.

Наступним кроком шотландських учених стало виведення клонованих овець, які мають спеціальний ген, що дозволяє їм виробляти молоко з такими ж білками, як у людини. Новизна подібної методики полягає в тому, що експериментатори вибирають гени, які хочуть змінити або видалити (директор фірми PPL Therapeutics Алан Колмен). Це означає, що принципово можливо вирощувати для трансплантації людські тканини і органи усередині, наприклад, свиней, що найбільш близькі нам по ряду важливих біологічних параметрів.

Клонування ссавців це одна із захоплюючих проблем сучасної біології, проте, спроби створення клонів не можна назвати успішними. Велика частина реконструйованих зародків не розвивається далі ранніх ембріональних стадій, з тих, що народилися близько половини не досягає дорослого віку, і немає упевненості в тому, що дорослі клони - абсолютно здорові тварини. Вивчення фундаментальних основ генної експресії і генетичного контролю розвитку допоможе пояснити причини ускладнень, з якими стикається новий напрямок. Технологія клонування внесла величезний внесок до нашого розуміння ранніх процесів розвитку, взаємодій батьківських геномів, репрограмування ядер і імпринтингу генома.

Метод трансплантації ядер ще залишається перспективним поки не будуть вивчені всі його можливості і проблеми, які можуть виникнути при його використанні.

Клонування людини: етичні та інші проблеми. Проблема клонування людини - це передусім проблема етична. Одночасно, необхідність превентивного правового регулювання у цій сфері пов'язана із ризиком і наслідками застосування технології клонування, які стосуються не лише сучасного, а й майбутніх поколінь.

При репродуктивному клонуванні виникають деякі суттєві проблеми: низька результативність клонування, висока летальність серед клонів, що робить спроби клонування людини етично неприйнятними. Невідомо, як може вплинути на історичний розвиток популяції людини і структуру суспільства новий тип стосунків, який може скластися у зв'язку із створенням клонів і розповсюдженням клонування. Клони будуть мати проблеми із становленням особистості та свідомості, інтеграцією в людські колективи і суспільство.

Клонування обмежує генетичну різноманітність людини. Зараз терапевтичне клонування ставить деякі питання, що пов'язані з технологією його проведення. В даний час реально можлива технологія клонування, яка припускає вирощування клона *in vivo*. Таке клонування неможливе - жінка не може розглядатися як інкубатор терапевтичного матеріалу. Ця проблема вирішується шляхом розробки вирощування зародка *in vitro*. Але, залишається проблема «вбивства» зародка. З якого моменту зародок стає людиною? Можливо, що нова людина виникає у момент злиття статевих клітин (у разі клона - у момент пересадки ядра). Тому, використання зародка для вирощування трансплантатів неможливо з юридичних, етичних, соціальних норм. Для подолання цієї проблеми експериментатори намагаються почати роботу із зародком якомога раніше.

В країнах, де розроблено законодавство про клонування, репродуктивне клонування заборонене. Проте є держави, в яких питання клонування юридично не обґрунтовані, що дозволяє корисним науковцям продовжувати експерименти по клонуванню людини.

Терапевтичне клонування має значні перспективи і велике медичне значення. Так, у Великобританії терапевтичне клонування офіційно дозволене, але при цьому обмежується вік ембріона, з яким можна проводити клонування (не більше 10 тижнів).

Морально-етичні і правові проблеми при клонуванні людини.

Для здійснення клонування і на підготовчих стадіях потрібна велика кількість зигот і ембріонів. Всі вони будуть створені заради того, щоб забезпечити життя одному обраному. Проте, цей обраний може проіснувати недовго. Метою його створення може бути отримання біологічних речовин, потрібних для досліджень або лікування конкретного замовника, якому 50 чи більше років.

У багатьох виникає серйозне побоювання того, що при клонуванні дуже малий відсоток успішного клонування і великий відсоток одержання людей-мутантів. Так само не треба забувати про питання материнства, батьківства, успадкування, шлюбу. З точки зору більшості релігій клонування людини взагалі не допустимо. Патріарх Алексій II сказав: «Враховуючи колосально збільшені технічні можливості людства і розмах наслідків і безвідповідального або свідомо зловмисного їх вживання, можна сміливо сказати: якщо не буде морального відродження, гряде розквіт деструктивних сил і занепад людської історії».

Таким чином, проблема клонування людини викликає неоднозначну оцінку, з одного боку, воно потенційно приваблює з наукової точки зору, і має великі перспективи, тому що може вирішити проблеми лікування багатьох захворювань, які до цього часу вважалися невиліковними і призводили до смерті людини. З іншого боку клонування людини або клітин поки знаходиться на стадіях експерименту і говорити про глобальне медичне застосування ще рано.

Не існує етичних мотивів для використання репродуктивного клонування людини. Заборона клонування набуває все більшого поширення в різних країнах світу і на

міжнародному рівні. До заборони репродуктивного клонування людини, тобто отримання її генетичних копій, закликають Загальна декларація ООН з геному людини та прав людини, Додатковий протокол про заборону клонування людини до Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Хартія Європейського Союзу про основні права людини. Негативну оцінку клонуванню людини дали майже всі світові релігії.

Наприклад, стаття 11 Загальної Декларації ООН з геному людини та прав людини, яку підписала і ратифікувала Україна, чітко забороняє клонування: не допускається практика, яка суперечить людській гідності, така, як практика клонування з метою відтворення людської особи. Стаття 18 Конвенції про захист прав і гідності людини щодо застосування біології та медицини забороняє вирощування ембріонів для експериментальних цілей.

12 січня 1998 у Парижі було підписано Додатковий протокол до цієї Конвенції, що стосується заборони клонування людських істот. Для України він набрав чинності 1 березня 2001 року. Цей протокол забороняє будь-яке втручання з метою створення людської істоти, яка генетично ідентична іншій людській істоті, живій чи мертвій.

У 3 статті Хартії основних прав Європейського Союзу, прийнятої 7 грудня 2000 року у Ніцці також заборонено репродуктивне клонування людських істот.

Відповідно до ст. 9 Конституції України чинні міжнародні договори, згода на обов'язковість яких надана Верховною Радою України, є частина національного законодавства. Тому, на думку деяких фахівців, потреби в прийнятті такого акту немає.

Хоча у статті 11 Загальної декларації з геному людини та прав людини рекомендується державам регулювати це питання і на національному рівні: «Державам та компетентним міжнародним організаціям пропонується співпрацювати з метою виявлення такої практики та прийняття на національному та міжнародних рівнях необхідних заходів відповідно до принципів, які викладені в цій Декларації».

Сьогодні більшість країн світу заборонили клонування людини. Зокрема, Австралія, Бельгія, Великобританія, Данія, Іспанія, Італія, Нідерланди, Німеччина, Словаччина, Франція, Швейцарія, Швеція, Японія законодавчо врегулювали це питання.

14 грудня 2004 року Верховною Радою України було прийнято закон «Про заборону репродуктивного клонування людини».

Закон складається з 5 статей, стандартних для законопроектів. Відповідно до визначення, яке наведено в законі, клонування людини – це створення людини, яка генетично ідентична іншій живій або померлій людині, шляхом перенесення у залишену без ядра жіночу статеву клітину ядра соматичної клітини людини. Ключовими словами тут є створення людини. І саме це діяння заборонено.

Стаття 1 Закону забороняє саме репродуктивне клонування. Як зазначається у пояснювальній записці до законопроекту, терапевтичне клонування цим законом не забороняється і його правовий статус буде визначений пізніше після подальших наукових та громадських дискусій. Також закон забороняє ввезення на територію України та вивезення з території України клонованих ембріонів людини.

Особи, винні у порушенні Закону «Про заборону репродуктивного клонування», несуть цивільно-правову, адміністративну або кримінальну відповідальність.

І хоча дехто вважає Закон України «Про заборону репродуктивного клонування» із розряду «шкоди від нього ніякої, але користі теж», все-таки ця царина потребує поступового врегулювання в українському законодавстві, першим кроком до чого й стало таке рішення.

Слід розмежовувати поняття *репродуктивне* клонування та *терапевтичне* (медичне) клонування. Результатом репродуктивного клонування є створення нової людини, яка є генетично ідентична іншій людській істоті. Терапевтичне клонування ставить за мету не народження нової людини, а лікування важкохворих людей за допомогою створення стоволових або зародкових клітин, які потім використовуються для заміщення будь-яких

тканин. ООН відхилила ініціативу США повністю заборонити клонування. Таким чином юридично в багатьох країнах залишається можливість експериментувати і проводити терапевтичне клонування.

Таким чином, клітинна інженерія та клонування організмів на сучасному етапі розвитку молекулярної біології мають значні успіхи і перспективи практичного застосування в селекції, господарстві та практичній медицині. Але існують певні проблеми, які пов'язані з недосконалими методиками клонування, які мають низьку ефективність та неточність прогнозування одержання необхідних клонів. Виникають також етичні, юридичні та соціальні проблеми, особливо стосовно клонування ембріонів людини з метою одержання терапевтичного матеріалу. Зрозуміло, що з часом, в майбутньому методики клонування організмів і клітин удосконаляться і людство прийде до вирішення не тільки наукових, а й етичних та соціальних проблем.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абдуллаев С. А. Содержание внеклеточной митохондриальной ДНК с мутациями резко повышено в плазме крови облученных мышей / Абдуллаев С. А., Антипова В. Н., Газиев А.И. // Мол.биол. – 2009. - Т.43, №6. - С. 1063-1069.
2. Алберте Б. Молекулярная биология клетки : в 3-х т. / [Алберте Б., Брей Д., Льюис Дж. и др.]; пер. с англ. – [2-е изд. перераб. и доп.]. - М.: Мир, 1994. – Т.1. - 517 с.
3. Алберте Б. Молекулярная биология клетки : в 3-х т. / [Алберте Б., Брей Д., Льюис Дж. и др.]; пер. с англ. – [2-е изд. перераб. и доп.]. - М.: Мир, 1994. – Т.2. - 539 с.
4. Алберте Б. Молекулярная биология клетки : в 3-х т. / [Алберте Б., Брей Д., Льюис Дж. и др.]; пер. с англ. – [2-е изд. перераб. и доп.]. - М.: Мир, 1994. – Т.3. - 504 с.
5. Алмазов В. П. P53 - инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека / Алмазов В. П., Кочетков Д. В., Чумаков П. М. // Молекулярная биология. – 2007. - Т.41, № 6. - С. 947-963.
6. Аряев Н.Л. Генетическое консультирование. Принципы диагностики и ведения наследственных заболеваний и врожденных пороков развития / Аряев Н.Л. ; Генетическая медицина под ред. В. Н. Запорожана. - Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2008.
7. Афасижев Р. Редактирование РНК / Афасижев Р // Молекулярная биология. – 2007. – Т.41, № 2. - С. 260-273.
8. Бажора Ю. И. Клинические проблемы фармакогенетики / Бажора Ю. И. // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. - 2003. - № 1. - С. 82-87.
9. Бажора Ю. І. Молекулярна епідеміологія та її роль у сучасній медицині / Бажора Ю. І // Одеський медичний журнал. – 2008. - №4(108). - С. 61-68.
10. Бажора Ю.И Генетическая медицина / [Бажора Ю.И, Запорожан В.Н., Кордюм В.А. и др]. ; под ред. Запорожана В. Н.. - Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2008. - 432 с.
11. Балабанов В.И. Нанотехнологии. Наука будущего / Балабанов В.И. — М., 2009. — с.
12. Балдуева И. А. Противоопухолевые вакцины / Балдуева И. А. // Практическая онкология – 2003. - т. 4, №3. - С. 157-168.
13. Баранов В. С. Молекулярная медицина; молекулярная диагностика, превентивная медицина и генная терапия / Баранов В. С. // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34. - Вып. 4. - С. 684-695.
14. Баранов В.С. Геном человека как научная основа предикативной медицины / Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э.; геномика – медицине под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселёва. - М.: Академкнига, 2005. - 392 с.
15. Биология стволовых клеток и клеточные технологии : (в 2-х томах) / под ред. М.А.Пальцева. – М.: Медицина, 2009. – Том 1 – 272 с., Том 2 – 456 с.
16. Боринская С.А. Компьютерная геномика: в поисках генов / Боринская С.А., Гельфанд М.С., Миронов А.А. // Химия и жизнь. – 2001. - №2. - С. 36-40.
17. Бочков Н.П. Клиническая генетика: учебник. / Бочков Н.П. - [2-е изд. перераб. и доп.]- М.: ГЭОТАР - МЕД, 2002. - 448 с.
18. Браун Т. А. Геномы = Genomes / Браун Т. А. : пер. с англ. - М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2011. - 944 с.
19. Васильева В.И. Биология : учеб. для медиц. спец. вузов : (в 2-х кн.): / [Васильева В.И., Волков И.Н., Ярыгин В.Н., Синельщикова В.В.] : под ред. Ярыгина В.Н.. – [7-е изд.] - М.: Высш. шк., 2005. - Кн. 1. - 431 с.
20. Вазири Х. Критическое укорочение теломер / Вазири Х. - Биохимия – 1997. – Т. 62. - С. 1528-1527.
21. Введение в молекулярную медицину / под редакцией Пальцева М.А. - М.: ОАО «Издательство «Медицина»», 2004. - 496 с.

22. Великий М.М. Медична біотехнологія: генна терапія : матеріали конференції “Новітні досягнення біотехнології” (Київ, 2010) / Київ. – 2010. – С. 14-15.
23. Велц Р. Моделирование и синтез рибозимов / [Р. Велц и др.] // Молекулярная биология. – 2000. – Т. 34, Вып. 6.- С.1090-1096.
24. Вильгельм А. Э. Интерференция РНК: биология и перспективы применения в биомедицине и биотехнологии / Вильгельм А. Э., Чумаков С. П., Прасолов В. С. // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 3. - С. 387-403.
25. Воронина Л.Н. Основы биохимической инженерии : учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Воронина Л.Н., Шоно Н.А., Загайко А.Л. - Харьков: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2004. - 240 с.
26. Геном, клонирование, происхождение человека / под редакцией члена- корреспондента РАН Корочкина Л.И. - Фрязино: Век 2, 2004. - 224 с.
27. Георгиев П. Г. Различные механизмы регуляции длины теломер / [П. Г. Георгиев и др.] // Молекулярная биология. - 2000. - Т. 34., N 5. — С. 743-752.
28. Глазко В.И. Генетически модифицированные организмы: от бактерий до человека / Глазко В.И. – Киев: Из-во “КВІЦ”, 2002. – 210 с.
29. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Глик Б., Пастернак Дж.: под ред. Янковского Н. К. : пер. с англ. - М.: Мир, 2002. - 589 с.
30. Глякина А. В. Поиск структурных факторов, ответственных за стабильность белков из термофильных организмов / [А. В. Глякина и др.] // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41. — Вып. 4. — С. 681 — 687.
31. Голденкова-Павлова И.В. Экспериментальные модели для создания *трансгенных* растений, устойчивых к стрессовым факторам / [Голденкова-Павлова И.В., Мирахорли Н., Маали А.Р. и др.] // Цитология и генетика. – 2007. - №3. - С. 44-49.
32. Гороховский С. Л. Специфичность расщепления ДНК ультразвуком / Гороховский С. Л. // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 2. - С. 317-325.
33. Губский Ю.И. Геном, метаболизм, болезни, лекарства / Губский Ю.И, Левицкий ЕЛ. // Лікування та діагностика. - 2000-2001. - №4-1. - С. 23-29.
34. Гусар В. А. Мінливість та поліморфізм мітохондріальної ДНК української популяції / Гусар В. А. // Журнал АМН України. – 2006. – Т.12, №4. - С. 739-749.
35. Дейнеко Е.В. Нестабильность экспрессии гена *nptII* у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) при инбридинге / [Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Филипенко Е.А. и др.] // Генетика. - 1998. - № 9.- С. 1212-1219.
36. Дуган А.М. Критерии учета мутагенных эффекторов в тесте Еймса / А.М. Дуган, В.С. Сурков, С.К. Абилов // Генетика и цитология. — 1990. — Т. 24, № 6. — С. 41-45.
37. Дурнев А.Д. Мутагены / Дурнев А.Д., Серединин С.Б.. - М.: Медицина, 1998. - 328 с.
38. Дымшиц Г.М. Молекулярная биология / Дымшиц Г.М.. - HTML, 2000. - 200 с.
39. Дьяченко О.В. Структурно-функциональные особенности распределения 5-метилцитозина в эукариотическом геноме / Дьяченко О.В., Шевчук Т.В., Бурьянов Я.И. // Молекулярная биология. – 2010. – Т.44, № 2. - С.195-210.
40. Евгеньев М. Б. Мобильные элементы и эволюции генома / Евгеньев М. Б. // Молекулярная биология. – 2007. – Т.41, 2. - С. 234-245.
41. Жегунов Г.Ф. Цитогенетические основы жизни : учебное пособие для студентов в.у.з. / Жегунов Г.Ф., Жегунова Г.П. - Х.: Золотые страницы, 2004. - 672 с.
42. Журавлева Г. А. Возникновение новых белков за счет дубликации генов - что общего в эволюции зрительных светочувствительных белков и факторов терминации трансляции /

- Журавлева Г. А., Инге-Вечтомов С. Г. // Молекулярная биология. – 2009. – Т. 43, № 5. - С. 759-771.
43. Залесский В.Н. Молекулярная визуализация в медицине: проблемы и перспективы / Залесский В.Н., Дынник О.Б. // Укр. мед. часопис. — 2005. — № 2 (46). – С. 76-83.
44. Залесский В.Н. Современные терапевтические подходы для направленной регуляции апоптоза / Залесский В.Н., Дынник О.Б., Фильченков А.А. // Журн. АМН Украины. – 2006. - Т. 12, № 4. - С. 634-652.
45. Запорожан В.М. Генетичні передумови здоров'я нації / Запорожан В.М. // Журн. АМН України. – 2007. - Т.13, №3. - С. 455-463.
46. Запорожан В.М. Медична генетика: підручник для вузів / Запорожан В.М., Бажора Ю.І., Шевеленкова А.В., Чеснокова М.М. - Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2005. - 260 с.
47. Запорожан В.М. Стовбурові клітини / Запорожан В.М., Бажора Ю.І. - Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2004. - 228 с.
48. Зверева М. Э. Структура и функция тмРНК (10Sa РНК) / [М.Э.Зверева и др.] // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34., Вып. 6. — С. 1081 — 1089.
49. Зеленин А. В. Введение в геномику растений / [А. В. Зеленин и др.] // Молекулярная биология. - 2000. — Т. 35, Вып. 3. — С. 339 — 348.
50. Жимулёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика / Жимулёв И. Ф. - Новосибирск: Изд-во Сибирского ун-та, 2003. - 479 с.
51. Карпов О.В. Клітинна та генна інженерія : підручник / Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С.. – Київ: Фітосоцінцентр, 2010. – 208 с.
52. Киселев Л.Л. Геном человека и биология XXI века / Киселев Л.Л. // Вестник РАН. – 2001.- Т.70. - С. 412-424.
53. Кларк Д. Молекулярная биология: простой и занимательный подход / Кларк Д., Рассел J.I.; пер. с англ. – [2-е изд.]. - М. ЗАО «Компания КОНД», 2004. - 472 с.
54. Колодяжная Я.С. Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам / [Колодяжная Я.С., Куцоконь Н.К., Левенко Б.А. и др.] // Цитология и генетика. – 2009. - №2. - С. 72-87.
55. Конов А.Л. Генная инженерия растений в компании Монсанто: от первых лабораторных опытов до практического применения во всем мире / Конов А.Л., Велчев М., Переел Д. // Цитология и генетика. – 2005. - №3. - С. 3-12.
56. Коничев А.С. Биохимия и молекулярная биология: Словарь терминов / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. — М.: Дрофа, 2008. — 359 с.
57. Коничев А.С. Молекулярная биология : учебник для студентов учреждений высшего профессионального образования / Коничев А.С., Севастьянова Г.А. - [4-е изд. перераб. и доп.]. – М.:Издательский центр «Академия», 2012. – 400 с.
58. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Копнин Б.П. //Биохимия, 2004. - С. 5-23.
59. Кордюм В.А. Введение в генетическую медицину / Кордюм В.А. : под ред. В.Н. Запорожана. - Одесса: Одес. гос. мед. ун-т., 2008. - С. 10-40.
60. Кордюм В.А. Наша «шагреновая кожа» - это наша проблема. Нам её и решать. 6. Возврат долга / Кордюм В.А. // Біополімери і клітина. - 2005. – Т. 21, № 6. - С. 485-514.
61. Корнберг А. Синтез ДНК / Корнберг А.. - М.: Миф, 1977. - 359 с.
62. Котельников Р. И. Белки, связывающие РНК, в процессах РНК-интерференции / [Котельников Р. И., Шпиз С. Г., Калмыкова А. И., Гвоздев В. А.] // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 4. - С. 595-608.

63. Косован А.И. Прогностические фармакогенетические аспекты индивидуальной лекарственной переносимости - нерешенные проблемы и перспективы / [Косован А.И., Яковлева О.А., Царук В.В., Дякова О.В.] // Укр. хіміотерапевт. журнал. - 2000. - № 1. - С. 63-70.
64. Кресюн В.И. Фармакогенетические основы взаимодействия организма и лекарств / Кресюн В.И., Бажора Ю.И. - Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2007. - 164 с.
65. Крулько І. В. Роль siRNA та miRNA у процесах РНК-залежного «мовчання» генів при вірусних інфекціях / Крулько І. В., Устьяненко Д. О., Поліщук В. П. // Цитология и генетика. 2009. – Т. 43, № 1. - С. 78-90.
66. Крутиков В. М. Эукариотические ДНК-полимеразы, склонные к ошибкам: предполагаемая роль в репликации, репарации и мутагенезе / Крутиков В. М. // Молекулярная биология. – 2006. – Т.40, №1. - С. 3-11.
67. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты / Кукес В.Г. - М.: Реафарм, 2004. - С. 18-27.
68. Кунин Е. В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции / Кунин Е. В. : пер. с англ. The Logics of Chance. The Nature and Origin of Biological Evolution. - М: ЗАО Издательство Центрполиграф, 2014. - 527с.
69. Куренова Е.В. О функциях теломер / Куренова Е.В., Мейсон Д.М. – Биохимия, 1997. - 62. - С. 1453-1466.
70. Лебедев Ю. Б. Эндогенные ретровирусы: возможная роль в функционировании клеток человека / Лебедев Ю. Б. // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34., Вып. 4. - С. 635-645.
71. Лекомцев С. А. Вариантные генетические коды и терминация трансляции / Лекомцев С. А. // Молекулярная биология, 2007. – Т.41, № 6. - С. 964-972.
72. Лівшиць Л. А. Роль геноміки в медицині / Лівшиць Л. А. // Журнал АМН України. – 2003. – Т. 9, № 4. - С. 681-689.
73. Лукьянова Н.Ю. Роль генов p53 и bcl-2 в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей / Лукьянова Н.Ю., Кулик Г.И., Чехун В.Ф. // Вопр. онкол. - 2000. - №2. - С. 121-128.
74. Макарова Ю.А. Некодирующие РНК / Ю. А. Макарова, Д. А. Крамеров // Биохимия. — 2007. — Т. 72., Вып. 11. — С. 1427 —1448.
75. Малярчук Б. А. «Холодные» точки гипервариабельного сегмента 1 митохондриальной точки ДНК человека / Малярчук Б. А. // Молекулярная биология. – 2008. – Т.42, № 3. - С. 454-458.
76. Матвеева Н.А. Генетическая трансформация хлоропластной ДНК *Solanum rickii* / Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Кучук Н.В. // Цитология и генетика. – 2005. - №5. - С. 3-8.
77. Медицинские лабораторные технологии : справочник / под редакцией проф. А.И. Карпищенко. - Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. - 600 с.
78. Мишуніна Т.М. Основні молекулярні механізми апоптозу та їх порушення при канцерогенезі щитоподібної залози / Мишуніна Т.М., Тронько М.Д. // Журн. АМН України. – 2006. - №4. - С.611-633.
79. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. Херрингтона С., Макги Дж. : пер. с англ. - М.: Мир, 1999. - 558 с.
80. Молекулярная патология белка / под ред. член-кор. АМН Украины, проф. Заболотного Д.И. - К.: Логос, 2008. - 236 с.
81. Мушкамбаров Н. Н. Молекулярная биология : учебное пособие для студентов медицинских вузов / Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. - 544 с.
82. Мюльберг А.А. Фолдинг белка / Мюльберг А.А. — СПб.: Изд-во С.-Пб. ун-та, 2004.

83. Новиков В.С. Генная регуляция апоптоза : в кн. Программированная клеточная гибель / Новиков В.С., Ястребова Д.В., Баткин М.Ю. - СПб.: Наука, 1996. - С. 72-78.
84. Овчаренко О.О. Мобільні генетичні елементи рослин та їх використання в генетиці та біотехнології / Овчаренко О.О., Рудас В.А., Кучук М.В. // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 4. – С. 68-80.
85. Орлов В. Д. Медицинская химия : учебник для студентов химических специальностей вуз / Орлов В. Д., Липсон В.В., Иванов В.В. - Х.: Фолио, 2005. - 461 с.
86. Осинский С.П. Молекулярная диагностика опухолей: фундаментальные основы и практическое применение / [Осинский С.П., Глузман Д.Ф., Клифф Й. и др.] - К.: ООО «DIA», 2007. - 248 с.
87. Павліченко В.І. Основи молекулярної біології : навчальний посібник / Павліченко В.І., Пішак В.П., Булик Р.Є. – Чернівці: Медуніверситет, 2012. – 388 с.
88. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину / Пальцев М.А. - М.: ОАО «Изд. медицина», 2004. - 496 с.
89. Повещенко А.Ф. Цитокины — факторы нейроэндокринной регуляции / Повещенко А.Ф., Абрамов В.В., Козлов В.В. // Успехи физиологических наук.- 2007.- В.3., Т. 38.- С. 40—46.
90. Примроус С. Геномика. Роль в медицине / С. Примроус, Р.Тваймен. — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2008. — 277с.
91. Пузырёв В.П. Патологическая анатомия генома человека / Пузырёв В.П., Степанов В.А. - Новосибирск: Наука. Сиб. предпр. РАН, 1997. - 224с.
92. Ребриков Д.В. ПЦР «в реальном времени» / Ребриков Д.В. - Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – с.
93. Ридли М. Геном: автобиография вида в 23 главах / Ридли М.. - М.: Эксмо, 2008. - 432 с.
94. Рис Э. Введение в молекулярную биологию: От клеток к атомам / Рис Э., Стернберг М. : пер. с англ. - М.: Мир, 2002. - 142с.
95. Рогаев Е. В. МикроРНК человека в норме и патологии / [Рогаев Е. В., Боринская С. А., Исламгулов Д. В., Григоренко А. П.] // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 5. - С. 751-764.
96. Рубцов Н.Б. Организация хромосомных территорий / Рубцов Н.Б. // Природа. - 2007. - №8. - С 15-21.
97. Рязанцева Н.В. Молекулярная медицина и вирусные инфекции: современный взгляд на проблему и стратегию взаимоотношений / Рязанцева Н.В. // Бюллетень сибирской медицины. - 2008. - № 2. - С. 5-13.
98. Самуилов В.Д. Биохимия программируемой клеточной смерти (апоптоза) у животных / Самуилов В.Д. // Сорос, обр. журнал . – 2001. - №10. - С. 18-25.
99. Свердлов Е.Д. Перспективы использования достижений геномики в медицине. Начало эры полногеномной медицинской генетики / Свердлов Е.Д. // Патол., физиол., эксперим. терапия. - 2001. - №1 - С.3-22.
100. Серединин С.Б. Лекции по фармакогенетике / Серединин С.Б. - М.: МИА, 2004. - 303с.
101. Сингер М. Гены и геномы : в 2-х т. / Сингер М., Берг П. : пер. с англ. - М.: Мир, 1998. - Т. 1. - 373 с.
102. Сингер М. Гены и геномы : в 2-х т. / Сингер М., Берг П. : пер. с англ. - М.: Мир, 1998. - Т.2. - 391 с.
103. Скоблов М.Ю. Перспективы технологий антисмысловой терапии / Скоблов М.Ю. // Молекулярная биология. – 2009. - №6 - С. 984-998.
104. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Организм / Скулачев В.П. // Сорос. обр. журнал. – 2001. - №10. - С. 2-6.

105. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: Роль активных форм кислорода / Скулачев В.П. // Сорос, обр. журнал. – 2007. – №6. – С. 4-11.
106. Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов / под ред. С.В. Калюжного. – М., 2010. – 528 с.
107. Сологуб М. Ю. Транскрипция и ее регуляция в митохондриях млекопитающих и человека / Сологуб М. Ю., Кочетков С. Н., Темяков Д. Е. // Молекулярная биология. – 2009. – Т.43, № 2. – С. 215-229.
108. Спириин А.С. Биосинтез белка: Регуляция на уровне трансляции / Спириин А.С. // Сорос. обр. журнал. – 2000. – №5. – С. 2-7.
109. Спириин А. С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка / Спириин А.С. - М.: Издательский центр «Академия», 2011. – 496 с.
110. Старокадомский П.Л. Белковый сплайсинг / Старокадомский П.Л. // Молекулярная биология. - 2006. – Т.41, № 2. - С. 314-330.
111. Суходолец В.В. Значение рекомбинаций, происходящих в процессе репликации ДНК / Суходолец В. В. // Молекулярная биология. – 2006. – Т.40, № 2. - С. 369-371.
112. Тамкович С. Н. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике / Тамкович С. Н., Власов В. В., Лактионов П. П. // Молекулярная биология. – 2008. – Т.42, № 1. - С. 12-23.
113. Тарантул В. З. Геном человека: энциклопедия, написанная четырьмя буквами / Тарантул В. З. — М.: Языки славянской культуры, 2003. — 392 с.
114. Трахтенберг И.М. Генетическая токсикология / Трахтенберг И.М., Левицкий Е.Л.: генетическая медицина под ред. В.Н. Запорожана. - Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2008. - С. 183-216.
115. Уайтсайдс Дж. Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направления исследований / Дж. Уайтсайдс, Д. Эйглер, Р. Андерс.: под. ред. М.К. Роко, Р.С. Уильямса и П. Аливисатоса. : пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 292 с.
116. Уотсон Дж. Молекулярная биология гена / Уотсон Дж. - М.: Миф, 1978. - 720 с.
117. Фаллер Д. М. Молекулярная биология клетки : руководство для врачей / Фаллер Д. М., Шилдс Д. : пер. с англ. - М.: БИНОМ - Пресс, 2003. - 272 с.
118. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навчальний посібник для студентів біологічних факультетів університетів / [В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець]. — Львів, 2005. – с.
119. Федченко С.Н. Молекулярно-генетические основы онтогенеза : учебное пособие для студентов медицинских вузов / Федченко С.Н. - Луганск, 2003. - 336 с.
120. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3-х т.: Пер. с англ. - М.: Мир, 1990.
121. Фрейдин М.Б. Геномные основы подверженности инфекционным заболеваниям / [Фрейдин М.Б., Гончарова И.А., Рудко А.А. и др.] // Молекулярная медицина. - 2006. - № 3. – С. 39-46.
122. Фролов А. Ф. Молекулярная эпидемиология - неотъемлемая часть эпидемиологии инфекционных болезней (обзор литературы). Профілактична медицина / Фролов А. Ф. // Журнал АМН України. – 2005. – Т.11, № 2. - С. 555-570.
123. Фуралев В. А. Малые интерферирующие РНК к гену миостатина человека / Фуралев В. А., Кравченко И. В., Попов О.В. // Молекулярная биология. – 2009. – Т.43, № 4. - С. 636-641.
124. Хартманн У. Очарование нанотехнологии / Хартманн У.: пер. с нем. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. - 173 с.
125. Хемлебен В. Сателлитная ДНК / [Хемлебен В., Беридзе Т. Г., Бахман Л. и др.] // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. - С. 267-306.

- 126.Худолей В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия / Худолей В.В. - СПб., 1999. - 364 с.
- 127.Ценева Г.Я. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний / Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4, № 3. - С. 248-266.
- 128.Цыганенко А.Я. Клиническая биохимия : учебник для студентов медицинских вузов / [Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Леонов В.В. и др.] – [2-е изд., перер. и доп.] - Х.: Факт, 2005. - 456 с.
- 129.Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию : учебник для вузов / Ченцов Ю.С. – [4-е изд., перераб. и доп.]. - М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. - 495 с.
- 130.Чернов Ю.Н. Метаболизм лекарственных средств: индивидуальные генетически детерминированные особенности / Чернов Ю.Н., Роотс И., Чайкович Е.А. // В мире лекарств. - 2001. - № 1. - С. 24-31.
- 131.Чехун В.Ф. Клиническая онкогенетика / Чехун В.Ф., Полищук Л.З., Бучинская Л.Г. Генетическая медицина : под ред. В.Н. Запорожана. - Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2008.
- 132.Чумаков С. П. Организация и регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта / С. П. Чумаков, В. С., Прасолов // Молекулярная биология. - 2010.- Т. 44, Вып. 2. – С. 211-228.
- 133.Чумаков П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью / Чумаков П.М. // Биохимия — 2000, - Т.65, № 1 - С. 34-47.
- 134.Чуриков Н.В. Молекулярные механизмы эпигенетики / Чуриков Н.В. // Биохимия. – 2010. - Т. 70, №4. - С. 493-513.
- 135.Шадрина М.И. Значение митохондриальной дисфункции и окислительных повреждений в молекулярной патологии болезни Паркинсона / Шадрина М. И., Сломинский П. А. // Молекулярная биология. – 2008. – Т.42, № 5. - С. 809-819.
- 136.Шахбазов А.В. Генная терапия на основе мезенхимальных стволовых клеток человека: Стратегии и методы / [Шахбазов А.В., Космачева С. М., Картель Н.А., Потапнев М.П.] // Цитология и генетика. - 2010. - №1. - С. 76-81.
- 137.Шумный В.К. Генная и хромосомная инженерия растений / Шумный В.К. // Вестник российской академии наук. - 2001. – Т. 71, № 8. - С. 725-732.
- 138.Alberti S. Molecular mechanisms of spatial protein quality control / Alberti S. // Prion. - 2012. - В.5, Т.6. - P. 437-442.
- 139.Andries K. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis / [Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., et al.] // Science 2005. - 307. - P. 223-227.
140. Angly F.E. The marine viromes of four oceanic regions / [Angly F.E., Felts B., BreitbartM., et al.] // PLoS Biol. – 2006. – 4. - P. 368 - 375.
- 141.Berman H. M. The Protein Data Bank: a historical perspective / Berman H. M. // Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography A64 (1). – 2008. - P. 88–95.
- 142.Brass A. L. Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen / [Brass A. L., Dykxhoom D. M., Benita Y., et al.] // Science. – 2010. — P. 1126-1137.
- 143.Bender A. Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria / Bender A., Hajieva P., Moosmann B. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. – 105. —P. 16496-16501.
- 144.Campbel N.A. Biology / Campbel N.A., Reece J.B. [sixth edition] // Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 2002. - 1247 p.
- 145.Campbell A.M. Discovering genomics, proteomics, and bioinformatics / Campbell A.M., Heyer L.J. - CSHL Press, 2003. – 352 p.

146. Cell-free protein synthesis and assembly on a biochip / [Y. Heyman, A. Buxboim, S.G. Wolf et al.] // *Nature Nanotechnology*.— 2012.— Vol.7. - № 6.
147. Cheung F. Sequencing *Medicago truncatula* expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology / [Cheung F., Haas B.J., Goldberg S.M., et al.] // *BMC Genomics* 2006. - 7. - P. 272-281.
148. Church D.M. Lineage-Specific Biology Revealed by a Finished Genome Assembly of the Mouse / [Church D.M, Goodstadt L., Hillier L.W., et al.] // *PLoS Biol* 2009. - 7(5). - P.64-76.
149. Conner A.J. The release of genetically modified crops into the environment, part II / [Conner A.J. et al.] // *Plant J.* - 2003. - 33. - P. 19-46.
150. Edwards R.A. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology / [Edwards R.A., Rodriguez-Brito B., Wegley L., et al.] // *BMC Genomics* 2006. - 7. - P. 57-69.
151. Fortunato A. Uncover genetic interactions in *Caenorhabditis elegans* by RNA interference / Fortunato A., Fraser A.G. - *Biosci*, 2005. - Rep.25. - 299-307.
152. Winston W.M. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1 / Winston W.M., Molodowitch C., Hunter C.P. // *Science*. - 2002. - 295. - P. 2456-2459.
153. Hunter C.P. Systemic RNAi in *Caenorhabditis elegans* / Hunter C.P. *et al.* / *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. - 2006. - 71. - P. 95-100.
154. Huber F. Biosensors: new leverage against superbugs / Huber F., Lang H.P., Gerber C. // *Nature Nanotechnology*.— 2008.— Vol. 3, №11.
155. Goldberg S.M. A Sanger pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes / [Goldberg S.M., Johnson J., Busam D. et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. - 103. - P. 11240-11245.
156. Gould D. J. Vectors for the treatment of autoimmune disease / Gould D. J. and Favorov P. // *Gene Therapy*. - 2003. - V. 10, N. 10. - P. 912-927.
157. Green R.E. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA / [Green R.E., Krause J., Ptak S.E., et al.] // *Nature* 2006. - 444. - P. 330-336.
158. Gilbert M.T. Whole- genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts / [Gilbert M.T., Tomsho L.P., et al.] // *Science*. - 2007. - 317. - P. 1927-1930.
159. Ichiro Hiratani. Genome-wide dynamics of replication timing revealed by in vitro models of mouse embryogenesis / [Ichiro Hiratani et al.] // *Genome Res.* - 2010. - № 20 (2). - P. 155-169.
160. Ledergerber C. Base-calling for next-generation sequencing platforms. / Ledergerber C., Dessimoz C. - *Brief. Bioinform.* - 2010. - 12. - P. 489-497.
161. Liu S.C. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia necrosis / [Liu SC et al.] // *Gene Ther.* - 2002. - 9(4). - P. 291-296.
162. Margulies M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors / [Margulies M., Egholm M., Altman W.E. et al.] // *Nature* 2005. - 437. - P. 376-380.
163. Ming Q Wei. Clostridial spores as live 'Trojan horse' vectors for cancer gene therapy: comparison with viral delivery systems. / [Ming Q Wei et al.] // *Genetic Vaccines and Therapy*. - 2008. - 6. - P. 8-15.
164. Ming Q Wei. Clostridial spores as live 'Trojan horse' vectors for cancer gene therapy: comparison with viral delivery systems / Ming Q Wei, Ruimei Ren, David Good & Jozef Ann // *Genetic Vaccines and Therapy*. - 2008. - 6. - P. 8-12.
165. Nap J.P. The release of genetically modified crops into the environment, part I / [Nap J.P. et al.] // *Plant J.* - 2003. - 33. - P. 1-18.
166. Noonan J.P. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA / Noonan J.P., Coop G., Kudaravalli S., et al. // *Science* 2006. - 314. - P. 1113-1118.
167. Ohtsu K.. Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize (*Zea mays* L.) / [Ohtsu K., Smith M.B., Emrich S.J. et al.] // *Plant J.* 2007. - P. 391-404.

168. Poinar H.N. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA / [Poinar H.N., Schwarz C, Qi J., Shapiro B. et al.] // *Science* 2006. – 311. - P. 392-394.
169. Roberts RJ. REBASE-enzymes and genes for DNA restriction and modification / Roberts RJ., Vincze T., Posfai J., Macelis D. // *Nucleic Acids Res.* - 2007. - 38, D234—D236.
170. Saxena D. Release of Larvicidal Cry Proteins in Root Exudates of Transgenic Bt Plants. / Saxena D., Stotzky G. - *ISB News Report*, 2005. - P.1-3.
171. Temple Gary The completion of the Mammalian Gene Collection (MGC) / [Temple Gary et al.] // *Genome Res.* 2009. - 19(12). - P. 2231-2244.
172. The International Human Genome Sequencing Consortium. The Human Genome: Initial Sequencing and Analysis // *Nature*, 2001. - V. 409. - P. 806-921.
173. Thomas R.K. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer / [Thomas R.K., Baker A.C., DeBiasi R.M., et al.] // *Nat Genet.* - 2007. – 39. - P. 347-351.
174. Twyman R.N. SNP discovery and typing technologies for pharmacogenomics / Twyman R.N. // *Curr Top. Med. Chem.* - 2004. - Vol. 4, N 13. - P. 299-309.
175. Velicer G.J. Comprehensive mutation identification in an evolved bacterial cooperator and its cheating ancestor / [Velicer G.J., Raddatz G., Keller H., et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006. – 103. - P. 8107-8112.
176. Venter J.C. The sequence of the human genome / [Venter J.C et al.] // *Science*, 2001. - p. 1304-1351.
177. Verma I.M. Gene therapy: twenty-first century medicine / Verma I.M., Weitzman M.D. // *Annual Rev. Biochemistry* – 2005. – V.74. – P. 711-738.
178. Watson J. D. DNA. The secret of life / Watson J. D. - William Heinemann. London, 2003. - P. 191.
179. Walsh G. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins / Walsh G., Jefferis R. // *Nat Biotechnol.* - 2006. - B.10.- T.24.- C.1241-1252.
180. Wei M.Q. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours / [Wei M.Q. et al.] // *Eur J Cancer.* – 2007. - 43(3). - P. 490-6.
181. Yahav T. Cryo-electron tomography: gaining insight into cellular processes by structural approaches / [Yahav T., Maimon T., Grossman E., Dahan I., Medalia O.] // *Curr Opin Struct Biol.* - 2011.- B.5.- T. 21.- C.670-677.
182. Zhang M. Inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) by RNA interference in A549 cells / [Zhang M. et al.] // *Acta farmacol Sin* 2004. - 25(1). - P. 61-75.
183. Zlobin V.I. Tick-borne encephalitis / [Zlobin V.I., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. et al.] // *Progress in encephalitis research.* New York: Nova Science Publishers Inc., 2005. - P. 31-57.
184. Zupan J. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights / [Zupan J. et al.] // *Plant J.* - 2000. — №1. - P. 11-28.

ЗМІСТ

| | |
|---|-----|
| Молекулярні основи спадковості. Введення в молекулярну біологію | 5 |
| Макромолекули як об'єкти вивчення молекулярної біології | 21 |
| Будова, функції і властивості ДНК | 57 |
| Молекулярна організація генів | 104 |
| Експресія генів | 114 |
| Регуляція експресії генів | 142 |
| Організація геномів неклітинних і клітинних організмів | 170 |
| Організація генома еукаріотів | 191 |
| Регуляція клітинного циклу. Апоптоз | 237 |
| Онкогенетика. Генетичні механізми канцерогенезу | 258 |
| Дослідження нуклеїнових кислот. Методи ДНК-діагностики | 286 |
| Методи генної інженерії | 313 |
| Трансгенні організми. Генотерапія | 336 |
| Клонування організмів і клітин | 364 |
| Література | 386 |