

Міністерство освіти і науки України
Черкаський національний університет
імені Богдана Хмельницького

Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О., Шмиголь І.В.

Основи молекулярної біології
(курс лекцій)

Черкаси 2013

УДК 577.2(075.8)
ББК 28.007я73
Б 63

Рецензенти:

Коваленко С.О., д.б.н., професор кафедри анатомії, фізіології та фізичної реабілітації Черкаського національного університету імені Богдана Хмельницького

Загоруйко Н.В. к.б.н., доц. кафедри екології Черкаського державного технологічного університету

Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О., Шмиголь І.В.

Б 63 Основи молекулярної біології (курс лекцій). – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 255 с.

У лекційному курсі розглядаються основні питання, які стосуються особливостей процесів життєдіяльності, організації генетичних структур представників різних таксономічних груп живих організмів, а також вірусів і бактеріофагів, з'ясовуються молекулярні механізми збереження, передачі і реалізації генетичної інформації, їх регуляції та забезпечення стабільності геномів.

Посібник рекомендовано для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації напряму підготовки «Біологія».

ISBN978-966-353-300-1

ББК 28.007я73
УДК 577.2(075.8)

Рекомендовано до друку Вченою радою Черкаського національного університету імені Богдана Хмельницького (протокол № 3 від 01 лютого 2013 р.)

ISBN 978-966-353-300-1

© ЧНУ ім. Б.Хмельницького, 2013
© Ф.Ф. Боєчко, Л.О. Боєчко,
І.В. Шмиголь, 2013

ЗМІСТ

Передмова

Тема. Вступ до курсу молекулярної біології

1. Предмет і завдання молекулярної біології.....	7
2. Етапи розвитку молекулярної біології.....	8
3. Методи молекулярної біології	12

Тема. Молекулярні аспекти процесів життєдіяльності

1. Життя, як вища біологічна форма руху живої матерії.....	19
2. Критерії, характерні для живих організмів.....	22
3. Рівні організації живої матерії.....	25
4. Принципи організації живих систем.....	29

Тема. Властивості та функції нуклеїнових кислот

1. Властивості нуклеїнових кислот.....	34
2. Функції ДНК та різних видів РНК.....	44
3. Виділення, кількісне та якісне визначення нуклеїнових кислот.....	47
4. Методи вивчення структури нуклеїнових кислот.....	49

Тема. Організація генетичних структур вірусів і бактеріофагів

1. Загальне поняття про геном, його специфічні риси.....	54
2. Особливості будови вірусних геномів	58
3. Класифікація ДНК- та РНК-геномних вірусів	60
4. Структурна організація геному окремих вірусів і бактеріофагів.....	61

Тема. Структурна організація геному прокариот

1. Особливості структурної організації геному прокариот.....	66
2. Цитоплазматичні генетичні структури геному прокариот (плазмід та епісоми).....	72
3. Мобільні генетичні елементи геному прокариот (IS-елементи і транспозони).....	74

Тема. Структурна організація геному еукаріот

1. Особливості структурної організації геному еукаріот.....	76
2. Організація генів на структурі геномів еукаріот.....	78
3. Геном ДНК-вмісних цитоплазматичних структур.....	82
3.1. Геном мітохондрій.....	82
3.2. Геном хлоропластів.....	85
4. Мобільні генетичні елементи геному еукаріот.....	87

Тема. Матричний синтез біополімерів. Загальні закономірності реплікації

1. Види матричного синтезу біополімерів.....	92
2. Загальні закономірності реплікації.....	95
3. Реплікація в клітинах прокаріот.....	98
4. Реплікація ДНК бактеріальних плазмід.....	105

Тема. Особливості реплікації ДНК у клітинах еукаріот та у геномах вірусів

1. Реплікація ДНК у клітинах еукаріот.....	107
2. Постреплікативна модифікація ДНК.....	110
3. Механізми реплікації вірусних геномів.....	112
3.1. Реплікація РНК-геномних вірусів (РНК-залежний синтез РНК)	112
3.2. Реплікація ДНК-геномних вірусів).....	113

Тема. Захист генетичної інформації та підтримання стабільності геному

1. Безреплікативна репарація. Супресії.....	117
2. Пряма безреплікативна репарація ушкоджень ДНК (реактивація)....	118
3. Постреплікативна репарація ДНК (репарація помилок реплікації)...	122
4. Захист геному від чужорідного генетичного матеріалу.....	126
5. Пригнічення відтворення у клітині чужорідного генетичного матеріалу.....	128
6. Пригнічення експресії інтегрованого чужорідного геному.....	129
7. Молекулярні механізми апоптозу.....	130

Тема. Передача генетичної інформації. Пряма та зворотна транскрипція

1. ДНК-залежний синтез РНК (пряма транскрипція).....	135
2. Транскрипція у клітинах прокаріот.....	138
2.1. Ініціація транскрипції.....	138
2.2. Елонгація транскрипції.....	140
2.3. Термінація транскрипції.....	141
3. Регуляція транскрипції у прокаріот (індукція і репресія).....	142
4. РНК-залежний синтез ДНК (зворотна транскрипція).....	146

Тема. Транскрипція в клітинах вищих еукаріот

1. Особливості транскрипції в клітинах вищих еукаріот.....	150
2. Посттранскрипційна модифікація первинних транскриптів (процесінг РНК).....	152

2.1. Процесінг пре-іРНК.....	153
2.2. Процесінг пре-рРНК.....	156
2.3. Процесінг пре-тРНК.....	157
3. Регуляція транскрипції генів у клітинах еукаріот.....	158

Тема.Реалізація генетичної інформації. Матричний синтез білка.

1. Передумови формування поняття про матричний синтез білка.....	163
2. Молекулярні механізми передачі та реалізації генетичної інформації (генетичний код).....	165
3. Характеристика компонентів білоксинтезуючої системи.....	172

Тема. Основні етапи білкового синтезу (рекогніція і трансляція)

1. Рекогніція (пізнавання).....	177
2. Трансляція: ініціація, елонгація, термінація.....	179
3. Регуляція інтенсивності трансляції у клітинах про- і еукаріот.....	188
4. Посттрансляційна модифікація білків та їх транспорт.....	191

Тема.Молекулярні механізми формування біологічних структур

1. Самовільна організація біологічних структур.....	194
2. Опосередковане формування біологічних структур.....	197
3. Спрямована або вимушена організація біологічних структур.....	198

Тема.Генна інженерія

1. Предмет та завдання генної інженерії.....	206
2. Основні етапи створення генетично модифікованих організмів.....	209
2.1. Отримання індивідуальних генів або їх фрагментів.....	210

Тема.Методи отримання рекомбінантних ДНК та їх використання

1. Підбір специфічних молекулярних векторів.....	220
2. Одержання комбінантних ДНК.....	229
3. Інтегрування рекомбінантних ДНК у клітинах-реципієнтах.....	231
4. Відбір та клонування клітин, які включають рекомбінантні ДНК....	234

Тема.Досягнення та перспективи розвитку генно-інженерних досліджень

1. Трансформація та трансгенне отримання рослинних організмів.....	237
2. Трансгенот тваринних організмів.....	242
3. Застосування досягнень генної інженерії в медицині.....	246
Список рекомендованої літератури.....	254

ПЕРЕДМОВА

Курс лекцій з молекулярної біології рекомендовано для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації, освітньо-кваліфікаційного рівня “Бакалавр”, на пряму підготовки 6.040102 – Біологія. Теоретичний матеріал курсу може бути використаний також вчителями та учнями загальноосвітніх шкіл в класах з поглибленим вивченням біологічних дисциплін. Обсяг курсу лекцій відповідає навчальній програмі з дисципліни “Молекулярна біологія”, яка вивчається в VI семестрі після освоєння курсу біохімії, в якому детально розглядається хімічний склад, будова, функції та обмін сполук, що складають основу структури живих організмів та процесів їх життєдіяльності.

Оскільки об’єктом вивчення молекулярної біології є субклітинні генетичні структури представників різних таксономічних груп організмів, а також вірусів і бактеріофагів, значна увага в курсі лекцій звертається на з’ясування особливостей їх структурної організації і функцій. Зокрема, детально розглядаються молекулярні механізми процесів, які лежать в основі життєдіяльності, їх особливості в клітинах нижчих і вищих організмів, будова геномів, їх регуляція та специфічні риси. Крім того, з’ясовуються питання, що стосуються матричного синтезу біополімерів (реплікації, транскрипції, трансляції), які забезпечують збереження, передачу та реалізацію генетичної інформації, експресію генів та прояви фенотипових ознак організму.

Особливістю структури курсу лекцій є те, що в ньому, поряд з проблемами, які безпосередньо стосуються курсу молекулярної біології, з’ясовується низка загальнобіологічних аспектів, тісно пов’язаних з цією дисципліною. Це, в першу чергу, специфічні особливості живих організмів, рівні організації живої матерії, механізми формування біологічних структур, регуляція метаболізму та підтримання стабільності геному.

Теоретичний матеріал курсу лекцій є скороченим варіантом посібника “Основи молекулярної біології”, підготовленого та виданого в 2011 році колективом авторів кафедри біології та біохімії ЧНУ. У зв’язку з цим, при вивченні дисципліни у студентів є можливість самостійного, поглибленого опрацювання окремих питань, які не включено до лекційного курсу. Можна сподіватися, що видання курсу лекцій, у значній мірі, сприятиме успішному вивченню теоретичного матеріалу з молекулярної біології та підвищенню якості підготовки фахівців біологічного профілю.

Автори

ТЕМА: ВСТУП ДО КУРСУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

План

1. Предмет і завдання молекулярної біології.
2. Етапи розвитку молекулярної біології.
3. Методи молекулярної біології.

Основна література: [1, с. 10-39]; [2, с. 4-19].

Додаткова література: [1]; [2]; [3]; [4]; [25].

1. Предмет і завдання молекулярної біології

Молекулярна біологія – наука, яка вивчає основні прояви та особливості процесів життєдіяльності на молекулярному рівні, забезпечує можливість підходів до розуміння сутності життєвих явищ на основі з'ясування ролі атомів і молекул у формуванні біологічних структур із специфічними властивостями та функціями.

- *Об'єктом вивчення молекулярної біології* є субклітинні генетичні структури представників різних таксономічних груп живих організмів, а також вірусів і бактеріофагів.

- *Предметом вивчення цієї науки* є структурна організація, властивості і функції сполук, які є основою будови живих організмів, особливості їх молекулярної організації, механізми збереження, передачі та реалізації генетичної інформації, принципи регуляції клітинного метаболізму і підтримання гомеостазу.

- *Метою молекулярної біології* є розкриття молекулярних механізмів перебігу процесів, які лежать в основі життєдіяльності та забезпечують здатність організмів до самовідтворення, самооновлення і саморегуляції, як важливих та необхідних складових триумвірату ознак, що відрізняють їх від неживої природи.

Головними задачами молекулярної біології є:

- з'ясування яким чином та в якій мірі ріст і розвиток живих організмів, збереження та передача генетичної інформації зумовлені особливостями структурної організації і властивостями біополімерів клітини;

- вивчення специфічного молекулярного складу клітин живих організмів, який сформувався у процесі тривалої хімічної (добіологічної) еволюції;

- дослідження структурної організації геномів представників різних таксономічних груп організмів, а також вірусів і бактеріофагів,

їх регуляції та механізмів, які забезпечують захист генетичної інформації і підтримання стабільності геному;

- розкриття механізмів матричного синтезу біополімерів (реплікації, транскрипції, трансляції), які лежать в основі збереження, передачі і реалізації генетичної інформації внаслідок експресії генів.

- з'ясування яким чином із комплексу взаємопов'язаних фізико-хімічних процесів, що відбуваються в живих організмах, формується високопорядкована біологічна система, здатна до самостійного функціонування (самовідтворення, самооновлення та саморегуляції).

2. Етапи розвитку молекулярної біології

Молекулярна біологія у своєму розвитку пройшла шлях від узагальнення теоретичних надбань багатьох світових наукових шкіл до прикладних розробок, на основі широкого застосування новітніх, сучасних методів дослідження.

Виокремлення молекулярної біології, як важливої галузі знань про живу природу, на межі біохімії, генетики, біології, цитології, вірусології та інших наукових дисциплін, відбулося в 50-х роках минулого століття. Цьому, у значній мірі, сприяли суттєві революційні зміни в біологічній науці, започатковані у другій половині XX ст., які не спростували всі попередні наукові надбання та досягнення, а лише розширили, поглибили та вдосконалили їх.

Вперше термін „молекулярна біологія” запропонував У. Уївер (1938 р.), який вказував, що на межі хімії, фізики і біології формується нова галузь знань – *молекулярна біологія*, метою якої є розгадка найглибших таємниць живої матерії.

На початку 40-х років XX ст. відомий вчений У. Естбюрі отримав першу рентгенограму ДНК та започаткував вивчення ультраструктури цієї важливої біомолекули, що дало підстави йому називати себе „молекулярним біологом”. Одночасно з цим, до формування молекулярної біології як науки, пройшло ще декілька десятиліть, протягом яких було створено підґрунтя для її розвитку. За цей час було зроблено низку епохальних відкриттів, які дали змогу підійти до розуміння молекулярних аспектів процесів життєдіяльності. Серед них найважливішими є наступні:

- З'ясування сутності трансформуючого фактора Гріффітса, який було відкрито в 1928 році, що дало можливість сформулювати поняття про генетичну роль нуклеїнових кислот. Було встановлено, що носієм генетичної інформації є молекула ДНК (О. Евері, М. Маккарті, К. Маклеод, 1944 р.).

- Встановлення закономірностей чергування чотирьох нуклеотидів пуринового і піримідинового ряду в структурі ДНК (правила Чаргаффа). Це спростувало уявлення про одноманітність та недостатню інформативність первинної структури ДНК у зв'язку з чим, як вважали на той час, вона не може виконувати роль носія генетичної інформації (Е. Чаргафф, 1948 р.).

- Розкриття механізмів інфікування клітин бактерії *E. coli* бактеріофагом Т-4, що підтверджувало генетичну роль нуклеїнових кислот, оскільки, бактеріофаг, при контакті з бактеріальною клітиною, не проникає в її кампартменти, а вводить лише власну нуклеїнову кислоту, яка і є носієм патогенності (А. Херші і М. Чейз, 1952 р.).

- Вивчення структурної організації білків: розроблено модель вторинної структури у вигляді α -спіралі та β -форми (Л. Полінг і Р. Корі, 1951 р.).

- Застосування рентгеноструктурного аналізу для вивчення просторової структури ДНК (Л. Уілкінс і Р. Гослінг, 1953 р.).

- Припущення про вторинну структуру ДНК у вигляді подвійної спіралі, що започаткувало уявлення про механізми матричного синтезу біополімерів (Дж. Уотсон і Ф. Крік, 1953 р.).

- З'ясування загальної схеми транскрипції та передачі інформації в напрямку ДНК \rightarrow РНК (А. Коренберг, 1958 р.).

- Вивчення третинної структури білка міоглобіну, який є резервом кисню в м'язевій тканині (Дж. Кендрю, 1960 р.).

- Відкриття посередника передачі генетичної інформації з ядерного апарату клітини до цитоплазми (іРНК) та з'ясування її ролі в забезпеченні видоспецифічного синтезу білка (А. Білозерський і О. Спірін, 1965 р.).

- Виділення з бактеріальних клітин ферментів рестриктаз, здатних „розрізати” (секвенувати) молекулу РНК на певних ділянках полінуклеотидного ланцюга з утворенням невеликих фрагментів (секвентів), що сприяло вивченню структури генів рестрикційно-лігазним та конекторним методами (Р. Холлі і М. Геллерт, 1965 р.).

- Вивчення четвертинної структури білка гемоглобіну, який входить до складу еритроцитів та забезпечує дихальну функцію крові (М. Перутц, 1966 р.).

- Розшифрування генетичного коду – своєрідного „словника” для переведення чотирилітерної абетки нуклеїнових кислот у двадцятилітерну абетку білків, що підтверджувало передачу генетичної інформації у клітині в напрямку ДНК \rightarrow іРНК \rightarrow білок та сприяло розкриттю механізмів реалізації цього процесу (М. Ніренберг, С. Очоа, Г. Корана, 1968 р.).

- Вивчення молекулярних аспектів регуляції функціональної активності генів у клітинах про- і еукаріот – індукції і репресії (Ф. Жакобо і Дж. Моно, 1968 р.).
- З'ясування механізмів фрагментарної реплікації на “запізнюючому” ланцюгу ДНК (Р. Оказакі, 1968 р.).
- Розробка стратегії хімічного синтезу генів: синтез гену тРНК^{фен} (Х. Корана, 1970 р.).
- З'ясування механізмів передачі інформації у РНК-геномних вірусів за участю ферменту зворотньої транскриптази або ревертази (Г. Темін, Д. Балтимор, 1970 р.).
- Отримання рекомбінантних молекул ДНК з використанням специфічних векторів, що стало передумовою формування прикладного напрямку молекулярної біології – генної інженерії (С. Коен, П. Берг, 1972 р.).
- Встановлення подібності транспозонів, мобільно деспергованих генів та онкогенів провірусів, що дало змогу з'ясувати окремі аспекти онкотрансформації клітин (Г. Темін, 1972 р.).
- Застосування рестриктазно-лігазного методу для отримання гібридних молекул ДНК та створення молекулярних векторів (С. Коен, 1973 р.).
- Розкриття механізмів SOS-репарації, яка забезпечує корегування помилок реплікації ДНК – порушення комплементарності азотистих основ нуклеотидів (М. Рідман, 1974 р.).
- Вивчення первинної структури ДНК на основі РНК-ових копій, отриманих за участю ферментів ДНК-залежних РНК-полімераз (У. Гілберт, 1975 р.).
- Розшифрування первинної структури нуклеїнових кислот та фрагментів генів на основі застосування специфічних хімічних методів (А. Максам, У. Гілберт, 1975 р.).
- Відкриття „мозаїчності” окремих генів у геномі еукаріот та встановлення причин порушення принципу колінійності при передачі генетичної інформації в клітині (відповідності первинної структури ДНК первинній структурі білків) (У. Гілберт, 1976 р.).
- Вивчення первинної структури ДНК бактеріофага φX-174 та відкриття явища перекривання генів – “гени в генах” (Ф. Сенгер, 1977 р.).
- Застосування ензиматичного методу для розшифрування фрагментів генів геному про- і еукаріот (Ф. Сенгер, А. Коулсон, 1979 р.).
- Відкриття РНК-ферментів (рибозимаз), механізмів аутосплайсінгу та генетичної рекомбінації (Т. Чек, 1981 р.).

- Розкриття сутності посттранскрипційної модифікації первинних транскриптів (різних видів РНК), синтезованих на структурі генів еукаріот (В. Келлер, 1982 р.).

- Розробка методу ампліфікації генів, який ґрунтується на полімеразній ланцюговій реакції – ферментативному синтезі *in vitro* фрагментів ДНК на основі первинної структури матриці (К. Ньюліс, 1983 р.).

- Роботи по розшифруванню геному людини, бактеріальних геномів, геномів дріжджів (К. Вентер, Ф. Коллінз, 1984-2005 рр.).

- Картування геномів клітин еукаріот – дріжджів, нематоди та плодової мушки дрозофіли (Міжнародна програма HUGO, 1996-2000 рр.).

- Ідентифікація генів, які включають програму апоптозу в нематод та розкриття механізмів запрограмованої смерті клітин (С. Бренер, Г. Хорвіц, Дж. Салстон, 2002 р.).

- Відкриття вірусу папіломи людини та вивчення структури генів, що зумовлюють розвиток спадкових захворювань, канцерогенезу і старіння (Х. Хаузен, 2008 р.).

Важливий внесок у розвиток молекулярної біології зроблено працями зарубіжних і вітчизняних вчених: С. Сєверіна, О. Опаріна, В. Енгельгардта, Ю. Овчиннікова, О. Басєва, В. Ковальського, О. Браунштейна (Росія), І. Хеллера (Польща), Л. Ріда, К. Хьорса, Е. Чаргаффа, А. Коренберга, С. Очоа, Дж. Уотсона, Х. Корана, Л. Полінга, А. Ленінджера, Д. Гріна (США), Дж. Кендрю, М. Перутца, Ф. Кріка, Ф. Сенгера (Англія), Р. Оказакі (Японія), Ф. Жакобо, Ж. Моно (Франція), О. Варбурга, Ф. Лінена (Німеччина) та інших.

У наш час, на основі досягнень молекулярної біології, розроблено сучасні методи діагностики і лікування різних метаболічних розладів, спадкових та вірусних захворювань. Широкого застосування набула ДНК-діагностика для встановлення батьківства, ідентифікації особистості (молекулярна дактилоскопія).

Значного розвитку набувають науково-прикладні напрямки молекулярної біології такі як: гена і клітинна інженерія, біотехнологія, біоінформатика, які відкривають нові перспективи для прогресу біологічної науки XXI ст.

Все це, у значній мірі, сприятиме розв'язанню чисельних проблем, що стоять перед людством та створить передумови для подальшого прогресу сучасної біологічної науки.

3. Методи молекулярної біології

Для вивчення живих об'єктів, їх будови, молекулярної архітектури та особливостей надмолекулярної організації окремих складових компонентів клітин і тканин організму застосовують високоспецифічні якісні та кількісні методи дослідження. Ці методи дають змогу отримати цінну інформацію про будову клітин і клітинних органел, з'ясувати локалізацію в клітині різних біомолекул, вивчити особливості їх функціонування.

• **Фізіологічні методи.** В наукових дослідженнях найчастіше використовують гісто- та цитоаналіз, електронну та світлову мікроскопію. Цитологічні та гістохімічні методи ґрунтуються на здатності різних структурних компонентів клітини забарвлюватися специфічними барвниками з наступною ідентифікацією та мікроскопічним вивченням досліджуваних зразків. Так, для виявлення білків, як правило, застосовують Бромфеноловий синій або Амідочорний ІОБ, а нуклеїнових кислот – Акридиновий оранжевий, Метиленовий зелений, Піронін, Дифеніламін та ін. За допомогою цих методів можна вивчати локалізацію різних біополімерів у клітині (ДНК, РНК, білків, вуглеводів, ферментів), з'ясувати їх функції та властивості.

Методи мікроскопії дають змогу вивчати ультраструктуру клітин та клітинних органел, транспорт і синтез різних сполук, специфічні закономірності перебігу окремих фаз клітинного циклу, механізми міжклітинної взаємодії. У наукових дослідженнях широкого застосування набули методи світлової мікроскопії, за допомогою яких вивчають будову клітини та клітинних органел. Досить широко використовують такі види світлової мікроскопії: абсорбційна, інтерфераційна, поляризаційна, фазово-контрастна, флуоресцентна. Особливо високоінформативним є метод електронної мікроскопії, який дає можливість вивчати процеси, що відбуваються в різних компартментах клітини (Рис. 1).

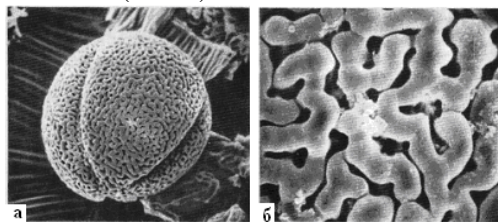


Рис.1. Мікрофотографії біоб'єктів, зроблені за допомогою скануючого електронного мікроскопу (за К. Свенсоном і П. Уебстером)

• **Фізико-хімічні методи.** Ці методи застосовують для вивчення структури біополімерів, їх складу, видів зв'язків між атомами та молекулами, їх довжину та локалізацію. Серед них найпоширенішими є: електронний парамагнітний резонанс, мас-спектрометрія, радіоавтографія, рентгеноструктурний аналіз та ін.

Радіоізотопний метод (радіоавтографія). Метод дає змогу з'ясувати локалізацію процесів синтезу і розкладу біополімерів у клітині, шляхи транспорту різних речовин та йонів, особливості функціонування окремих клітинних органел і біомолекул. Він ґрунтується на включенні радіоізоотопів (^{14}C , ^{32}P , ^3H) у досліджувані об'єкти – мономерні ланки біополімерів (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти), або різні метаболіти, які зазнають певних перетворень у клітині, та реєструвати їх за допомогою фотоемulsії (Рис. 2). При розпаді радіоізоотопів, β -часточки потрапляють в зону чутливого фотошару і активують в його складі гранули AgBr локалізацію яких, після проявлення та відновлення, визначають за допомогою мікроскопії.

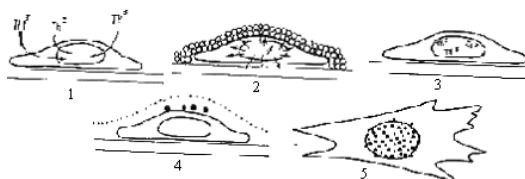


Рис. 2. Введення радіоізоотопів та їх ідентифікація.

Рентгеноструктурний аналіз. Один з високоінформативних методів дослідження, який дає змогу вивчити особливості структурної організації біополімерів, отримати тривимірне зображення молекул та виявити розміщення атомів у їх складі, будову зв'язків, що стабілізують нативну конформацію. Метод ґрунтується на дифракції рентгеновських променів (електромагнітного випромінювання довжиною хвилі 10^{-10} м). При проходженні променів через об'єкт вивчення, вони вступають з ним у певну взаємодію. Це зумовлює збудження атомів та надає кінетичної енергії вибитим електронам, що індукує випромінювання специфічного спектру та появу вторинних ефектів у вигляді ліній, які реєструються спеціальними приладами. Дозволяючи здатність цього методу знаходиться в межах 0,1 нм.

Біохімічні методи. Найпоширенішими серед цих методів є оптичні (фотоелектроколориметрія, спектрофотометрія, нефелометрія, спектрофлуориметрія), хроматографія, електрофорез, седиментаційний аналіз та ін. Біохімічні методи використовують для виділення,

розділення та очищення різних сполук, кількісного визначення складових компонентів рідин і тканин організму. Вони дають змогу вивчати окремі аспекти обміну речовин в організмі та особливості функціональної активності різних біосубстратів.

Оптичні методи. Ці методи можуть надати цінну інформацію про кількісний вміст різних метаболітів у рідинах організму, ідентифікувати різні речовини за властивостями, якісним складом та функціями, з'ясувати механізми біохімічних перетворень різних сполук. Вони дають змогу вивчати окремі показники гомеостазу на основі вимірювання зміни інтенсивності гомо- чи гетерохроматичного потоку світлового випромінювання, внаслідок вибіркового поглинання чи розсіювання його речовиною, що знаходиться в розчині. З цією метою, найчастіше застосовують абсорбційну та емісійну фотометрію. На принципі абсорбційної фотометрії ґрунтується колориметрія, спектрофотометрія і нефелометрія. Емісійна фотометрія забезпечує кількісне визначення різних сполук внаслідок вимірювання енергії, яку випромінює досліджуваний об'єкт у збудженому стані (спектрофлуориметрія, полум'яна фотометрія).

Седиментаційний аналіз. Впроваджено в наукові дослідження Т. Сведбергом (1926 р.). Метод ґрунтується на різниці у швидкості седиментації часточок при відцентровому прискоренні, залежно від їх щільності, форми та розмірів. Особливістю методу є те, що для його проведення необхідне отримання гомогенатів тканин чи суспензій клітин, які використовують для вивчення. Застосування седиментаційного аналізу мало важливе значення в дослідженнях по визначенню молекулярної маси біополімерів та вивченню цілого ряду внутрішньоклітинних процесів. Значного поширення набули різні варіанти седиментаційного аналізу такі, як: препаративне та аналітичне центрифугування, а також центрифугування в градієнті густини. Залежно від способу проведення розрізняють такі види препаративного центрифугування: розподільне (диференційне), зонально-швидкісне та рівноважне (ізопікнічне).

Хроматографія. Високоінформативний метод, який застосовують для розділення складних сумішей речовин невідомого складу та виділення цінних компонентів, ідентифікації сполук, подібних за будовою і властивостями. Метод було відкрито М. Цветом (1903 р.) для вивчення екстрактів зелених листків рослин (фракцій хлорофілу). Існує велика кількість модифікацій цього методу залежно від носіїв, на яких проводять розділення (рідких, твердих і газоподібних), механізму розділення, способу проведення, тощо. Так, *за механізмом розділення* виділяють такі види хроматографії як:

адсорбційна, розподільна, дифузна, іонообмінна, афінна. *За видом носіїв* – паперова, колонкова, тонкошарова, молекулярно-ситова. Крім аналітичних цілей, хроматографію, в наш час, широко застосовують в різних галузях народного господарства для розділення і виділення різних сполук.

Електрофорез. Один з найпоширеніших методів розділення та кількісного визначення різних сполук, вивчення їх компонентного складу. Електрофорез ґрунтується на здатності полярних молекул, що несуть певний сумарний заряд, внаслідок протонування чи іонізації функціональних груп у водному середовищі, при певних значеннях рН, рухатися в електричному полі до позитивного чи негативного джерела струму (аноду чи катоду). На електрофоретичну рухливість впливають сила струму, електричний опір, рН буферних систем та іонна сила розчинів. Швидкість руху досліджуваних зразків в електричному полі прямо пропорційна силі струму та електричній напрузі. Метод електрофорезу дає змогу розділити на специфічних носіях різні біомолекули за величиною їх заряду, формою молекул, молекулярною масою та іншими критеріями.

Залежно від виду носія виділяють електрофорез на папері, плівках ацетату целюлози, крохмальному, агаровому та поліакриламідному гелях.

Залежно від способу розділення розрізняють фронтальний електрофорез (метод рухомої межі), зональний (електрофорез на носіях), а також ізоелектрофокусування, ізотахофорез, імуноелектрофорез та інші.

За величиною електричної напруги між електродами електрофорез поділяють на низьковольтний (менше 500В) і високовольтний (більше 500В).

• Імунологічні методи.

Імуноелектрофорез. Високоінформативний метод, за допомогою якого проводять виявлення антигенів у складі рідин організму та різних біологічно активних сполук. Він ґрунтується на поєднанні принципів тонкошарового електрофорезу та імунодифузії. Основою методу є реакція преципітації та утворення комплексу антиген/антитіло. Досліджуваний зразок спочатку розділяють електрофорезом на агаровому гелі, після чого у вирізані на поверхні гелю жолобки вносять суміш антитіл. Через певний час проходить дифузія антитіл і антигенів відповідно в латеральному та радіальному напрямках. Після їх зустрічі відбувається утворення комплексу антиген/антитіло, свідченням чого є поява дуг преципітації, які дають змогу ідентифікувати наявність певних антигенів.

Імуноферментний аналіз (ІФА). Сучасний метод дослідження, який застосовують для ранньої діагностики, так званих, TORCH-інфекцій (токсоплазмозу, цитомегаловірусу, вірусу герпесу, червонички, паразитарних інвазій), проведення тестів на наявність онкомаркерів, контролю за вживанням ліків та наркотичних засобів, діагностики вагітності та ін. Імуноферментний аналіз поєднує високу чутливість імунологічних реакцій та специфічність каталітичної дії ферментів. Антиген, зв'язаний з ферментом у твердій фазі, конкурує з досліджуваним вільним антигеном за специфічні антитіла. Тобто, індикаторами імунологічних реакцій, в цьому випадку, є маркерні ферменти.

- **Методи молекулярної генетики та генної інженерії.**

Розробка цих методів мала важливе значення для становлення та розвитку молекулярної біології, конструювання рекомбінантних ДНК, можливості ампліфікації генів, за допомогою хіміко-ензиматичних методів і полімеразної ланцюгової реакції. Це забезпечило формування специфічних генетичних структур із заздалегідь передбачуваними властивостями та функціями і створило умови для широкого застосування досягнень генної інженерії в різних галузях народного господарства і медицини.

Методи молекулярної генетики та генної інженерії ґрунтуються на специфічних особливостях геному представників різних таксономічних груп живих організмів, а також вірусів і бактеріофагів. Це, в першу чергу, стосується здатності їх до взаємного інтегрування трансформації, а також універсальності генетичного коду, що забезпечує можливість експресії в організмі чужорідних генів. Особливістю цих методів є те, що вони, на відміну від штучного мутагенезу та гібридизації, які застосовують в межах одного виду організму, дають змогу цілеспрямованої зміни структури і функції геномів організмів розділених міжвидовими бар'єрами. Застосування цих методів в наукових дослідженнях сприяло вивченню структури нуклеїнових кислот, ідентифікації та виділенню генів, з'ясуванню їх будови та молекулярних механізмів регуляції, завдяки чому було створено передумови для розвитку сучасних біотехнологій.

Важливим для становлення сучасних біотехнологій було відкриття ферментів рестриктаз та вивчення їх субстратної специфічності, що сприяло детальному вивченню первинної структури ДНК, генів та їх фрагментів за допомогою рестрикційно-лігазного та коннекторного методів. Вказані методи дають змогу проводити не лише фрагментацію генетичних структур та отримувати необхідні гени

але і з'єднувати їх з ДНК реципієнтних клітин при формуванні рекомбінантних молекул.

Значного поширення для вивчення структури генів набули методи з використанням плюс/мінус систем. В плюс - системах до кожного з варіантів ДНКових копій додається один з чотирьох видів нуклеотидів, позначених радіоізотопами, а в мінус - системах, кожен з варіантів ДНКових копій не містить одного з чотирьох нуклеотидів. У зв'язку з цим, при застосуванні даних систем, синтез полінуклеотидних ланцюгів завершується в місцях наявності чи відсутності цих нуклеотидів. Важливе значення для розвитку молекулярної біології, генетики та генної інженерії мало застосування синтезу генів *in vitro* хімічними та ензиматичними методами на основі інформації про чергування залишків амінокислот в структурі певних генних продуктів. Для вивчення специфічного нуклеотидного складу ДНК, зокрема ділянок, що містять тандемні повтори нуклеотидів, використовують блот-гібридизацію (ДНК-фінгерпринтинг). Суть методу в тому, що фрагментовані і розділені методом електрофорезу сайти ДНК переносять на мембранні фільтри (блотінги), які містять зонди з радіоізотопною міткою. Після гібридизації виявляють рестрикційні фрагменти, гомологічні до ДНК зондів. Для синтезу генів широко використовують також фермент зворотню транскриптазу. Цим методом було синтезовано гени глобіну, вірусу віспи та ряду бактеріофагів. Отримання виділених чи синтезованих генів для синтезу необхідних генних продуктів включає ампліфікацію, збільшення їх кількості. З цією метою застосовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). В дослідженнях генної інженерії широко використовують також методи відбору та клонування клітин, що містять рекомбінантні ДНК, експресію їх у різних системах *in vivo* чи *in vitro*. Це дає змогу отримання генних продуктів із заздалегідь передбачуваними властивостями.

• **Методи клітинної інженерії**

Клітинні культури. Один з найпоширеніших сучасних методів, який дає змогу вивчити особливості функціонування клітин *in vitro* в специфічних культуральних середовищах. За допомогою цього методу можна досліджувати морфогенез та диференціювання клітин, вплив на них різних ушкоджуючих чинників (хімічних сполук, різних токсинів, отрут, лікарських препаратів, вірусів, електромагнітних хвиль, радіоактивного випромінювання), проводити певні маніпуляції на рівні клітини (мікрохірургію, ін'єкцію розчинів різних сполук).

Метод культури тканин і органів. Цей метод застосовують для вивчення механізмів клітинного диференціювання, гістогенезу,

міжтканинної і міжклітинної взаємодії. На відміну від культури клітин, цей метод дає змогу вивчати особливості функціонування клітин, тканин і органів при збереженні їх нативної структури та функцій. У зв'язку з цим, його широко застосовують для з'ясування закономірностей формування і розвитку зачатків органів у нормі та при експериментально змінених умовах. Важливим напрямком застосування культури тканин і органів рослин є мікроклональне розмноження внаслідок якого отримують генетично ідентичні форми посадкового матеріалу. У вигляді експлантатів використовують генеративні та вегетативні органи рослин.

Технологія мікроклонального розмноження включає кілька етапів: введення вихідної форми в стерильну культуру, мікророзмноження, укорінення та перенесення стерильної культури в ґрунт. Одним з важливих напрямків культури тканин є культивування клітинних суспензій у завислому стані в рідкому живильному середовищі. Використання культури тканин може забезпечити збереження генетичної інформації (мікроклональне розмноження), зміну цієї інформації внаслідок мутагенезу під впливом фізичних чи хімічних методів (культура кулусів, суспензій, протопластів), перенесення та інтеграцію генетичної інформації (гено-інженерне конструювання та отримання продуктів з цінними якостями, соматична гібридизація).

• **Метод безклітинних систем.** За допомогою безклітинних систем вивчають молекулярні механізми біохімічних процесів, які за цих умов є ізольованими, тому їх перебіг відбувається в нативних умовах без будь-якого зовнішнього впливу та артефактів, що можуть призвести до хибних уявлень і висновків. Використання безклітинних систем з успіхом застосовували при з'ясуванні механізмів білкового синтезу М. Ніренберг і Х. Корана (1966 р.). З цією метою із неочищених клітинних екстрактів, після багаторазового фракціонування, отримували рибосоми, тРНК та інші компоненти білоксинтезуючої системи. Ці компоненти вносили в безклітинне середовище (гомогенати клітин), яке містило відповідні матриці та необхідні сполуки, і вивчали їх роль у перебігу трансляції. За участю безклітинних систем було розшифровано генетичний код. У вигляді матриці, в цьому випадку, використовували штучні гомо- та гетерорибополінуклеотиди відомого складу, що дало можливість з'ясувати будову кодонів іРНК, які відповідають за включення до складу білкових молекул певних амінокислот.

ТЕМА: МОЛЕКУЛЯРНІ АСПЕКТИ ПРОЦЕСІВ ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ

План

1. Життя, як вища біологічна форма руху живої матерії.
2. Критерії, характерні для живих організмів.
3. Рівні організації живої матерії.
4. Принципи організації живих систем.

Основна література: [1, с. 40-60].

Додаткова література: [1]; [2]; [15]; [25].

1. Життя, як вища біологічна форма руху живої матерії

Молекулярна біологія вивчає специфічні прояви та особливості процесів життєдіяльності на молекулярному рівні. Одночасно з цим, незаперечним є те, що життєві явища не можна ототожнювати лише з біохімічними перетвореннями різних сполук, фізичними чи хімічними процесами, які відбуваються в клітинах живих організмів, оскільки це явище значно складніше, багатогранніше та ґрунтується на певних закономірностях і принципах, що реалізуються в живих системах.

У переважній більшості випадків при визначенні поняття **життя**, наголошується на тому, що це спосіб існування білкових тіл, суттєвим моментом якого є обмін речовин з оточуючим середовищем. Цим в основному, і обмежується філософське визначення такого складного та багатовимірного процесу. Однак, чим живе відрізняється від неживого і чи можна взагалі їх розмежувати або ототожнювати, дати відповідь на ці запитання значно складніше. Згідно з законом єдності матеріального світу, живі організми, як і нежива природа, не містять нічого, крім атомів та молекул. Якщо розглядати на молекулярному рівні живі організми і неживі предмети, то це дійсно так.

Разом з тим, значна відмінність живих організмів від неживої природи в чисельних зовнішніх проявах, таких як рух, подразливість, скоротливість, здатність до самооновлення і самовідтворення, дає підстави стверджувати що вони, по суті, є антиподами та несумісні між собою. Враховуючи це, протягом багатьох віків таємниці життя залишалися нерозгаданими і були лише об'єктом вірувань, а не предметом знань про живу природу. Поняття „життя”, як правило, пов'язували з певною життєвою силою (ентелехією) та життєвим поривом (архесм), які не властиві неживій природі.

Такі метафізичні погляди натурфілософів ґрунтувалися на тому, що життєві явища не можна було пояснити і досягнути на основі відомих на той час законів природи, тому вважали, що вони є результатом прояву містичних сил.

Одночасно з цим, навіть сучасна біологічна наука, озброєна найновішим обладнанням та методами дослідження, не може однозначно пояснити сутність життєвих явищ і точно окреслити межу між живим та неживим. Зазвичай, важко зрозуміти чи є живою закристалізована вірусна часточка і чи молекула ДНК (РНК), що входить до її складу і не здатна до самовідтворення поза організмом реципієнта, є живою. На питання чи існує чітка межа між живим і неживим скоріше можна дати негативну, ніж позитивну відповідь. Примітивна будова вірусів, їх проста неклітинна організація, відсутність клітинних органел, які є у клітинах живих організмів, дає підстави для роздумів, що ж являє собою вірус – „речовину чи істоту”, живе чи неживе. Позитивна чи негативна відповідь на це запитання залежить від того, чи характерні для вірусів критерії, які є ознакою живих організмів. Оскільки у них більшість цих ознак відсутні, віруси можна вважати живими лише за функціональними характеристиками, а не за структурними особливостями.

Незаперечним є те, що поняття „життя” досить складне, багатогранне та охоплює велику кількість процесів і явищ. Біологи та філософи по-різному підходять до розуміння його сутності. Біологи, при його визначенні, наголошують на специфічних особливостях, які характерні для живих організмів, а філософи, зазвичай, акцентують увагу на процесах, що стосуються розвитку людського суспільства. Одночасно з цим, основні риси, характерні для життєвих явищ неможливо трактувати двозначно, оскільки вони, без сумніву, спільні як для високоорганізованих багатоклітинних організмів, так і для примітивних форм нижчих організмів.

Тобто, поняття “життя” не включає гігантську якісну і кількісну різницю між вищими та нижчими формами організмів, так як ознаки належності до живого в них тотожні. Різниця саме в рівні їх організації, а життєві процеси можна пояснити лише з точки зору фізико-хімічних законів, які діють як в живій, так і в неживій природі. Одночасно з цим, у живих організмах ці закони *корегуються специфічними біологічними закономірностями*, дія яких зумовлює можливість їх існування як впорядкованих та високоорганізованих відкритих систем за умов постійного двостороннього обміну і взаємного зв'язку з довкіллям. Це, в першу чергу, стосується особливостей двостороннього обміну речовин, перебігу

ферментативних процесів, використання енергії хімічних зв'язків органічних чи неорганічних сполук у гетеротрофних організмів та енергії квантів світла у рослин, наявності механізмів підтримання гомеостазу.

Важливою особливістю живих організмів є унікальність їх хімічного складу. Атоми і молекули, мінеральні та органічні сполуки, які є їх структурними компонентами, відбиралися у процесі тривалої хімічної (добіологічної) еволюції за *принципом не їх найбільшого поширення в біосфері, а з точки зору важливості у виконанні специфічних життєво-важливих функцій*. Тобто, в процесі тривалої еволюції із всього різноманіття атомів елементів, присутніх у природі, було відібрано ті, що в найбільшій мірі, відповідали вимогам, необхідним для включення їх до складу живого. Це, в першу чергу, здатність до утворення кратних зв'язків, невисокі значення молекулярної маси, добра розчинність у воді та не токсичність. Специфічна будова та властивості характерні і для органічних сполук, що входять до складу клітин, тканин і органів. Це стосується цілого ряду особливостей їх структурної організації, які забезпечують функціональну активність та участь у процесах обміну.

За останні десятиріччя досягнуто значних успіхів у різних галузях біологічної науки, відкрито цілий ряд закономірностей, які суттєво наблизили людство до розгадки чисельних таємниць природи. Однак, і на сьогодні, практично, неможливо отримати конкретну відповідь на питання щодо сутності життєвих явищ, хоч до визначення цього поняття зверталось багато вчених біологів, біохіміків, філософів.

Зокрема, відоме визначення поняття „*життя*”, сформульоване в 60-х роках ХІХ ст. Ф. Енгельсом. Вчений, природодослідник, філософ вказував, що: “... скрізь, де ми зустрічаємо явища життя, ми бачимо, що вони пов'язані з будь-яким білковим тілом...”. В цьому визначенні, вчений вперше ототожнив життя з певним матеріальним субстратом – білком, що було надзвичайно важливим, оскільки виключало можливість втручання в життєві процеси будь-яких надприродних сил, та спростовувало хибні погляди натурфілософів.

У наш час відомо, що в забезпеченні життєвих явищ важливе значення мають не лише білки, але й інші біополімери клітини, які ще не було відкрито в ті часи – нуклеїнові кислоти, ферменти та ін. Тобто, життєві процеси тісно пов'язані з молекулярною архітектурою та специфічною високовпорядкованою структурною організацією ряду сполук, що входять до складу живих організмів.

Відомий біохімік Ю. Овчинников вказував, що *життя* – це енергозалежний процес відтворення і підтримання специфічної

структури біополімерів. За висловлюванням академіка О. Ляпунова, *життя* це триєдиний потік речовини, енергії та інформації, що здійснюється у високовпорядкованих і організованих системах, які можна назвати живими. Відоме також визначення поняття життя сформульоване ботаніком В. Компанченком. На його думку *життя* – це організована форма опору самовільним процесам розпаду, яка реалізується внаслідок двостороннього обміну речовин і енергії з довкіллям. У всіх цих визначеннях підкреслюється важлива роль у забезпеченні життєвих явищ структурної організації та функцій біополімерів клітини, без акцентування уваги на окремому їх виді, оскільки на нашій планеті існує білково-нуклеїнова форма життя для підтримання якої необхідна наявність ще цілого ряду біологічно-активних сполук та специфічних субстратів. Одночасно з цим, навіть наведені вище визначення поняття “життя” не дають однозначної та вичерпної відповіді на питання про його сутність.

Незаперечним є лише те, що життя – це найвища, біологічна форма руху живої матерії, яка виникла внаслідок тривалої еволюції, а дві форми існування матерії – жива і нежива, мають як спільні, так і відмінні риси, що свідчать про *єдність матеріального світу*. Крім того, всі живі організми мають багато спільних рис, тому найважливішим є не належність до вищих чи нижчих форм, а їх тонка субмолекулярна внутрішньоклітинна структура. Саме в складній молекулярній архітектурі біомолекул та структурній організації клітин живих організмів, очевидно, прихована таємниця живого, оскільки їх руйнування призводить до утворення нежиттєздатної суміші органічних і неорганічних сполук та окремих молекул.

2. Критерії, характерні для живих організмів

Для живих організмів характерні певні критерії, які відрізняють їх від неживої природи:

- **Двосторонній обмін речовин і енергії**, суть якого в тому, що живі організми, як відкриті системи, знаходяться в постійному зв'язку та взаємодії з оточуючим середовищем, з якого вони отримують речовини і енергію, перетворюють їх, використовують для власних потреб та виділяють в оточуюче середовище кінцеві продукти обміну. Двосторонній обмін речовин у живих організмах забезпечує підтримання показників гомеостазу, як важливої умови існування, внаслідок відведення їх від стану динамічної рівноваги та досягнення динамічно стійкого стану для підтримання якого необхідний мінімум енергії.

- **Здатність до самооновлення і самовідтворення** є однією з основних характеристик живого, що реалізується як на рівні молекул, надмолекулярних комплексів та систем, клітинних органел, клітин, так і організму в цілому.

В основі самовідтворення на рівні молекул лежить матричний синтез, суть якого в утворенні біомолекул на основі інформації, зосередженої в структурі специфічних матриць. Самовідтворення клітин та клітинних органел відбувається внаслідок їх поділу, а організмів – внаслідок статевого і нестатевого розмноження.

- **Здатність до росту та розвитку** є важливою особливістю живої матерії. Під розвитком слід розуміти незворотно спрямовану закономірну зміну об'єктів живої природи, в результаті чого формуються якісно нові і кількісно вдосконалені системи. Розвиток живих організмів включає: філогенез (історичний розвиток) та онтогенез (індивідуальний розвиток). Кожен живий організм у процесі онтогенезу проходить всі стадії філогенезу.

Закономірності співвідношення між індивідуальним розвитком організму та його розвитком у процесі еволюції були сформульовані на початку XIX ст. і узагальнені Е. Геккелем у вигляді біогенетичного закону (від. *bios* - життя, *genesis* - розвиток). Суть його в тому, що онтогенез певної форми живого є коротким повторенням його філогенезу.

- **Спадковість і мінливість** це дві характерні особливості живого, тісно взаємопов'язані між собою і є важливими проявами життєдіяльності організмів.

Суть спадковості полягає у здатності організмів передавати від покоління до покоління свої специфічні фенотипові ознаки та особливості обміну.

Спадкова інформація організмів закодована в структурі нуклеїнових кислот і реалізується внаслідок таких важливих процесів, як реплікація, транскрипція і трансляція.

У свою чергу, мінливість забезпечує спрямовано доцільні зміни спадкової інформації, закодованої в структурі генів, що визначає специфічні прояви тих чи інших структурно-функціональних та морфологічних ознак організму.

- **Дискретність**, суть якої в тому, що певний організм, або інша біологічна система, включають окремі ізолювані, уособлені тканини і органи, які складають структурно-функціональну єдність, взаємопов'язані та тісно взаємодіють між собою. Зокрема, будь-який вид живих організмів включає значну кількість окремих особин, а кожен високоорганізований організм містить органи і системи, які, у

свою чергу, складаються з тканин і клітин. Дискретність будови живих організмів є основою їх структурної впорядкованості, сприяє постійному самооновленню внаслідок заміни структурних компонентів, що втратили фізіологічні функції.

У будь-якого виду організму, дискретність створює можливість його еволюційного розвитку, внаслідок загибелі не пристосованих особин і збереження та вдосконалення здатних до виживання.

• **Саморегуляція** забезпечує існування живих організмів як відкритих систем при постійній зміні умов оточуючого середовища (температури, освітлення, йонного складу), оскільки вони повинні постійно підтримувати стабільність життєво важливих параметрів внутрішнього середовища організму (гомеостазу) та інтенсивність перебігу чисельних фізіологічних процесів.

Тобто, важливою умовою існування живих організмів є підтримання показників гомеостазу (ізотермії, ізоіонії, ізоосмії), а також постійного вмісту в рідинах і тканинах сполук, які виконують структурні та метаболічні функції.

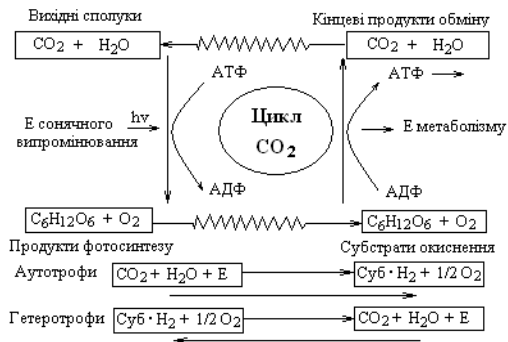
• **Подразливість і скоротливість** – важлива ознака будь-якої живої системи. Живі організми постійно зазнають впливу різних несприятливих чинників, вступають у контакти з іншими організмами. У зв'язку з цим, у процесі еволюції, сформувалася здатність до специфічного реагування на дію різних чинників. Будь-яка реакція організму на зовнішні подразники є показником його чутливості та проявом подразливості.

• **Енергозалежність** є необхідною умовою існування живого. Живі організми не можуть існувати без постійної генерації чи надходження енергії, яка необхідна для забезпечення процесів росту та розвитку, транспорту речовин і йонів, розкладу, синтезу та інших метаболічних перетворень різних сполук.

На відміну від живих організмів, при поглинанні енергії неживими тілами не проходить її використання і перетворення в інші форми у зв'язку з чим вони, як правило, переходять у стан з меншим рівнем впорядкованості, що зумовлює збільшення ентропії та їх руйнування.

Залежно від способу використання енергії виділяють фото- і хемотрофи. Перші, у вигляді джерела енергії використовують енергію квантів світла, а другі – енергію окиснення органічних та неорганічних сполук і, відповідно, належать до органотрофів, літотрофів, міксотрофів.

Між ауто- і гетеротрофними організмами існує тісний взаємний зв'язок, який реалізується у вуглецевому циклі:



3. Рівні організації живої матерії

Поняття про рівні організації живої матерії було сформульоване на основі того, що життя на нашій планеті представлено великою різноманітністю організмів, які належать до певних таксономічних груп і угруповань різної складності. Живі організми та їх угруповання певним чином організовані у просторі і часі тобто, для них характерні специфічні структурно-функціональні особливості. Це, у свою чергу, чітко віддзеркалює системний підхід до вивчення живої природи, оскільки в ході еволюції сформувалась ієрархія живих систем, яка має певні рівні у їх багаторівневій організації.

- *рівні організації живої матерії* – це функціональне місце біологічної системи певного ступеня складності в загальній організації матеріального світу.

- *виокремлюють такі рівні організації живих систем: молекулярний, клітинний, тканинний, органний, організмовий, популяційний, біосферний* та інші. Кожен з них характеризується певною дискретною структурно-функціональною одиницею, яка сформувалася у процесі еволюційного розвитку.

Враховуючи те, що предметом молекулярної біології є вивчення живих організмів на молекулярному рівні, доцільним є розгляд рівнів організації живого від найвищого до найнижчого (від біосферного до молекулярного). Тобто, на відміну від біології, при вивченні якої „піднімаються” від клітин до організму, молекулярна біологія дає змогу „опуститися” від організму до молекулярних і субмолекулярних структур, функціонування яких лежить в основі процесів життєдіяльності.

Біосферний рівень організації живих систем реалізується на рівні сукупності всіх організмів, що населяють нашу планету, та середовища їх існування. На рівні біосфери проходить колообіг

речовин і енергії, тісна взаємодія та взаємний зв'язок живої і неживої природи, вирішуються всі найважливіші проблеми, від яких залежить життя на нашій планеті. Вчення про біосферу, як активну оболонку Землі (ноосферу), коли сукупна діяльність живих організмів реалізується як геохімічний фактор планетарного масштабу, було розроблене В.І. Вернадським (1926 р.). *Ноосфера* (від герц. *noos* – розум, *sphaera* – куля, сфера) – новий вищий рівень організації та функціонування біосфери, суть якого в тісній взаємодії і взаємозв'язку людини з довкіллям, внаслідок чого осмислена діяльність людини стала вирішальним чинником еволюції природи.

Популяційно-видовий рівень організації реалізується на рівні популяцій. Об'єднання особин у популяцію відбувається внаслідок спільності їх генофонду, для якого характерне самовідтворення та формування генотипів особин наступних поколінь. Між різними популяціями може проходити певна взаємодія і регуляція їх кількісних та якісних характеристик під дією зовнішніх чинників і специфічних ендогенних біорегуляторів, які впливають на обмін речовин, поведінкові реакції, виживання. На популяційному рівні започатковуються різні еволюційні зміни, що можуть зумовити появу нових видів. Ці зміни ініціюються дією чинників фізичної, хімічної і біологічної природи, які регулюють чисельність популяцій, їх динаміку та генофонд.

Організмний рівень організації характерний для одноклітинних, колоніальних і багатоклітинних організмів. Структурно-функціональною одиницею організмів є особина в її розвитку з моменту зародження до припинення існування. На цьому рівні проходить самооновлення, самовідтворення, ріст і розвиток організму як єдиного цілого та пристосування його до умов середовища. У процесі онтогенезу відбувається відтворення спадкової інформації та її реалізація і формування специфічних ознак, характерних для особин певного виду. На рівні організму проходить координація та регуляція всіх метаболічних процесів, завдяки узгодженій дії нервової, ендокринної та імунної систем (нейрогуморальна регуляція).

Органний рівень організації характеризується структурно-функціональною одиницею – органом. Наявність певних спеціалізованих органів у вищих організмів забезпечує такі важливі прояви життєдіяльності, як рух, живлення, дихання, травлення, виділення. Цілий ряд внутрішніх органів функціонують узгоджено та об'єднані в системи. Наприклад, система травлення включає шлунок, тонкі і товсті кишки та ряд залоз внутрішньої секреції. Регуляція

функціонування органів і систем забезпечується внаслідок узгодженої дії складних механізмів на різних рівнях – організмовому, клітинному та молекулярному.

Тканинний рівень організації структурно-функціональною одиницею якого є тканина. Тканини організму являють собою сукупність подібних за походженням, будовою і функціями клітин та міжклітинних структур. Цей рівень організації характерний лише для багатоклітинних організмів, у яких сформувалися дві первинні тканини – сполучна та епітеліальна. З цих тканин у процесі еволюції живих організмів, внаслідок диференціаціювання, утворилися їх різновиди: м'язова, нервова та ін.

Клітинний рівень організації є важливим критерієм живих систем яким вони відрізняються від неживої природи. Згідно з сучасними уявленнями, *клітина* – це впорядкована система, структура, оточена функціонально активною мембраною, яка включає макромолекулярні комплекси та спеціалізовані органели. Це забезпечує скоординованість та узгодженість всіх метаболічних процесів, як необхідну умову підтримання і відтворення живої системи в цілому. Для живих організмів характерні два типи організації клітин:

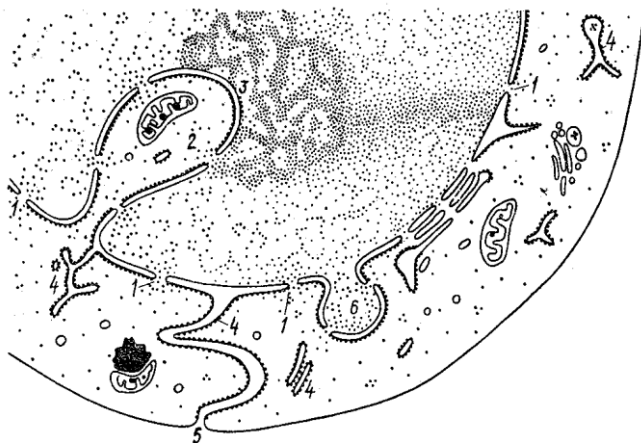
- прокаріотичний, властивий для нижчих організмів (бактерій, синьо-зелених водоростей);
- еукаріотичний, характерний для вищих організмів, у тому числі, і людини (Табл. 1).

Таблиця 1

Органели клітин про- і еукаріот

<i>Органели</i>	<i>Прокаріоти</i>	<i>Еукаріоти</i>
Плазматична мембрана	Присутня	Присутня
Ядерна мембрана	Відсутня	Присутня
Мітохондрії	Відсутні	Присутні
Ендоплазматичний ретикулум	Відсутній	Присутній
Апарат Гольджі	Відсутній	Присутній
Рибосоми	Присутні	Присутні
Клітинні стінки	Складаються з амінокислот і мурамової кислоти	Відсутні у тварин, у рослин складаються з целюлози
Капсула	Якщо є, то складається з мукополісахаридів	Відсутня
Вакуолі	Відсутні	Є у всіх рослинних організмах
Лізосоми	Відсутні	Присутні
Хромосоми	Зустрічаються зрідка	Складаються з ДНК і білка
Апарат фотосинтезу	Мембрани тилакоїдів	Відсутній у тварин

Всі найважливіші процеси, які відбуваються на рівні клітини, у значній мірі, визначають інтенсивність обміну речовин в організмі. Регуляція метаболізму на рівні клітини відбувається внаслідок ядерно-цитоплазматичних взаємних відносин, макромолекулярної взаємодії, транспорту речовин та йонів, посттранскрипційної і постреплікативної модифікації генних продуктів. Можливі шляхи ядерно-цитоплазматичних відносин забезпечуються внаслідок перенесення речовин крізь пори ядерної оболонки, наявності контактів з цитоплазмою та мембранами цитоплазматичного ретикулуму:



Молекулярно-генетичний рівень організації реалізується на рівні атомів і молекул, які є основою структури живих організмів та забезпечують функціонування їх як саморегульованих систем. Атоми і молекули різних хімічних елементів входять до складу низько- і високомолекулярних органічних та неорганічних, простих і складних сполук.

Будь-яка жива система, незалежно від складності організації, реалізується, в першу чергу, на рівні молекул, перетворення яких забезпечує обмін речовин, генерацію та використання енергії, збереження і передачу спадкової інформації. Ці процеси є невід'ємною умовою існування живих організмів при постійному зв'язку їх з довкіллям.

На молекулярному рівні реалізуються всі основні принципи організації матеріального світу. Одночасно з цим, атоми і молекули, що входять до складу живих організмів, мають цілий ряд структурно-

функціональних особливостей, які відрізняють їх від складових неживих тіл.

4. Принципи організації живих систем

У живій природі можна виокремити кілька важливих принципів та закономірностей, які є необхідною умовою існування живих організмів. Обґрунтування основних концепцій цих принципів стало можливим лише після глибокого проникнення в таємниці живої природи на клітинному та субклітинному і молекулярному рівні.

Найважливішими серед них є такі: принцип біохімічної єдності, біохімічної універсальності та мінливості, відповідності будови, функцій і комплементарності.

• **Принцип біохімічної єдності** вказує на те, що до складу клітин всіх живих організмів входять одні і ті ж сполуки та приблизно в однакових кількостях, оскільки вони виконують спільні, характерні для всієї живої природи функції (Табл. 2).

Таблиця 2

Компонентний склад клітин живих організмів

<i>Складові компоненти клітини</i>	<i>Клітини вищих організмів (%)</i>	<i>Клітина бактерії E. coli (%)</i>
Вода	65	70
Білки	16,8 - 20	15
Вуглеводи	1,2	3
Ліпіди	10,5	3
Мінеральні солі	5,6	2

З таблиці видно, що склад клітин організму людини та бактерії E. coli практично ідентичний. До складу клітин входять неорганічні та органічні сполуки, серед яких найважливішою є вода, вміст якої сягає 70-90%. Відсотковий вміст інших складових компонентів (білків, вуглеводів, ліпідів, мінеральних солей) в клітинах про- і еукаріот суттєво не відрізняються.

Принцип біохімічної єдності забезпечує подібність не лише хімічного складу клітин всіх живих організмів але і процесів, які в них відбуваються. Це зумовлено особливостями еволюційного розвитку органічного світу, які характерні для представників всіх таксономічних груп.

• **Принцип біохімічної універсальності** можна проілюструвати як на рівні молекул, так і на рівні організму в цілому. Про біохімічну універсальність свідчить те, що:

- одиницею живого є клітина: кожна клітина походить з клітини;
- протягом кількох мільярдів років ні властивості, ні функції основних атомів елементів та їх сполук, що входять до складу живих організмів, практично не змінювалися;

- універсальну будову мають майже всі ктинні органели в яких проходять чисельні метаболічні процеси;

- однотипною є будова мембранних структур клітин в яких домінуюча роль належить фосфоліпідам як амфіпатичним сполукам;

- структурну основу всіх живих організмів складають сполуки, що містять атоми шести елементів: С, Н, О, Р, N, S, які мають назву *органогенних*. Ці елементи були відібрані у процесі добіологічної еволюції та входять до складу всіх форм живого. Інші хімічні елементи, які є *біогенними* (макро- і мікроелементи), в живих організмах виконують спільні специфічні функції: забезпечують гемостаз (Fe, Cu, Co), тканинне дихання та внутрішньотканинний обмін, входять до складу гормонів (I, Zn) та ферментних систем (Mg, Mn, Co, Cr, Ni);

- вилучення і генерація енергії в клітинах відбувається внаслідок фосфорилуючого окиснення на рівні субстрату та електронно-транспортного ланцюга. Аутотрофні організми (рослини) використовують енергію електромагнітних коливань потоку сонячного випромінювання;

- процеси біоенергетики в організмі забезпечує молекула АТФ, яка інтегрує системи вилучення, генерації та використання енергії;

- універсальними для всіх живих організмів є основні метаболічні цикли, які поєднують процеси асиміляції та дисиміляції внаслідок узгодженої взаємодії анаболічних і катаболічних реакцій;

- універсальними є біологічні каталізатори (ферменти), необхідні для перебігу метаболічних перетворень різних сполук;

- для регуляції процесів життєдіяльності використовуються подібні молекулярні механізми;

• **Принцип біохімічної мінливості** стосується окремих деталей і, як правило, не зачіпає фундаментальних особливостей, характерних для всіх видів живих організмів. Прикладом біохімічної мінливості може бути:

- будова геному клітин про- і еукаріот. У прокаріот він має оперонну організацію, поняття “оперон” для геному еукаріот має відносне значення;

- в геномі еукаріот молекула ДНК асоційована з білками гістонового та негістонового типу, входить до складу хроматину хромосом і міститься в ядерному апараті клітини та на цитоплазматичних ДНК-вмісних структурах;

- у бактеріальних клітинах молекула ДНК локалізована в ядерній зоні клітини та має іншу організацію: не асоційована з білками гістонового типу і є аналогом хромосоми клітин еукаріот;

- генетична інформація в клітинах більшості живих організмів зберігається на структурі ДНК, однак у вірусів і бактеріофагів вона зосереджується як в молекулах ДНК, так і РНК, які мають специфічну структурну організацію;

- передача генетичної інформації у клітинах про- та еукаріот проходить у напрямку: ДНК \rightarrow іРНК \rightarrow білок, а в ретровірусів у зворотньому напрямку (РНК \rightarrow ДНК);

- універсальним для всіх живих організмів є генетичний код – молекулярний механізм, який забезпечує переведення чотирилітерної абетки нуклеїнових кислот на двадцятилітерну абетку білків. Разом з тим, виявлено певні особливості використання чергувань нуклеотидів в кодуванні окремих амінокислот та зміну змісту окремих кодонів;

- всі важливі біополімери клітини (білки і нуклеїнові кислоти) синтезуються за матричним механізмом. Одночасно з цим, існують певні специфічні особливості в перебігу процесів матричного синтезу (реплікації, транскрипції і трансляції) у клітинах про- та еукаріот, а також вірусів і бактеріофагів.

• **Принцип відповідності структури і функцій реалізується на всіх рівнях живої матерії.** Це особливо чітко видно на прикладі сполук, що входять до складу рідин і тканин живих організмів.

- структурна організація білків та нуклеїнових кислот забезпечує виконання ними специфічних життєвоважливих функцій – збереження, передачі та реалізації генетичної інформації і, відповідно, прояви функціональних і морфологічних ознак організмів;

- будова молекули АТФ зумовлює її здатність виступати в ролі універсального акумулятора, донора і трансформатора енергії;

- біологічна активність ферментів, визначається лише їх специфічною (нативною) структурою;

- здатність гемоглобіну забезпечувати дихальну і транспортну функції також залежить від особливостей будови його молекули, що складається з чотирьох субодиниць: двох α -типу (α_1 і α_2) та двох β -типу (β_1 і β_2), які містять гем і глобін та утворюють тетраедричну структуру (Рис. 3).

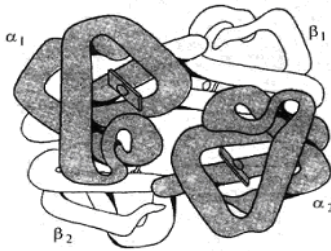


Рис. 3. Четвертинна структура гемоглобіну.

Гемінові угруповання, які зв'язують кисень і забезпечують його транспорт від альвеол легень до тканин організму та CO_2 у зворотному напрямку, розміщені на поверхні молекули. Це полегшує зв'язування гему органічними лігандами та перехід із окисненої форми в карбоксильовану.

У процесі виконання дихальної функції проходять конформаційні зміни субодиниць – стискання та розслаблення молекули, яка ніби “дихає”. У зв'язку з цим, гемоглобін називають “молекулярними легенями”.

• **Принцип комплементарності** може реалізуватися на різних рівнях – молекулярному, клітинному і субклітинному та лежить в основі формування структурної організації біополімерів а також надмолекулярних комплексів і систем, які входять до складу живих організмів. Комплементарність – це просторова та стерична відповідність однієї молекули іншій, або однієї частини молекули іншій. Прикладом може бути комплементарність азотистих основ нуклеотидів пуринового і піримідинового ряду в первинній структурі ДНК, а також функціональних груп активних центрів ферментів при взаємодії їх з субстратами (Рис. 4).

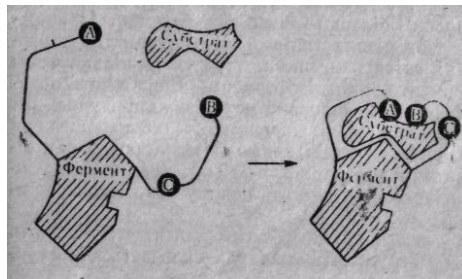


Рис. 4. Взаємодія активного центру ферменту з субстратом.

За принципом комплементарності проходить асоціація рибосом при біосинтезі білка. Цей принцип є також важливою та необхідною умовою самоорганізації різних біологічних структур, характерних для всіх форм живого.

Так, при формуванні вищих рівнів структурної організації білків комплементарність найчастіше реалізується у вигляді ізологічної та гетерологічної взаємодії (Рис. 5).

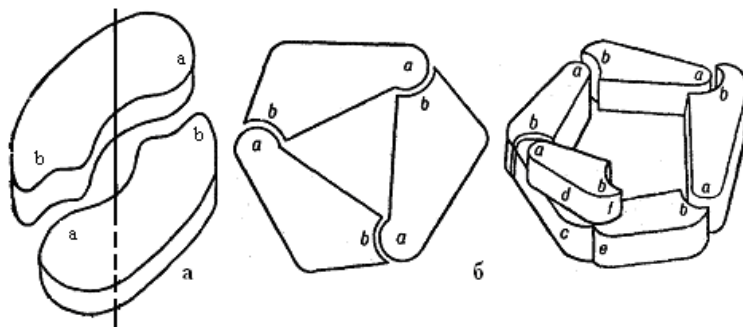


Рис. 5. Ізологічна та гетерологічна взаємодія між субдиніцями олігомерних білків.

У випадку ізологічної взаємодії, комплементарною є вся поверхня субодиниць або протомерів, які контактують при формуванні нативної структури (а). Гетерологічна взаємодія має місце в тому випадку, коли протомери олігомерних білків контактують лише окремими взаємокомплементарними ділянками молекул (б).

ТЕМА: ВЛАСТИВОСТІ ТА ФУНКЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

План

1. Властивості нуклеїнових кислот.
2. Функції ДНК та різних видів РНК.
3. Виділення, кількісне та якісне визначення нуклеїнових кислот.
4. Методи вивчення структури нуклеїнових кислот.

Основна література: [1, с. 119-170]; [2, с. 73-114]; [3, с. 6-12].

Додаткова література: [3]; [4]; [8]; [15]; [19]; [25].

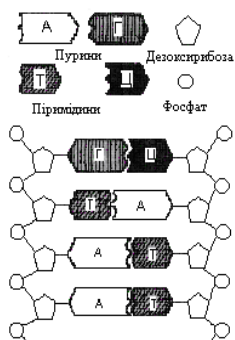
1. Властивості нуклеїнових кислот

Нуклеїнові кислоти – важливий клас біополімерів клітин нижчих і вищих організмів, для яких характерний тріумвірат функцій: збереження, передача та реалізація генетичної інформації. За висловлюванням академіка В. Енгельгардта, нуклеїновим кислотам належить важлива роль – підтримання стабільності в зміні поколінь. В цьому задіяні два види нуклеїнових кислот: ДНК і РНК (іРНК, рРНК, тРНК). За їх участю в клітинах вищих організмів потік генетичної інформації спрямовується в напрямку: ДНК → РНК → білок.

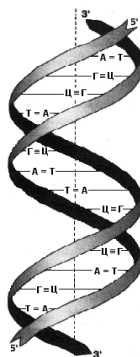
В клітинах більшості організмів, за виключенням РНК-геномних вірусів, носієм генетичної інформації є молекули ДНК, які забезпечують її збереження та передачу наступним поколінням. За хімічною природою нуклеїнові кислоти це нітрогенвмісні гетеробіополімери, молекули яких містять велику кількість мономерних ланок – мононуклеотидів пуринового і піримідинового ряду, сполучених міжнуклеотидними фосфодиефірними зв'язками.

Два види нуклеїнових кислот – ДНК і РНК різняться цілим рядом специфічних критеріїв: компонентним складом, будовою, локалізацією в клітині, функціями. ДНК, як правило, локалізована в ядрі еукаріотичних клітин або ядерній зоні прокаріот, а РНК – в цитоплазмі. До складу нуклеотидів ДНК входять такі азотисті основи як аденін, гуанін, цитозин і тимін та вуглеводний компонент α -D-дезоксирібофураноза. Нуклеотиди РНК замість тиміну містять урацил, а в якості вуглеводного компонента – α -D-рибофуранозу. Суттєвою є різниця і в структурній організації ДНК і РНК. Зокрема, первинна структура ДНК це порядок чергування мононуклеотидів у двох взаємно комплементарних, протилежно орієнтованих ланцюгах, один з яких має напрям $3' \rightarrow 5'$, а другий – $5' \rightarrow 3'$ (а). Відповідно,

вторинна структура ДНК – це подвійна спіраль комплементарних ланцюгів ДНК, закручена навколо однієї спільної осі. Стабілізують її водневі зв'язки між комплементарними парами азотистих основ нуклеотидів пуринового і піримідинового ряду (А – Т, Г – Ц) (б), та стекинг-взаємодія.

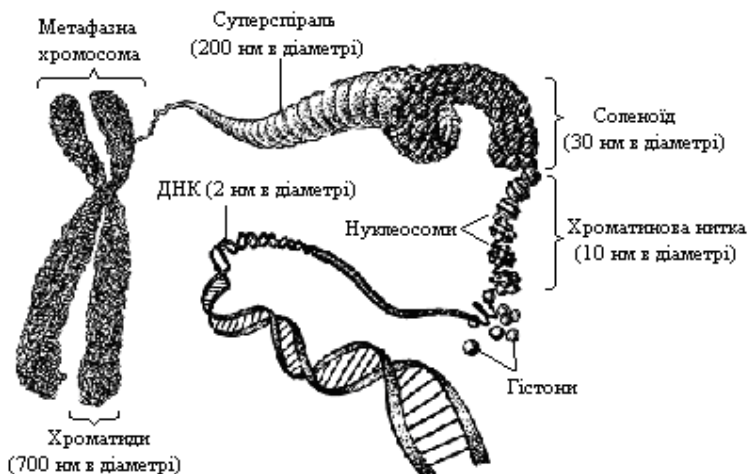


(а)



(б)

Враховуючи будову і функції ДНК, її називають “сходишками життя”. Інші, вищі рівні структурної організації ДНК в клітинах еукаріот забезпечують її компактизацію в хроматині хромосом:



Набір молекул РНК, на відміну від ДНК, є гетерогенним і представлений різними їх видами (іРНК, рРНК, тРНК).

Гетерогенність молекул РНК у клітинах про- і еукаріот та їх специфічні функції лежать в основі передачі і реалізації генетичної інформації внаслідок матричного синтезу білків (експресії генів).

Коефіцієнт поліконденсації залишків мононуклеотидів у молекулах нуклеїнових кислот складає значну величину – від сотень тисяч до десятків мільйонів. У зв'язку з цим, для них характерні високі значення *молекулярної маси*, яка є їх важливою характеристикою.

Молекулярну масу ДНК та різних видів РНК виражають в Дальтонах (Да) і визначають за добутком $M_r = n * m$, де n – кількість нуклеотидних пар, а m – маса одного мононуклеотиду для РНК, або пари нуклеотидів для ДНК. Ці величини, відповідно складають 330 та 660 Да.

Один Дальтон чисельно дорівнює атомній одиниці маси і складає $1,66057 \times 10^{-27}$.

Значення абсолютної маси нуклеїнових кислот (в мкг, пкг) визначають за формулою:

$$m = \frac{M_r}{N}, \quad \text{де } M_r \text{ – молекулярна маса (Да);}$$
$$N \text{ – число Авогадро } (6,02 \times 10^{23}).$$

Вміст нуклеїнових кислот у клітинах різних тканин одного і того ж організму постійний в розрахунку на гаплоїдний набір хромосом та змінюється відповідно до зміни плоідності, але в меншій мірі, ніж вміст інших компонентів клітини, хоч існують і певні виключення з цього правила.

В ядрі диплоїдних клітин еукаріот міститься 1-7 пкг ДНК, а в нуклеїді клітин прокаріот, відповідно, 0,002-0,06 пкг (1 пікограм складає 10^{-12} г). Тобто, вміст ДНК у клітинах еукаріот значно вищий, ніж у прокаріот. Геномна ДНК еукаріот включає 3,2 млрд. нуклеотидних пар.

В складі ДНК клітин прокаріот число пар нуклеотидів може складати від десятків тисяч до кількох мільйонів.

Враховуючи це, значно різняться і значення молекулярної маси ДНК та РНК про- і еукаріот. Найвищі значення молекулярної маси характерні для ядерної ДНК людини і вищих тварин, а також для гетерогенної ядерної РНК, яка є первинним продуктом транскрипції генів та для деяких вірусних ДНК. Значення молекулярної маси різних видів РНК на декілька порядків нижчі. (Табл. 4; 5).

Таблиця 4

**Значення молекулярної маси нуклеїнових кислот
клітин еукаріот**

<i>Вид НК</i>	<i>Число різних видів у клітині</i>	<i>Молекулярна маса (Да)</i>	<i>Локалізація</i>	<i>Форма</i>	<i>% вміст</i>
Геномна ДНК людини	1	$3,2 \times 10^{10}$	Ядро	Дволанцюгова	97-99%
	1	1×10^7	Мітохондрії	Дволанцюгова	
іРНК	Кілька тисяч	4×10^4	Цитоплазма	Одноланцюгова	5%
гяРНК	Десятки	$1,2 \times 10^6$	Ядро	Одноланцюгова	2%
тРНК	80-100	$2,5 \times 10^4$	Цитоплазма Мітохондрії	Одноланцюгова	10%
рРНК		4×10^4 - 6×10^5	Рибосомний апарат	Одноланцюгові молекули	80%
ДНК дрозофіли		4×10^6	Ядро	Дволанцюгова	97-99%

Таблиця 5

Значення молекулярної маси нуклеїнових кислот вірусів і фагів

<i>Вид НК</i>	<i>Число різних видів у складі геному</i>	<i>Молекулярна маса</i>	<i>Форма</i>
ДНК-вмісні віруси			
Вірус гепатиту	1	2×10^5	Одноланцюгова кільцева форма
Аденовірус	1	$2,1 \times 10^6$	Лінійний дуплекс
Вірус герпеса	1	$1,3 \times 10^8$	Лінійний дуплекс
Вірус віспи	1	$1,3 \times 10^8$	Ковалентно замкнений дуплекс
Вірус SV40	1	$3,5 \times 10^6$	Дволанцюгове кільце
Бактеріофаг фХ174	1	$1,7 \times 10^6$	Одноланцюгове кільце
Бактеріофаг λ	1	$3,2 \times 10^7$	Лінійна дволанцюгова молекула
РНК-вмісні віруси			
Ретровіруси	2	$3,3 \times 10^6$	Одноланцюгові молекули
Вірус грипу	8	$5,3 \times 10^6$	Одноланцюгові молекули
Поліовірус	1	$2,3 \times 10^6$	Одноланцюгова молекула
ВТМ	1	$2,3 \times 10^9$	Одноланцюгова молекула
Реовірус	10	$9,9 \times 10^6$	Дволанцюгові молекули

Для нуклеїнових кислот характерні специфічні фізико-хімічні властивості, зумовлені їх хімічною природою та будовою.

Виділені з біоматеріалу та очищені нуклеїнові кислоти являють собою речовини білого кольору, волокнистої структури, погано розчинні у воді, та добре розчинні в лужних розчинах натрієвих та

калієвих солей. РНК краще розчиняється в розчинах низької концентрації, а ДНК – у концентрованих. Розчинність одноланцюгових молекул значно вища, ніж дволанцюгових, тобто для РНК характерна вища розчинність, ніж для ДНК. Внаслідок іонізації міжнуклеотидних фосфатних залишків, у водному середовищі молекули нуклеїнових кислот існують у вигляді поліаніонів. У зв'язку з цим, вони можуть хелатувати позитивно заряджені йони металів та утворювати стійкі комплекси.

Високі значення молекулярної маси та асиметричність атомів мономерних ланок нуклеїнових кислот зумовлюють їх специфічні властивості, характерні для біополімерів клітини.

Оптична активність. Сполуки, що містять асиметричні атоми можуть повертати площину поляризованого променя світла на певний кут. Молекули нуклеїнових кислот є правовертаючими, що позначається знаком плюс (+). Кут повертання суттєво зменшується при розходженні ланцюгів ДНК та порушенні комплементарності азотистих основ. Так, питома активність ($[\alpha]^D$) розчинів дволанцюгових молекул ДНК складає 150° . Для розчинів одноланцюгових РНК і ДНК, при тій же довжині хвилі, цей показник у 4-6 разів нижчий. Висока питома активність дволанцюгових молекул ДНК зумовлена просторовою орієнтацією моонуклеотидних ланок у їх молекулі. При розходженні ланцюгів ДНК та утворенні одноланцюгових форм питома активність значно знижується. Це є одним із критеріїв, який засвідчує нативність первинної структури ДНК.

Важливою властивістю нуклеїнових кислот є здатність поглинати світло при довжині хвилі 260 нм (характерна особливість азотистих основ). Цей показник для одноланцюгових молекул при 260 нм на 40% нижчий, ніж для дволанцюгових.

Зниження здатності до поглинання світла, після розходження ланцюгів ДНК та утворення одноланцюгових форм має назву гіпохромного ефекту. Він є важливою характеристикою ДНК і свідчить про наявність нативної первинної структури у вигляді двох антипаралельних протилежно спрямованих ланцюгів.

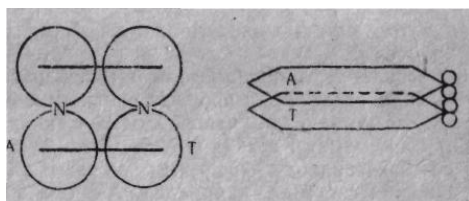
Для розчинів ДНК характерне явище *дихроїзму*, суть якого у зміні ступеня поглинання світла, поляризованого відносно орієнтації осі молекули. Вищі значення цього показника спостерігаються в тому випадку, коли світло поляризоване перпендикулярно до осі молекули і знаходиться у площині азотистих основ, гетероцикли яких у подвійній спіралі розміщені паралельно одні над одними. Для РНК цей ефект виражений у меншій мірі і характерний для структури ділянок

молекули, які організовані у вигляді шпильок. Абсолютні значення дихроїзму для ДНК залежать від конформації ланцюгів і кутів нахилу між площинами гетероциклів азотистих основ нуклеотидів та віссю спіралі, тобто різні для А- і В-форм ДНК. Для А-форми ДНК цей кут складає 70° , а для В-форми відповідно 90° .

Гідродинамічні властивості. Для молекул нуклеїнових кислот характерні високі значення ступеня ламкості при гідродинамічних навантаженнях. Ламкість дволанцюгових макромолекул ДНК визначають за лабільністю їх до дії ультразвуку та ряду інших фізичних чинників. Навіть при незначних гідродинамічних навантаженнях, зумовлених зміною градієнту щільності рідини та швидкості потоку розчину, відбувається руйнування подвійної спіралі ДНК та її фрагментація.

Гідродинамічні властивості нуклеїнових кислот, у значній мірі, залежать від іонної сили розчину та значень рН, оскільки їх молекули містять іоногенні функціональні групи, ступінь іонізації яких у водних розчинах може бути різний. Стійкість дволанцюгових спіралізованих молекул ДНК зберігається в межах рН 4... 11 та іонній силі розчину від 10^{-3} до кількох одиниць. Це вказує на надійну стабілізацію структури ДНК водневими зв'язками, силами Ван-дер-Ваальса та стекинг-взаємодією між площинами азотистих основ нуклеотидів, розміщених паралельно одні над одними, відносно осі спіралі.

Квантово-механічні розрахунки електронної структури, ДНК свідчать, що між комплементарними парами А—Т і Г—Ц відбувається перекривання π -орбіталей, а це призводить до того, що комплементарні пари азотистих основ утворюють спільну π -електронну структуру:



При дії на ДНК різних чинників фізичної чи хімічної природи – температури, ультразвуку, зміни іонної сили, рН середовища, присутності різних детергентів, водневі зв'язки між комплементарними парами азотистих основ нуклеотидів можуть руйнуватися, що зумовлює порушення нативної структури. За цих умов, проходить розходження комплементарних ланцюгів ДНК.

Оскільки, наслідком цього є також втрата молекулою не лише структурної організації, але і біологічних властивостей та функцій, цей процес дістав назву **денатурації**.

Денатурація – це руйнування подвійної спіралі ДНК, розходження ланцюгів, внаслідок розриву водневих зв'язків між комплементарними парами азотистих основ нуклеотидів. Тобто, при денатурації ДНК порушуються всі види зв'язків, що стабілізують нативну структуру ДНК крім ковалентних, міжнуклеотидних (фосфодіефірних), характерних для первинної структури кожного з двох взаємокомплементарних антипаралельних протилежно орієнтованих ланцюгів.

Внаслідок денатурації змінюються і фізико-хімічні властивості ДНК, зокрема, підвищується оптична активність розчинів, зменшується їх в'язкість та змінюється кут питомого обертання. Денатурація включає кілька етапів: порушення вищих рівнів організації ДНК, розкручування подвійної спіралі, руйнування водневих зв'язків між комплементарними парами азотистих основ, розходження полінуклеотидних ланцюгів, внаслідок чого утворюється безладний клубок і відбувається перехід: спіраль → нитка → клубок (Рис. 6).

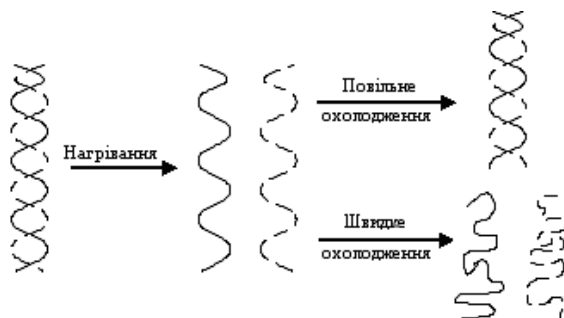


Рис. 6. Денатурація та ренатурація молекул ДНК.

Якщо дія денатуруючого чинника припиняється на початку процесу, то структура ДНК може поновлюватися і проходить *ренатурація*.

Встановлено, що оптимальними умовами для ренатурації ДНК є значення рН в межах 5... 9 та іонна сила розчину 0,4, оскільки це зумовлює іонізацію функціональних груп і зниження чи посилення інтенсивності сил електростатичної взаємодії. При значеннях рН < 2,7 і > 12 денатурація відбувається навіть при звичайній температурі. При

температурній денатурації, після зниження температури, можливе поновлення структури ДНК. Так, якщо після нагрівання розчин ДНК повільно охолодити до значень на 25° нижчих температури плавлення, відбувається ренатурація молекули, поновлення дволанцюгових структур та властивостей.

Ренатурація денатурованих молекул ДНК при повільному охолодженні має назву „віджигу“.

Ступінь ренатурації залежить від нуклеотидного складу ДНК. Ефективніше цей процес відбувається у випадку ГЦ-типу ДНК, характерного для прокариот. Крім того, оскільки, на структурі ДНК еукаріот зустрічається велика кількість різних повторів нуклеотидів, це ускладнює процес ренатурації. Зокрема, ренатурація ДНК еукаріот включає швидкі стадії – на ділянках, де присутні чисельні повтори нуклеотидів, і повільні – на ділянках унікальних повторів нуклеотидів.

Перебіг процесу ренатурації може надати цінну інформацію про нуклеотидний склад ДНК: якщо ланцюги ДНК містять значну кількість комплементарних пар азотистих основ нуклеотидів, ренатурація буде проходити інтенсивніше, ніж у випадку, коли комплементарність відсутня.

Крім теплової денатурації ДНК, під впливом різних хімічних реагентів (кислот, основ, лугів, розчинів солей), може відбуватися *хімічна денатурація*. Особливістю цього процесу є те, що внаслідок модифікації функціональних груп азотистих основ нуклеотидів наступна ренатурація стає неможливою. При хімічній денатурації значно змінюються також і фізико-хімічні властивості молекул ДНК.

Своєрідний вплив на ДНК виявляє також іонізуюче випромінювання, що може зумовлювати не лише модифікацію азотистих основ нуклеотидів, але й фрагментацію ланцюгів, що призводить до незворотньої втрати біологічних властивостей і функцій.

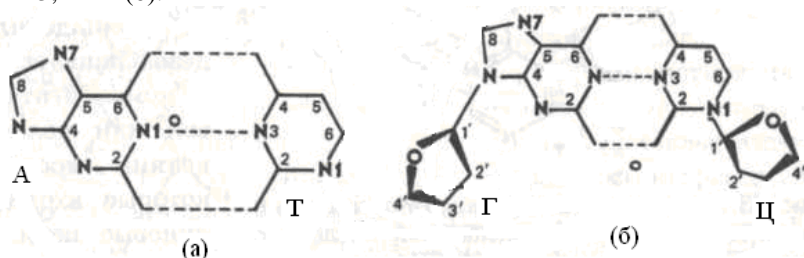
Процеси денатурації та ренатурації ДНК мають кооперативний характер тобто, в їх перебігу важливе значення мають різні фактори. При температурній денатурації ДНК, як правило, відбувається розходження ланцюгів та утворення одностанцюгових фрагментів. Одночасно з цим, при досягненні певної температури, кількість дво- та одностанцюгових фрагментів на молекулі ДНК врівноважується, тобто ДНК, в цьому випадку, буде знаходитися наполовину в денатурованому стані.

Температура, при якій кількість дволанцюгових фрагментів в складі молекули ДНК дорівнює кількості одностанцюгових, має назву температури плавлення (Тпл.).

Температура плавлення це індивідуальна характеристика молекул ДНК і за певних стабільних умов (рН середовища, тиску, іонній силі розчину) є сталою величиною.

ДНК людини має $T_{пл}$ 81-82°C, а ДНК бактерії *E. coli*, відповідно, 90,5°C. Температура плавлення ДНК, у значній мірі, залежить також від молекулярної маси та нуклеотидного складу полінуклеотидних ланцюгів.

Так, збільшення молярної маси ГЦ-пар в складі молекул ДНК до 2,5% сприяє підвищенню температури плавлення на 1°C, що зумовлене особливостями їх стабілізації: АТ-пари стабілізують два водневих зв'язки в положенні 6→4 і 1→3 азотистих основ пуринового і піримідинового ряду (а), ГЦ-пари стабілізують три водневих зв'язки, відповідно в положеннях пуринових і піримідинових циклів 6→4; 1→3; 2→2 (б):



Встановлено, що тандемні повтори ГЦ-пар, локалізовані на структурі ДНК, можуть утворювати термостабільні кластери, що значно підвищує стійкість молекул ДНК до дії температури. Цим пояснюється можливість існування нижчих організмів, які мають ГЦ-тип ДНК, в термальних джерелах.

Емпірична залежність між вмістом ГЦ-пар на структурі ДНК і температурою плавлення ($T_{пл}$) має такий вигляд:

$$T_{пл} = 69,3 + 0,41x, \text{ де } x - \text{кількість ГЦ пар у відсотках.}$$

$$T_{пл} - 69,3$$

$$\text{Відповідно, кількість ГЦ пар} = \frac{\quad}{0,41}$$

Характерним є те, що температура плавлення дволанцюгових РНК завжди вища, ніж ДНК, що можна пояснити наявністю в складі їх нуклеотидних ланок, відповідно, рибози та дезоксирибози. Наявність гідроксогруп у 2'-положенні рибофуранозного циклу рибози зумовлює утворення вертикальних водневих зв'язків між атомом гідрогену цієї гідроксогрупи і атомом кисню чи нітрогену залишків азотистих основ нуклеотидів. Це, у свою чергу, обмежує можливість флуктуацій навколо β, N -глікозидних зв'язків та зменшує сили стекінг-взаємодії

між паралельно розміщеними площинами азотистих основ. Тобто, вертикальні водневі зв'язки, які орієнтовані паралельно до осі спіралі, значно підвищують стабільність молекул ДНК.

На температуру плавлення нуклеїнових кислот значний вплив має також іонна сила розчину, збільшення якої призводить до підвищення цього показника. Присутність в розчині йонів металів по різному впливає на температуру плавлення ДНК та стабільність дволанцюгових структур. Зокрема, йони Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} підвищують стабільність їх молекул, а йони Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} - знижують.

Гібридизація нуклеїнових кислот. Ланцюги денатурованих молекул ДНК можуть за принципом комплементарності взаємодіяти з іншими одноланцюговими фрагментами ДНК-ової і РНК-ової структури. Цей своєрідний вид ренатурації дістав назву *гібридизації*, яка може бути двох видів: ДНК \rightarrow ДНК та ДНК \rightarrow РНК.

- *ДНК \rightarrow ДНК гібридизація* дає змогу встановити генетичну спорідненість організмів. Для ініціації цього виду гібридизації достатньо наявності в складі полінуклеотидів близько 12 комплементарних пар азотистих основ нуклеотидів. Якщо змішати препарати денатурованих одноланцюгових ДНК, виділених з організмів одного виду, проходить 100% гібридизація молекул. При змішуванні препаратів ДНК, виділених з різних видів організмів, ступінь гібридизації визначається їх максимальною генетичною спорідненістю, зумовленою первинною структурою полінуклеотидних ланцюгів і здатністю утворювати комплементарні пари. Гібридні молекули таксономічно віддалених видів організмів є недосконалими: комплементарні фрагменти чергуються з некомплементарними, спіралізовані з неспіралізованими.

Високий ступінь ДНК \rightarrow ДНК гібридизації вказує на те, що ДНК, виділені з органів та тканин одного і того ж організму та різних тканин осіб одного виду, є ідентичними, хоч можуть бути певні відмінності за нуклеотидним складом, які не можливо виявити методом гібридизації. Так, подвійна спіраль ДНК не утворюється, якщо не комплементарні ділянки містять більше 3-5 пар нуклеотидів. Молекули ДНК, виділені з тканин різних видів організмів, неідентичні. Ступінь недосконалості гібридів ДНК \rightarrow ДНК тим вищий, чим віддаленіші за філогенетичною спорідненістю види. На основі ДНК \rightarrow ДНК гібридизації вивчають систематику живих організмів.

- *ДНК \rightarrow РНК гібридизація.* При гібридизації ДНК і первинних транскриптів РНК, виділених з одного організму, утворюються 100% гібриди, що вказує на комплементарність ланцюгів цих молекул.

За рівнем гібридизації молекул РНК з денатурованими молекулами ДНК можна визначити тип РНК, первинну структуру та походження, а також встановити ідентичність нуклеотидного складу різних видів нуклеїнових кислот. З цією метою, проводять плавлення молекул ДНК, внаслідок чого утворюються одноланцюгові структури. Далі, в середовище, при повільному охолодженні, вносять досліджувані фрагменти інших молекул. За цих умов, буде проходити утворення гібридних дволанцюгових фрагментів, кількість яких залежить від наявності комплементарних пар азотистих основ мононуклеотидів у їх складі. Наявність гібридних ділянок між ланцюгами, які раніше входили до складу різних молекул, визначають методом рівноважного центрифугування у градієнті густини $CsCl_2$ або за допомогою блот-гібридизації.

Гібридизація може відбуватися також між, так званими, „липкими кінцями”, тобто одноланцюговими фрагментами однієї і тієї ж молекули, які містять комплементарні пари азотистих основ. Результатом цього, є утворення кільцевих форм ДНК, внаслідок нековалентної взаємодії комплементарних „липких кінців”.

Здатність молекул нуклеїнових кислот до гібридизації використовують у генетичній інженерії для створення рекомбінантних молекул ДНК, а також для визначення первинної структури ДНК і РНК. Першу гібридну (рекомбінантну) ДНК було отримано П. Бергом (1972 р.).

2. Функції ДНК та різних видів РНК

З'ясуванню біологічних функцій нуклеїнових кислот у клітинах про- і еукаріот сприяла розробка та застосування методів їх виділення, розділення та ідентифікації за допомогою специфічних барвників. Зокрема, вивчення здатності нуклеїнових кислот до взаємодії з основними барвниками, при цитохімічному виявленні, дало змогу визначити місце їх локалізації в клітині. Виявилось, що найбільша кількість нуклеїнових кислот міститься у ядрі та кампартментах клітини, де проходить інтенсивний синтез білків. Однак, найважливішим у вивченні біологічних функцій нуклеїнових кислот, було з'ясування їх ролі у процесах експресії генів.

На основі чисельних досліджень було встановлено генетичну роль нуклеїнових кислот, тобто здатність забезпечувати збереження, передачу і реалізацію генетичної інформації.

Генетична роль нуклеїнових кислот може реалізовуватися двома шляхами. Суть першого, в передачі інформації від ДНК до ДНК, що є необхідним для збереження видоспецифічної генетичної інформації та

передачі її від покоління до покоління. Другий шлях – передача генетичної інформації в напрямку ДНК → іРНК, що забезпечує метаболічну активність клітин, внаслідок синтезу видоспецифічних білків за схемою: ген → білок → ознака що реалізується за участю різних видів рибонуклеїнових кислот (іРНК, рРНК, тРНК).

Згодом було з'ясовано, що носієм інформації можуть бути як молекули ДНК, так і РНК, що характерно для вірусів.

Тобто, при реплікації (самоподвоєнні) молекул ДНК або РНК (у РНК-вмісних вірусів), генетичний матеріал у клітині постійно самовідтворюється. Другий шлях реалізується внаслідок поєднання таких видів матричного синтезу: транскрипції і трансляції. Тобто, генетична функція нуклеїнових кислот є невід'ємною умовою перебігу процесів, які лежать в основі вираженості фенотипових ознак організму.

Це стосується, в першу чергу ДНК, як носія генетичної інформації. Вона володіє як здатністю до самовідтворення власної структури, внаслідок комплементарного копіювання генетичної інформації, закодованої на її антипаралельних протилежно орієнтованих ланцюгах, так і до передачі цієї інформації наступним поколінням.

У формуванні уявлень про генетичну роль нуклеїнових кислот важливим моментом було з'ясування механізмів збереження, передачі генетичної інформації та її реалізації в первинній структурі білків. Всі ці процеси забезпечують не лише молекули ДНК, але і різні види РНК, які виконують специфічні функції.

У структурі ДНК генетична інформація закодована в чергуванні триплетів – трьох нуклеотидів пуринового і піримідинового ряду. Ця інформація, за принципом комплементарності, “переписується”, транскрибується на структуру іРНК, яка є безпосередньою матрицею для синтезу білків. іРНК містять кодони – чергування трьох нуклеотидів, що визначають включення до складу молекул білків різних амінокислот. Реалізація первинної структури іРНК, у процесі синтезу білка на рибосомному апараті клітини відбувається внаслідок специфічного молекулярного механізму – генетичного коду, який було розшифровано в 60-х роках ХХ ст. М. Ніренбергом і Х. Корана. Цей код дістав назву триплетного. Триплетність генетичного коду була підтверджена Ф. Кріком в дослідях із „зсувом рамки зчитування”, проведених на клітинах бактеріофагу Т4.

Генетичний код забезпечує переведення чотирилітерної абетки нуклеїнових кислот у двадцятилітерну абетку амінокислот.

Роль перекладача (адаптора) генетичної інформації, закодованої в структурі матриці, виконують тРНК, антикодони яких комплементарні до кодонів іРНК.

Для перебігу процесу трансляції генетичної інформації важливе значення має ще один вид нуклеїнових кислот – рРНК, які є основою структури рибосомного апарату клітини. Біосинтез білків може відбуватися на окремих вільних рибосомах або на рибосомах, зв'язаних з мембранами гранулярного ендоплазматичного ретикулу. В першому випадку синтезуються білки, які необхідні для забезпечення життєдіяльності самої клітини, а у другому – так звані „експортні білки”. Якщо для ДНК найважливішою функцією є збереження генетичної інформації та передача її наступним поколінням під час клітинного циклу, то для РНК функції не обмежуються лише їх участю у втіленні генотипу у певний фенотип, що забезпечується різноманітністю синтезованих білків. Тобто, гетерогенність РНК зумовлює їх поліфункціональність.

У 70-х роках ХХ ст. було встановлено, що РНК може не лише виконувати роль матриці при синтезі видоспецифічних білків, але і забезпечувати передачу інформації та відтворення власної структури в РНК-геномних вірусів. Потік інформації в цьому випадку спрямовується у протилежному напрямку: РНК → ДНК.

Тобто, було виявлено неканонічні функції РНК, що поставило цей вид нуклеїнових кислот у центр основного постулату молекулярної біології. З'ясування функцій РНК у процесах експресії генів свідчить, що вони можуть бути як месенжерами передачі генетичної інформації, так і адапторами, які переводять цю інформацію. Крім того, різні види РНК формують структуру рибосом, забезпечують транспорт активованих амінокислот до рибосомного апарату клітини під час трансляції генетичної інформації, та посттранскрипційну модифікацію первинних транскриптів. Специфічні молекули РНК можуть виконувати роль регуляторів ініціації реплікації внаслідок блокування праймерів та припинення синтезу ланцюгів ДНК, комплементарних до матриці. Окремі види РНК володіють ферментативною активністю (рибозими) і можуть забезпечувати власну посттранскрипційну модифікацію (аутосплайсінг).

Відкриття ферментів рибозимаз дало підстави для припущення, що у виникненні первинних форм живого на нашій планеті важлива роль належала саме молекулам РНК. Тобто, очевидно, РНК на ранніх етапах еволюції стала тією первинною молекулою яка, задовго до ДНК, могла виконувати важливі генетичні функції, що сприяло формуванню живих систем. Припускають, що нуклеотиди РНК-ової

структури, які утворилися внаслідок хімічної еволюції в абіотичному середовищі, могли виконувати роль кофакторів специфічних ферментів від яких залежав двосторонній обмін речовин у протобіонтів, що сприяло їх специфічному відбору та наступній еволюції. Під впливом фізико-хімічних процесів, які відбувалися в біосфері, з мононуклеотидів РНК-ової структури, очевидно, формувалися полінуклеотидні ланцюги, що в подальшому призвело до їх комплементарного з'єднання і формування дволанцюгових молекул ДНК. Це, до певної міри, підтверджується важливими функціями РНК у неклітинних форм існування матерії – РНК-геномних вірусах, в яких носіями генетичної інформації є РНК.

Всі ці припущення стали підґрунтям для формування концепції „Світ РНК”, яка широко обговорюється і дискутується серед представників різних наукових шкіл. Для обґрунтування цієї концепції проводяться інтенсивні пошуки ферментів, які можуть забезпечити аутокаталітичний синтез РНК. Припускають, що вони можуть бути закодовані на інтронних ділянках певних видів РНК еукаріотичних клітин.

У 70-80-х роках ХХ ст. було відкрито інфекційні фактори білкової природи (пріони), які не містять нуклеїнових кислот, однак є носіями патогенності. Тобто, носієм певної біологічної інформації в цьому випадку є конформація пріонного білка. На перший погляд, ця особливість пріонів ніби заперечує основний постулат молекулярної біології стосовно того, що генетична інформація закодована на структурі ДНК і що саме ця молекула є її носієм та реалізується внаслідок синтезу видоспецифічних білків, які визначають специфічні ознаки організму в цілому. Однак, дослідженнями останніх років було з'ясовано проблему, пов'язану з пріонами, та доведено незаперечне значення постулатів фундаментальної генетики стосовно генетичної ролі нуклеїнових кислот.

3. Виділення та визначення нуклеїнових кислот

Методи виділення нуклеїнових кислот з біоматеріалу ґрунтуються на їх фізико-хімічних властивостях і включають: подрібнення (гомогенізацію), екстрагування за участю різних розчинників, очищення, розділення та якісне і кількісне визначення.

Подрібнену (гомогенізовану) тканину обробляють органічними розчинниками для знежирення (звільнення від ліпідів), екстрагують різними концентраціями хлорної чи трихлорацетатної кислоти. Очищення отриманих гомогенатів проводять за допомогою натрій хлориду: гомогенат суспендують, центрифугують, осад, що містить

домішки, видаляють, а нуклеїнові кислоти переосаджують спиртом і розділяють за допомогою диференційованого центрифугування чи центрифугування у градієнті густини розчином CSCl_2 або сахарози. Далі проводять електрофорез на агаровому або поліакриламідному гелі. Вміст нуклеїнових кислот визначають методом денситрометрії. Розділити нуклеїнові кислоти можна також на колонках, заповнених похідним целюлози – диетиламіноетилцелюлозою (ДЕАЕЦ).

Для визначення нуклеїнових кислот застосовують якісні і кількісні методи.

Якісне визначення нуклеїнових кислот у клітинах проводять цитохімічними методами за допомогою різних барвників з наступним оцінюванням результатів мікроскопією. Найчастіше застосовують основний фуксин або реакцію Фельгена: ДНК визначають за специфічним червоним забарвленням. Чутливою є також реакція з Піроніном та Метиленовим зеленим. Ці барвники дають змогу виявити локалізацію у клітині як РНК так і ДНК. Зокрема, ДНК вибірково адсорбує Метиленовий зелений з утворенням комплексу синього кольору, а РНК – червоного. Реакція зумовлена наявністю фосфатних залишків у складі нуклеотидів. Інші барвники також дають змогу якісно визначити як ДНК, так і РНК. Так, з індолом ДНК дає жовте забарвлення, а РНК – коричневе.

Кількісне визначення нуклеїнових кислот ґрунтується на їх фізико-хімічних властивостях – здатності розчинів до поглинання променів світла певної довжини хвилі в ультрафіолетовій ділянці спектра та на особливостях компонентного складу (кольорових реакціях певних реагентів при взаємодії з рибозою, дезоксирибозою чи фосфатом).

Серед кольорових реакцій на вуглеводний компонент для кількісного визначення нуклеїнових кислот найчастіше застосовують реакцію з Дифеніламіном, який взаємодіє з дезоксирибозою з утворенням комплексу, забарвленого в синій колір. Комплекс Дифеніламіну з рибозою має зелене забарвлення, інтенсивність якого максимальна при довжині хвилі 595 нм. При визначенні нуклеїнових кислот за вуглеводним компонентом, гомогенати тканин очищають від білків осадженням трихлорацетатною кислотою (ТХА). Після цього, ДНК і РНК визначають за кольоровими реакціями з орцином, флюороглюцином, бромфенілгіdraзином. Найдоцільнішим є кількісне визначення нуклеїнових кислот за вмістом фосфору, оскільки ця реакція не залежить від їх нуклеотидного складу. З цією метою досліджувані зразки мінералізують і вміст фосфору визначають у присутності амоній молібдату, фотоелектроколориметричним методом.

Інтенсивність синього забарвлення утвореного комплексу пропорційна вмісту фосфору. Для кількісного визначення ДНК і РНК застосовують також метод, запропонований Г. Шмідтом і С. Тангаузером. Він ґрунтується на тому, що ДНК і РНК містять різні вуглеводні компоненти: у РНК в 2'-положенні рибози знаходиться вільна ОН-група, яка відсутня в дезоксирибозі ДНК. У лужному середовищі проходить руйнування 5'→3' міжнуклеотидних фосфодієфірних зв'язків та утворення 2'-3'-циклічних нуклеотидів, які переходять в надосадову рідину. Після лужного гідролізу ДНК і РНК розділяють за допомогою натрій чи калій гідроксиду, після чого підкислюють середовище додаванням хлорної кислоти. За цих умов ДНК і білки випадають в осад, а РНК залишається в надосадовій рідині. З утвореного осаду ДНК вилучають за допомогою ТХА або хлорної кислоти, переосаджують спиртом або кількісно визначають в надосадовій рідині.

4. Методи вивчення структури нуклеїнових кислот

З огляду на особливості біологічних властивостей і функцій нуклеїнових кислот важливим є також вивчення їх структури.

Нуклеїнові кислоти в клітинах еукаріот компактно укладаються у складі хроматину хромосом, завдяки наявності кількох рівнів їх структурної організації – *нуклеосомного, соленоїдного, супербідного, доменного і петлеподібного* (Рис. 7а). В прокаріотичних клітинах компактизація ДНК відбувається внаслідок суперспіралізації нуклеоїду без участі білків гістонового типу (Рис. 7б).

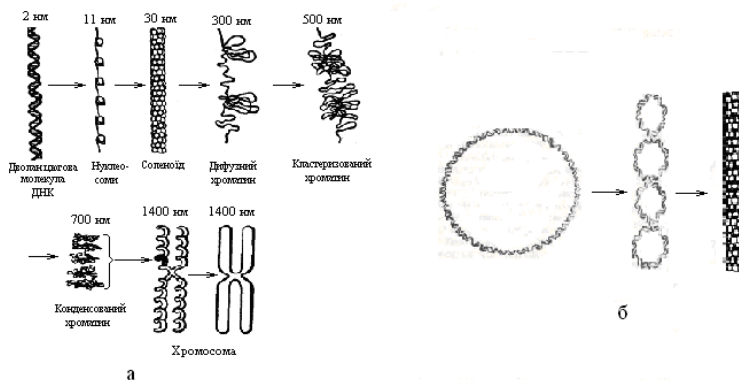


Рис. 7. Компактизація ДНК в клітинах еукаріот (а) і прокаріот (б).

Як правило, для вивчення структури нуклеїнових кислот застосовують різні фізико-хімічні методи – рентгеноструктурний аналіз, ядерний парамагнітний резонанс, електронну мікроскопію. Зокрема, за допомогою рентгеноструктурного аналізу було отримано важливу інформацію про впорядковану вторинну структуру молекул ДНК у вигляді подвійної спіралі, що дало можливість з'ясувати важливі біологічні функції цієї молекули. Враховуючи високі значення молекулярної маси нуклеїнових кислот, не менш складною проблемою є вивчення їх первинної структури.

Інтенсивне вивчення первинної структури нуклеїнових кислот проводилося протягом 60-70-х років ХХ ст. Цьому, в першу чергу, сприяло відкриття та вивчення особливостей дії ферментів рестриктаз, для яких характерна висока субстратна специфічність – здатність “розрізати” (секвенувати) полінуклеотидні ланцюги за місцем локалізації певних мононуклеотидних залишків пуринового чи піримідинового ряду. Специфічні рестриктази розпізнають в структурі молекул ДНК не окремі нуклеотиди, а чергування їх блоків, до складу яких входять 5-6 мононуклеотидних ланок. Так, панкреатична рибонуклеаза, або РНК-аза I, розщеплює РНК за місцем локалізації залишків піримідинових нуклеотидів і належить до 5'-нуклеаз, а РНК-аза T₁ секвенує РНК відповідно по місцю локалізації пуринових нуклеотидів. Цим методом було вивчено первинну структуру рибосомних 5S і 16S рРНК, різних тРНК, РНК E. coli, бактеріофагів R-17, MS₂ та ін.

Для вивчення первинної структури ДНК рестрикційний аналіз тривалий час не застосовували, оскільки не було виявлено специфічних ДНК-рестриктаз. Це стало можливим лише після вдосконалення методів гель-електрофорезу, що дало змогу розділяти фрагменти ДНК, первинна структура яких різнилася кількома нуклеотидами.

Для з'ясування первинної структури ДНК застосовують також високочутливі фізико-хімічні методи – радіоавтографію (радіоізотопний метод), а також секвеначію за участю специфічних хімічних реагентів, які забезпечують розрив міжнуклеотидних зв'язків по місцю локалізації одного з чотирьох мононуклеотидів пуринового чи піримідинового ряду. Одержані зразки розділяють методом електрофорезу в поліакриламідному гелі і визначають первинну структуру отриманих коротких фрагментів ДНК. Чергування мононуклеотидів у всій молекулі ДНК можна визначати за перекриттям послідовностей нуклеотидів, одержаних при використанні рестриктаз, для яких характерна різна субстратна специфічність.

Значних успіхів у з'ясуванні структури ДНК було досягнуто у другій половині ХХ ст. Так, у 1975 р. У. Гілберт запропонував метод вивчення первинної структури ДНК на основі РНК-ових копій, отриманих за допомогою ферментів ДНК-залежних-РНК-полімераз, з наступним розшифруванням їх первинної структури. Застосування цього методу дало змогу вивчити первинну структуру молекул ДНК, виділених з різних видів організмів.

У наш час, для вивчення первинної структури ДНК, застосовують автоматичні секвенатори, принцип дії яких ґрунтується на хімічних реакціях фрагментів ДНК, або ДНК-копій, отриманих ферментативними методами. Найчастіше для вивчення первинної структури нуклеїнових кислот застосовують ензиматичні та хімічні методи.

Ензиматичний метод було розроблено Ф. Сенгером і А. Коулсоном (1975 р.). Суть його в тому, що аналізований фрагмент ДНК використовують як матрицю в реакції полімеризації за участю ферменту ДНК-полімерази *E. coli* (плюс-мінус метод (Рис. 8)):

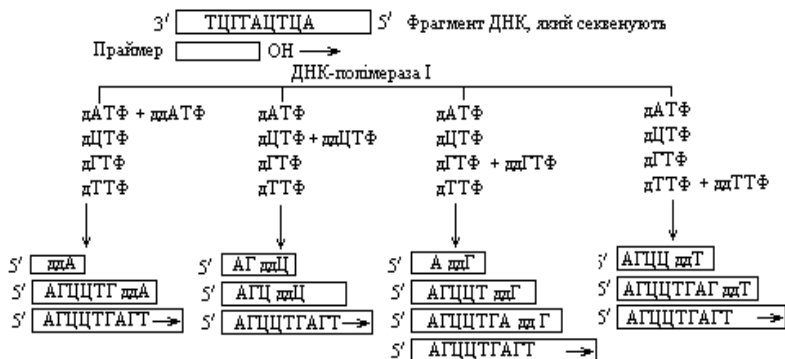


Рис. 8. Схема ензиматичного методу вивчення первинної структури ДНК.

Полімеризацію проводять або за відсутності одного з чотирьох нуклеотидів (мінус система), або при додаванні до кожного з варіантів копій ДНК лише одного з чотирьох нуклеотидів (плюс система), що обмежує нарощування полінуклеотидного ланцюга, або пригнічує синтез внаслідок дефіциту субстратів. Для секвенування використовують один з ланцюгів ДНК і короткий праймер – затравку, роль якої виконує олігодезоксинуклеозидфосфат. Новий ланцюг нарощується по 3'-ОН-групі праймера („ріст з хвоста”). Комплекс матриця/праймер інкубують у присутності 4 видів дезоксинуклеотидів і одного якогось певного дидезоксинуклеозидтрифосфату. Він виконує

роль термінатора, оскільки після включення до ланцюга, внаслідок відсутності вільної 3'-ОН-групи, елонгація припиняється, а термінація буде проходити на різних ділянках. У результаті цього утворюється набір фрагментів різної довжини починаючи з 5'-кінця праймера до місця приєднання термінатора.

Синтезовані фрагменти помічені радіоізотопами по одному чи кількох дезоксирибонуклеотидах праймера (ізотопи вводяться в α -фосфат дезоксинуклеотидтрифосфату).

Утворені фрагменти аналізують методом електрофорезу та ідентифікують радіоізотопним методом. Довжина виявленого за цих умов фрагменту, що містить радіоізотопну мітку, вказує на локалізацію комплементарного нуклеотиду на ділянці ДНК, первинну структуру якого вивчають. В такій конструкції будь-який вбудований фрагмент буде обмежений (фланкований) одними і тими ж послідовностями нуклеотидів фагової ДНК. Це дає змогу використовувати універсальний праймер, який можна синтезувати хімічним методом.

При комбінуванні клонування різних фрагментів та секвенування за участю дидезокситермінаторів можна вивчити первинну структуру ДНК різних видів організмів. Цим методом було створено універсальні вектори на основі геному бактеріофага M13, в який вбудовували досліджуваний фрагмент ДНК.

Хімічний метод. Метод хімічного секвенування нуклеїнових кислот було розроблено А. Максамом і У. Гілбертом (1976 р.). Він ґрунтується на хімічній модифікації пуринових та піримідинових основ, що входять до складу нуклеотидів, з наступним їх видаленням і аналізом утворених продуктів методом гель-електрофорезу. Суть цього методу в тому, що до залишку фосфату, локалізованого на 5'-кінці ланцюга ДНК, вводять радіоізотопну мітку. З цією метою використовують фермент полінуклеотидкіназу бактеріофага T-4 і γ^{32} -P(ATP). Після цього одноланцюгові фрагменти секвенують, а дволанцюгові піддають денатурації.

Утворений зразок розділяють на 4 частини і специфічно обробляють диметилсульфатом, який метилує пуринові основи (аденін – N³, гуанін – N⁷), або гідразин, для розщеплення і модифікації піримідинів. Для видалення модифікованих азотистих основ з одночасним розривом сусідніх фосфодиефірних зв'язків, зразки обробляють піперизином та гідролізують при різних значеннях рН. Тобто, для кожної з чотирьох проб отримують набір фрагментів ДНК, частина з яких несе радіоізотопну мітку.

Оскільки розщеплення полінуклеотидного ланцюга супроводжується вилученням модифікованих азотистих основ, то при

вимірюванні довжини фрагментів з точністю до одного нуклеотидного залишку можна визначити їх локалізацію. Вимірювання довжини фрагментів проводять шляхом порівняння їх довжини із стандартом.

Сукупність довжини фрагментів, у випадку модифікації чотирьох видів азотистих основ нуклеотидів (А, Т, Г, Ц) дає змогу отримати інформацію про їх локалізацію. Всі утворені фрагменти розділяють методом електрофорезу. Електрофореграми на яких фіксують лише помічені фрагменти, аналізують та визначають чергування нуклеотидів ензиматичним методом.

Визначення локалізації зонд-фрагментів на електрофореграмі залежить від способу введення радіоізотопної мітки. Якщо вона вводиться в 5'-кінець полінуклеотидного ланцюга, то при застосуванні радіоавтографії визначають лише 5'-кінцевий фрагмент.

Таким чином, при фракціонуванні за допомогою гелево-електрофорезу, на одному гелевому стовпчику, після специфічного видалення кожного з 4 нуклеотидів, можна розшифрувати первинну структуру досліджуваних фрагментів ДНК. Наприклад, якщо у пробі, де було проведено видалення цитозину, радіоізотопна мітка виявлена у фрагментах довжиною 3 і 6 нуклеотидів, то це означає, що в секвензованому фрагменті ДНК цитозин знаходився в 4 і 7 положенні. Якщо у пробі, де проводилося видалення гуаніну, було виявлено радіоактивні фрагменти довжиною 5 і 9 нуклеотидів, то це вказує, що в секвензованій ділянці він знаходився в 6 і 10 положеннях.

Хімічні та ензиматичні методи визначення первинної структури ДНК повністю автоматизовано.

Для вивчення первинної структури ДНК, що містить мільйони нуклеотидних пар, застосовують спеціально розроблені комп'ютерні програми, які ґрунтуються на специфічних особливостях нуклеотидного складу: наявності ЦГ, ГЦ, АГ-пар на 5' і 3'-кінцях, а також чергувань нуклеотидів на певних фрагментах, які використовують при визначенні сайтів дії рестриктаз. Інколи враховують також наявність паліндромних чергувань нуклеотидів, тощо.

В останні роки створено банки даних про первинну структуру ДНК різних видів організмів, будову багатьох генів та продуктів їх транскрипції.

ТЕМА: ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНИХ СТРУКТУР ВІРУСІВ І БАКТЕРІОФАГІВ

План

1. Загальне поняття про геном, його специфічні риси.
2. Особливості будови вірусних геномів.
3. Класифікація ДНК- та РНК-геномних вірусів.
4. Структурна організація геному окремих вірусів і бактеріофагів.

Основна література: [1, с. 171-193]; [2, с. 115-134]; [3, с. 85-91].

Додаткова література: [2]; [3]; [17].

1. Загальне поняття про геном, його специфічні риси

Термін „геном” було запропоновано Г. Вінклером (1920 р.) для означення всієї сукупності генів у гаплоїдному наборі хромосом, щоб розмежувати його з поняттям „генотип”, оскільки для гаплоїдних клітин і організмів вони, по суті, є синонімами.

За Г. Вінклером, *геном* – це вся спадкова генетична інформація організму, набір генів, зосереджених на гаплоїдному наборі хромосом.

Згодом, на основі досліджень з молекулярної біології та генетики, поняття „геном”, до певної міри, трансформувалося, як і поняття „ген”, оскільки організація генетичного матеріалу, набір генів та їх будова у представників різних таксономічних груп організмів має певні особливості. Суттєвих змін зазнало і поняття про ген, як дискретну одиницю спадковості. Зокрема, було встановлено, що:

- гени можуть бути локалізовані в структурі ДНК чи РНК (у РНК-геномних вірусів) і включають чергування нуклеотидів, в лінійній послідовності яких, закодована інформація про первинну структуру певних генних продуктів та видоспецифічних білків;

- гени в структурі хромосом, чи їх аналогів, розміщені лінійно: на одній хромосомі може бути локалізовано кілька генів;

- в клітинах еукаріот гени транскрибуються з утворенням високомолекулярних попередників, які зазнають специфічної посттранскрипційної модифікації;

- гени, що кодують іРНК, які виконують роль матриць при синтезі структурних білків чи білків-ферментів в еукаріот, мають мозаїчну будову: на їх структурі інтрони чергуються з екзонами;

- фрагменти генів, які кодують синтез ряду олігомерних білків, можуть бути розміщені на різних ділянках однієї хромосоми, або навіть на різних хромосомах;

- в структурі генів вищих і нижчих організмів виявлено, так звані, рухливі генетичні елементи, здатні в інтактній формі транслокуватись з однієї ділянки геному до іншої.

Тобто, структура геному та генів виявилася значно складнішою, ніж вважалося раніше. Зокрема, ген не завжди є дискретним, строго обмеженим та фіксованим на певних ділянках хромосоми.

Згідно з сучасними уявленнями, *ген* (від грец. *genos* - рід, походження) – *це фрагмент молекули ДНК або РНК, який несе інформацію про певну ознаку чи функцію.* Для збереження і відтворення генетичної інформації, закодованої в структурі генів, необхідна наявність специфічних регуляторних ділянок (промоуторів, генів-операторів, сайленсерів, енхансерів), які забезпечують ефективність та швидкість цих процесів. Регуляторні механізми суттєво різняться в клітинах про- і еукаріот, що зумовлене особливостями організації їх генетичних структур. Інколи поняття ген ототожнюють з поняттям цистрон та вживають їх як синоніми, хоч між ними є суттєва різниця.

Зокрема, *ген – це фрагмент ДНК, який кодує один білок, а цистрон, відповідно, ділянка ДНК, що кодує один поліпептидний ланцюг.* Тобто, білок, що складається з кількох поліпептидних ланцюгів, кодується кількома цистронами, а їх транскрипти мають поліцистронну будову. Поліцистронна будова характерна для транскриптів прокариот.

У вищих організмів основу геному складає комплекс ДНК з білками гістонового і негістонового типу, в структурі якого міститься не лише набір генів у сучасному розумінні цього слова. Ця генетична структура включає як інформативні, так і неінформативні ділянки, відношення між якими складає 1:9. Наявність неінформативних ділянок зумовлює „надлишковість” геному цих організмів, суть якої в тому, що фізична довжина геномної ДНК значно перевищує розміри генів, які необхідні для кодування видоспецифічних білків організму. Крім того, ядерна ДНК еукаріот містить велику кількість різних повторів нуклеотидів, мікро- та мінісателітів, диспергованих елементів, ендеогенних „реліктових” ретровірусів та інших інтегрованих структур. Це стосується, зокрема, геному людини, в якому загальна довжина неінформативних ділянок більше ніж на порядок перевищує довжину інформативних, які кодують первинну структуру відповідних генних продуктів. Феномен „надлишковості” геному особливо чітких проявів набув після завершення програми „Геном людини” (секвенування генів та їх картування). Виявилось, що в гаплоїдному наборі хромосом людини міститься 25-30 тис. генів, що кодують білки, кожен з яких

включає в середньому 100-120 тис. нуклеотидних пар. Якщо врахувати загальну кількість нуклеотидних пар у геномі людини (3,2 млрд.), то це складає близько 2% його структури. Для ДНК бактеріальних клітин також може бути характерна певна надлишковість, однак вона зумовлена наявністю неінформативних ділянок розміщених між генами – спейсерів, а також регуляторних ділянок на структурі оперонів.

Певні структурно-функціональні особливості характерні і для геному представників інших таксономічних груп організмів, а також вірусів та бактеріофагів. Так, геном прокаріотичних клітин і особливо вірусів організований компактніше, має менші розміри, а відношення інформативних ділянок до неінформативних складає 9:1. Молекули ДНК чи РНК, які є основою їх геному, можуть мати не лише лінійну, але і кільцеву форму. У вірусів геном зосереджений як на ДНК, так і на РНК. Клітини вищих організмів містять, як правило, два види нуклеїнових кислот: ДНК і РНК, які виконують специфічні функції збереження, передачі та реалізації генетичної інформації.

У переважної більшості нижчих і вищих організмів генетична інформація зосереджена не лише в структурі ДНК хромосом ядерного апарату чи ядерної зони цитоплазми, але і в позахромосомних генетичних структурах. Так, у бактерій позахромосомні генетичні структури представлені плазмідами та деякими помірними вірусами (бактеріофагами), а у клітинах еукаріот, відповідно, цитоплазматичною ДНК, зосередженою в мітохондріях та пластидах (у рослин). Суттєвим є те, що у вищих організмів об'єм генетичної інформації в клітинах зародкової лінії (попередниках статевих клітин та гаметах) і в соматичних клітинах значно різниться. Так, у клітинах зародкової лінії людини міститься 23 хромосоми, а в соматичних клітинах – 46. В онтогенезі соматичні клітини можуть втрачати частину генетичної інформації, зосередженої у клітинах зародкової лінії, внаслідок перебудови структури генів та зміни їх локалізації. Отже, у зв'язку з особливостями організації генетичних структур у представників різних таксономічних груп, сформулювати однозначне, загальне визначення геному практично неможливо. Тобто, при визначенні цього поняття слід враховувати цілий ряд особливостей, зумовлених будовою та розмірами геномів, їх структурною організацією, а також рівнем еволюційного розвитку організмів.

Враховуючи велику кількість алельних варіантів генів та чисельні повтори нуклеотидів, які присутні в генофонді більшості популяцій, мова може йти лише про певну генетичну структуру, яка включає не лише гени, а й інші складові компоненти, локалізовані в

хромосомах, або в їх аналогах. Це, в першу чергу, некодуючі послідовності, регуляторні ділянки, різні повтори нуклеотидів.

Згідно з сучасними уявленнями, *геном* – це сукупність генів, зосереджених в гаплоїдному наборі хромосом та позахромосомних ДНК-вмісних структурах певної таксономічної групи живих організмів, а також у складі носіїв генетичної інформації (ДНК чи РНК) доклітинних форм органічного світу (вірусів та бактеріофагів).

У вищих організмів після запліднення проходить об'єднання двох геномів (батьківського і материнського) в диплоїдній зиготі, з якої розвивається зародок і формується новий організм з власним набором генів. Набір генів у диплоїдному наборі хромосом соматичних клітин організму складає його *генотип*.

Генотип реалізується в фенотипі – сукупності ознак і властивостей, характерних для кожного окремого організму. *Тобто, організми успадковують не гени, а фенотипові ознаки, які є наслідком складної взаємодії різних генів.* Ці ознаки можуть бути моногенні і полігенні. Перші мають назву *фенів*. Складні (полігенні) ознаки визначаються поєднанням двох і більше фенів.

Фенотипові ознаки поділяють на якісні та кількісні. Закономірності успадкування кількісних ознак було встановлено шведським вченим З. Нельсон-Еле.

Геном, як специфічна індивідуальна генетична структура, виконує ряд специфічних функцій:

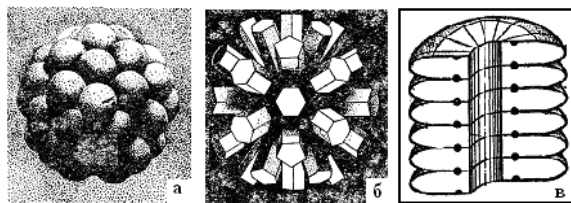
- визначає певні фенотипові ознаки та особливості обміну речовин в організмі;
- забезпечує збереження генетичної інформації і передачу її від покоління до покоління;
- створює можливість для еволюції організмів, внаслідок мутацій, генетичної рекомбінації та наявності рухливих генетичних елементів.

Реалізація цих функцій геному забезпечується внаслідок здатності генетичних структур до самооновлення, самовідтворення та корегування можливих порушень. В перебігу цих процесів задіяні складні молекулярні механізми, які регулюють експресію генів, внаслідок зміни інтенсивності перебігу реплікації, транскрипції, трансляції. При з'ясуванні молекулярних механізмів структурної організації геномів та їх визначенні слід враховувати специфічні особливості їх будови у вірусів і бактеріофагів, а також у про- та еукаріот.

2. Особливості будови вірусних геномів

Віруси було відкрито Д. Івановським (1892 р.). Враховуючи їх розміри (10-300 нм), які в десятки разів менші бактеріальних клітин, спочатку вважали, що віруси це найдрібніші живі організми. Пізніше було висловлено гіпотезу, що віруси являють собою генетичний матеріал, гени, фрагменти ДНК, які вийшли з-під контролю регуляторних систем організму і набули здатності до самостійної реплікації з використанням реплікативного апарату клітини-рецепієнта, в яких проходить їх життєвий цикл.

Вірусні часточки містять одну чи декілька молекул одного з видів нуклеїнових кислот (ДНК або РНК), які оточені білковою оболонкою – капсидом (від лат. *capsa* - футляр). Як правило, нуклеїнові кислоти, в яких зосереджений геном вірусів, локалізовані в центрі вірусних часточок, а білкові молекули утворюють специфічні структури, для яких характерна гексагональна, кубічна чи гвинтова симетрія:



Вірусні нуклеїнові кислоти можуть бути організовані у вигляді одно-, дволанцюгових, кільцевих чи лінійних форм. У РНК-геномних вірусів молекули РНК, як правило, мають лінійну форму і значно менші розміри, ніж геномні ДНК. Молекулярна маса вірусних ДНК знаходиться в межах від 1×10^6 до 200×10^6 Да, а РНК-вмісних від 1×10^6 до 15×10^6 Да. Кількість нуклеотидів у складі ДНК- і РНК-геномних вірусів та бактеріофагів теж різна – від десятків до сотень тисяч. Так, до складу геному бактеріофага T_4 входять 160 тис. нуклеотидних пар. У РНК-геномних вірусів, РНК є переважно одноланцюговими, кількість нуклеотидів значно менша: від 6 тис. у вірусу поліомієліту до 11 300 у вірусів, що вражають картоплю. Вірусні часточки містять також специфічні ферменти, які кодують їх власні генні продукти. Це, зокрема, реплікази, РНК-полімерази, ревертази та інші.

В деяких складно організованих вірусів, геном може включати не одну, а декілька молекул ДНК чи РНК. Послідовності нуклеотидів в структурі геномної ДНК вірусів кодують специфічні білки, необхідні

для забезпечення окремих етапів відтворення вірусних часточок в інфікованих клітинах-рецепієнтах. У геномі вірусів можуть бути закодовані як структурні, так і окремі регуляторні білки, необхідні на певних фазах існування вірусних часточок. У зв'язку з цим, у геномі цих вірусів розрізняють гени, які кодують *ранні білки-ферменти*, що забезпечують реплікацію вірусної ДНК та пригнічують реплікацію ДНК клітини-рецепієнта. Інші гени кодують *пізні білки-ферменти*, необхідні для синтезу білків капсиду та формування вірусних часточок. У деяких бактеріофагів можуть бути наявні гени, що кодують *надранні білки-ферменти*, які забезпечують транскрипцію фагових ДНК після інфікування клітин рецепієнтів.

Особливістю геному більшості вірусів є те, що він надзвичайно компактний: містить невелику кількість генів, які необхідні для самовідтворення вірусів в інфікованій клітині. Решту функцій у вірусних часточках виконують генні продукти, що синтезуються в генетичному апараті інфікованої клітини. Так, геном бактеріофага T4 містить 150 генів, а вірусу віспи (ДНК-геномний) має 250 генів. Геноми дрібніших ДНК-геномних вірусів, зокрема, вірусу приматів SV-40 і бактеріофага φX-174 несуть значно менше генетичної інформації і, в більшій мірі, залежать від ферментних систем клітин рецепієнтів. Геном бактеріофага Q_β (РНК-геномний) містить лише 4 гени, а бактеріофага MS 2 включає 3 гени, які розташовані тандемно і розділені спейсерами. Для цих вірусів важливою є наявність генів, що кодують ферменти синтезу геномних нуклеїнових кислот, оскільки регуляторні механізми клітин-рецепієнтів можуть гальмувати їх реплікацію. Вміст нуклеїнових кислот у геномі різних вірусів, зазвичай, варіює в широких межах, так, вірус грипу містить лише 1% РНК, а вірус поліомієліту – 24%. Одночасно з цим, у деяких бактеріофагів вміст нуклеїнових кислот сягає 50%. У геномах вірусів гени локалізовані в одній молекулі РНК чи ДНК або в декількох сегментах молекул. Тобто, для них характерний *сегментований геном*, який не зустрічається в представників інших таксономічних груп. Молекули РНК можуть бути одно- чи дволанцюгові, лінійні або кільцеві. Зокрема, в Реовірусу геном – це дволанцюгова РНК, яка включає 10 сегментів. У ретровірусів геном являє собою одностанцюгову РНК (несегментовану), а геном вірусу грипу зосереджений в кількох фрагментах полінуклеотидних ланцюгів. У РНК-геномних вірусів геном представлений переважно лінійними молекулами, а в ДНК-геномних зустрічаються як лінійні, так і кільцеві форми. Набір генів в структурі геномної ДНК вірусів може бути різний.

3. Класифікація ДНК- та РНК-геномних вірусів

Головними критеріями класифікації вірусів є:

- вид нуклеїнових кислот, що є носієм генетичної інформації (ДНК, РНК);
- структура капсомерів (кубічна, спіральна, змішана);
- наявність чи відсутність ліпопротеїнової оболонки;
- особливості клітин-реципієнтів;
- механізм реплікації.

Найпоширенішою є класифікація вірусів за видом нуклеїнових кислот, будовою геному та схемою реплікації. За цими критеріями виділяють кілька груп вірусів:

I група – Дволанцюгові ДНК-геномні віруси (бактеріальний фаг Т4, вірус герпесу людини, вірус приматів SV-40, вірус віспи). Схема реплікації ДНК→ ДНК.

II група – Одноланцюгові ДНК-геномні віруси (парвовірус B19). Схема реплікації ДНК→ ДНК.

III група – Дволанцюгові РНК-геномні віруси (ротавірус діареї людини, вірус бобової гнилі). Схема реплікації РНК→ РНК.

IV група – Позитивно спрямовані одноланцюгові (+) РНК-геномні віруси (коронавірус пневмонії, вірус SARS, вірус еболи, вірус гепатиту А і С, поліомієліту, енцефаліту). Схема реплікації ДНК→ РНК.

V група – Негативно спрямовані одноланцюгові (-) РНК-геномні віруси (вірус сказу, кору, гепатиту D). Схема реплікації РНК→ РНК.

VI група – Одноланцюгові РНК-геномні ретровіруси (вірус імунодефіциту людини, бактеріофаг λ та φX-174). Схема реплікації РНК→ ДНК.

VII група – Дволанцюгові ДНК-геномні ретровіруси (вірус гепатиту В, вірус мозаїки цвітної капусти). Схема реплікації ДНК→ РНК→ ДНК.

За механізмом реплікації виділяють кілька груп ДНК-вмісних вірусів:

- віруси, що містять дволанцюгову ДНК, яка реплікується за схемою: ДНК → РНК → ДНК. Це характерне для ретроїдних вірусів, зокрема, вірусу гепатиту В, мозаїки цвітної капусти;
- віруси, що містять дволанцюгову ДНК, яка реплікується за схемою: ДНК → ДНК. До цієї групи належать віруси герпесу, віспи, SV 40 та вірус поліомієліту;
- віруси, що містять одноланцюгові ДНК негативної чи позитивної полярності, які реплікуються за схемою: ДНК → ДНК.

Різноманітність форм генетичних структур у вірусів дала підстави для висловлення припущення, що природа на них відпрацювала всі можливі варіанти збереження генетичного матеріалу, доки не було відібрано дволанцюгову ДНК, що стало, свого роду, кульмінацією в його еволюції.

4. Структурна організація геному окремих вірусів і бактеріофагів

Особливості структурної організації геному окремих вірусів та бактеріофагів можна розглянути на прикладі ретровірусів та бактеріофагів λ і ϕ X-174. Вони часто відрізняються окремими морфологічними ознаками та структурою геномів, хоч мають і деякі спільні риси.

- **Ретровіруси.** Одноланцюгова вірусна РНК ретровірусів включає до 10 тис. нуклеотидів і являє собою позитивний ланцюг, кепований на 5'-кінці та поліаденілований на 3'-кінці. В поліаденіловій послідовності нуклеотидів міститься прямий кінцевий повтор, що включає кілька десятків нуклеотидів. Геномна вірусна РНК містить інформацію про синтез кількох груп вірусних білків, таких як: структурні білки сердцевини віріону, ферменту ревертази, інтеграційні білки і білки оболонки віріону. Геном деяких ретровірусів включає дві молекули геномної РНК. Характерною особливістю ретровірусів є також те, що вони можуть викликати злоякісні пухлини у птахів і ссавців, а також імунodefіцитні стани у людей. Ретровіруси можуть вражати макрофаги і один із видів Т-лімфоцитів та блокувати функціонування імунної системи. Деякі лімфотропні ретровіруси, що також пошкоджують Т-лімфоцити, можуть викликати лейкози. Переважна більшість ретровірусів мають сферичну форму, діаметром 100 000 нм (Рис. 9).

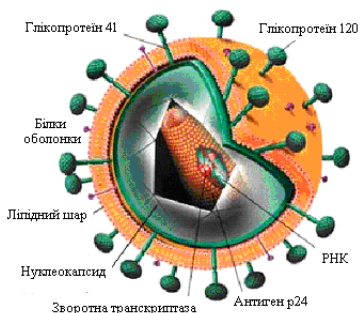
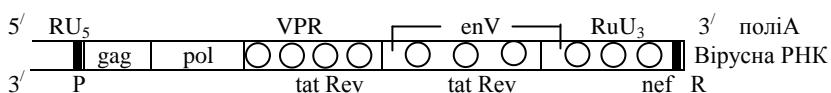


Рис. 9. Схематична будова ретровірусу імунodefіциту.

Оболонка вірусу містить подвійний шар ліпідів з включеннями глікопротеїнів. Молекули глікопротеїнів складаються з двох субодиниць: одна з них інтегрована в мембрану, а інша локалізована на її поверхні. Серцевина вірусу включає білки p17 і p24, вірусну РНК та фермент ревертазу. Геном вірусу представлений двома ідентичними одноланцюговими РНК позитивної полярності (+РНК), які нековалентно з'єднані між собою поблизу 5'-кінців. До складу геному входить 9 генів: **gag**, **pol**, **env**, **vpr**, **vif**, **vpru**, **tat**, **rev**, **nef**, продукти транскрипції яких, внаслідок процесінгу, утворюють 14 іРНК, що кодують специфічні білки з різними функціями, серед яких 8 білків віріону, 3 допоміжні і 3 регуляторні:



Ген gag продукує 4 білки: матричний – MA (p17), білок капсиду – CA (p24), білок нуклеокапсиду – NC (p9) та специфічну протеазу – PR (p11). Ці білки забезпечують формування вірусної часточки, її дозрівання та зв'язування з мембраною. Наступна кодуєча ділянка геному – *ген pol*, необхідний для синтезу ферменту зворотної транскриптази – RT. Цей фермент у вигляді матриці може використовувати ДНК або РНК і володіє ендонуклеазною активністю, руйнує ланцюг РНК в гібридній РНК/ДНК-молекулі. Крім того, ген кодує інтегразу – IN (p32) – фермент, необхідний для включення ДНК вірусу в геном інфікованої клітини. *Ген env* кодує білки вірусної оболонки – SU (gp120), що зв'язують CD-4 рецептори, та білок TM (gp41) – трансмембранний глікопротеїн оболонки вірусу, який визначає патогенність вірусу. У геномі вірусу присутні також гени, які кодують допоміжні (Vpr, Vif, Vpru) і регуляторні (Tat, Rev, Nef) білки. За участю білків Tat і Rev забезпечується регуляція синтезу вірусних білків при переході провірусу з латентної в патогенну форму.

Бактеріофаг λ. Фагова ДНК зосереджена в капсиді, який має гексагональну форму та формується за участю капсидних білків. До капсиду прилягає ділянка фагу, яка має назву хвостового відростка (Рис. 10). Гени геному бактеріофага λ поділяють на *надранні*, *помірно ранні та пізні*. Два гени, які кодують надранні білки, локалізовані на різних кінцях ДНК і зчитуються у протилежних напрямках. Ці гени кодують білки, що блокують функціонування термінаторів (явище антiterмінації). Помірно ранні гени продукують Q-білки, які забезпечують здатність фагу до лізогенії та перехід від лізогенного до літичного шляху розвитку. Геном бактеріофага λ протягом життєвого

циклу у клітині реципієнта може набувати різної форми, зокрема, у складі фагової часточки геномної ДНК має лінійну форму. На 5'-кінцях кожного з двох ланцюгів локалізовані одноланцюгові фрагменти, до складу яких входить по 12 нуклеотидів. Це, так звані, „липкі кінці” взаємно комплементарні один до одного, за участю яких геном бактеріофага λ , після проникнення у клітину, „зшивається” за участю бактеріальної ДНК-лігази та утворює замкнене кільце. Ділянки „зшивання” „липких кінців” мають назву *cos-сайтів*.

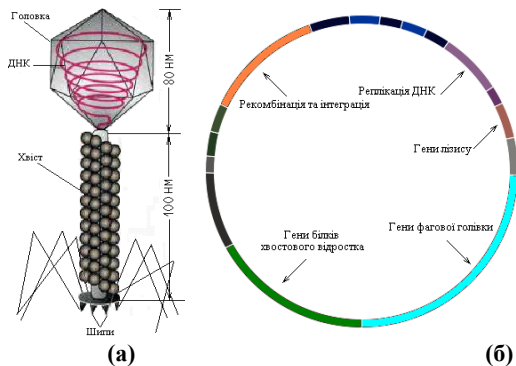
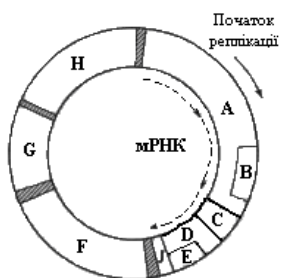


Рис. 10. Будова бактеріофага λ (а) та його геному (б).

Утворення кільцевої форми бактеріофага λ є необхідною умовою реплікації фагової ДНК. Кільцева ДНК бактеріофага інтегрується в геном клітини-реципієнта і набуває лінійної форми. Інтегрована лінійна ДНК профагу пермутована по первинній структурі, порівняно з ДНК, що міститься в фаговій часточці, оскільки сайти інтеграції знаходяться на значній відстані від ділянок „зшивання” „липких кінців”. На основі геному бактеріофага λ сконструйовано велику кількість молекулярних векторів, які використовують в генно-інженерних дослідженнях.

Бактеріофаг ϕ X-174. Геном бактеріофага містить кільцеву одноланцюгову молекулу ДНК, до складу якої входить 5386 нуклеотидів. Порядок чергування нуклеотидів в структурі ДНК бактеріофага було з'ясовано Ф. Сенгером (1977 р.), за що вчений отримав Нобелівську премію. В структурі геному зосереджено 9 генів, які кодують фагові білки, необхідні для забезпечення життєвого циклу бактеріофага та перебігу процесу реплікації. Кількість білків, які функціонують в фагових часточках, значно більша, ніж може бути закодовано в структурі геномної ДНК бактеріофага. У зв'язку з цим, було висловлено припущення, що, очевидно, одна і та ж ділянка геному може кодувати кілька білків. Тобто, було відкрито *явище*

перекривання генів („гени в генах”). Виявилось, що на одній і тій же ділянці геному бактеріофага фХ-174 локалізовано по два гени. Так ген В знаходиться всередині гену А, а ген Е відповідно всередині гена D.



У деяких генах бактеріофага фХ-174 ініціюючий кодон одного гену перекриває термінуючий кодон іншого внаслідок „зсуву рамки зчитування”. Така будова геному бактеріофага фХ-174 компенсує нестачу нуклеотидів на структурі геномної ДНК та забезпечує її економне використання. Гени, що перекриваються, пізніше було також виявлено в геномі бактеріофага λ , а також деяких пухлинних вірусів та у клітинах еукаріот. Однак, „гени в генах” переважно зустрічаються лише в геномах дрібних вірусів, щоб нівелювати обмежену інформативну здатність їх геномів.

Геном ДНК-вмісних вірусів може бути представлений:

- лінійними дволанцюговими ДНК (вірус Епштейна-Бар, вірус віспи та деяких іридовірусів);
- дволанцюговими кільцевими ДНК (вірус SV 40 та поліоми);
- кільцевими одноланцюговими ДНК (бактеріофаг М 13, фХ-174);
- лінійними одноланцюговими ДНК (парвовіруси).

Спочатку було вивчено будову лінійних дволанцюгових геномів вірусів, розміром 30-150 Кб. Лінійні ДНК деяких вірусів містять інвертовані кінцеві повтори нуклеотидів (бактеріофаг ф29, аденовіруси) або липкі кінці, довжиною 10-20 нуклеотидів (бактеріофаг λ).

Для геномів ДНК-вмісних вірусів характерним є те, що:

- нуклеотиди геномної ДНК вірусів можуть містити модифіковані азотисті основи (5-оксиметилцитозин) та мінорну пентозу (гентобіозу). Кільцеві геномні ДНК вірусів часто мають вигляд суперспіралі або зчеплених кілець (катенанів);
- переважна більшість ДНК-геномних вірусів інтегрується в геном клітини реципієнта. Деякі бактеріофаги, після такої інтеграції залишаються в неактивному стані (явище лізогенії), яке характерне для бактеріофага λ . При розмноженні таких бактеріофагів у клітині проходить її лізис (літична інфекція);
- лінійні молекули фагових ДНК після утворення кільцевих форм також можуть включатися в кільцеві хромосоми *E. coli*, внаслідок чого формується лізогенна бактерія, яка несе хромосому

бактеріофагу в вигляді провірусу. Така фагова ДНК реплікується разом з хромосоною *E. coli*. При звільненні фагової ДНК з геному *E. coli* під впливом певних чинників (ультрафіолетового чи іонізуючого випромінювання) може індукуватися літичний шлях розвитку фагу.

Геном вірусів має такі специфічні структурно-функціональні особливості:

- геном вірусів зосереджений в одному з видів нуклеїнових кислот: ДНК чи РНК;

- при невеликих розмірах, вірусні геноми несуть інформацію про значну кількість різних білків, тобто існує невідповідність між об'ємом інформації та обмеженими розмірами геномів. Така невідповідність нівелюється особливістю зчитування генетичної інформації внаслідок „зсуву рамки зчитування”: одна і та ж ділянка вірусного геному може містити різну інформацію, а також локалізацією генів всередині інших генів. Крім того, один і той же ген може зчитуватися з різних точок огі і, відповідно, кодувати різні іРНК, які виконують роль матриць для синтезу специфічних білків.

- На структурі геному практично відсутні некодуючі послідовності нуклеотидів;

- РНК-геноми можуть бути сегментовані і несегментовані;

- геномні РНК чи ДНК вірусів можуть мати лінійну або кільцеву форму;

- для геному вірусів характерне явище перекривання генів (гени в генах);

- у РНК-геномних вірусів молекули РНК процесовані і можуть бути як носіями генетичної інформації, так і матрицями для синтезу вірусних білків;

- для деяких ДНК- та РНК-геномних вірусів еукаріотичних клітин (саркоми Рауса, SV 40) характерна мозаїчна інтрон-екзонна структура генів;

- генетична інформація ДНК-геномних вірусів може бути закодована в обох ланцюгах ДНК. В цьому випадку, ланцюги транскрибуються у протилежних напрямках;

- геном бактеріофагів інколи має оперонну організацію. Гени в опероні згруповані в тандемні блоки і мають спільні механізми регуляції;

- для регуляції функцій геному бактеріофагів характерне явище антитермінації;

- у зв'язку з невеликими розмірами геномів для деяких вірусів і бактеріофагів характерна транскрипція із зсувом рамки зчитування.

ТЕМА: СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМУ ПРОКАРІОТ

План

1. Особливості структурної організації геному прокаріот.
2. Цитоплазматичні генетичні структури геному прокаріот (плазміді та епісоми).
3. Мобільні генетичні елементи геному прокаріот (IS-елементи і транспозони).
4. Механізми транспозиції мобільних генетичних елементів (самостійне вивчення).
5. Картування генів геномів прокаріот (самостійне вивчення).

Основна література: [1, с. 194-217]; [2, с. 135-149]; [3, с. 95-102].

Додаткова література: [2]; [3]; [18]; [21].

1. Особливості структурної організації геному прокаріот

Прокаріоти (від давньогрецького *pro* – перед, *каryon* - ядро + суфікс *-otes*: *procaryotes*) – це нижчі організми, клітини яких мають відносно просту будову. В них відсутнє відмежоване від цитоплазми ядро та інші внутрішньоклітинні мембранні структури, характерні для еукаріотичних клітин, крім рибосом, які мають константу седиментації 70S. Генетичний матеріал клітин прокаріот зосереджений на структурі ДНК – нуклеоїді (аналогу ядра еукаріотичних клітин), локалізованому в ядерній зоні. Крім ДНК нуклеоїду, у клітинах бактерій може бути присутня також цитоплазматична ДНК, що входить до складу плазмід – невеликих за розміром, кільцевих або лінійних дволанцюгових молекул, які реплікуються незалежно від хромосомної ДНК і забезпечують цитоплазматичну спадковість. Будь-які органели, крім рибосом, в клітинах прокаріот відсутні (Рис. 11). Найтипівішими представниками прокаріотичних організмів є бактерії.

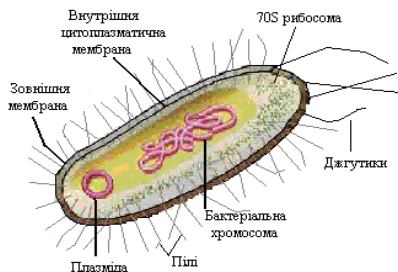


Рис. 11. Будова бактеріальної клітини.

Геном бактерій являє собою сукупність генів, зосереджених в нуклеоїді та цитоплазматичних ДНК-вмісних структурах.

Порівняно проста будова геному бактерій зумовлена особливостями їх життєвого циклу, який, у значній мірі, залежить від функціонування геному клітини-хазяїна. Геномна ДНК клітин бактерій може мати лінійну або кільцеву форму. Крім того, в деяких бактерій, які мають складніше організований геном, у клітині присутні одночасно лінійні і кільцеві форми ДНК, а також лінійні та кільцеві плазміди.

Особливістю геному бактерій є те, що їх геномна ДНК не асоційована з білками і не має нукleosомного рівня організації. Компактизація бактеріальної ДНК відбувається внаслідок спіралізації полінуклеотидного ланцюга та утворення петлеподібних структур, кількість яких може складати до 80 на одну молекулу. В центрі нуклеоїду петлі з'єднуються за допомогою специфічних серцевидних структур. Бактеріальні геноми можуть бути різні за розміром, який виражають кількістю нуклеотидних пар чи нуклеотидів, або кіло- чи мегабазами (від англ. *base* – основа).

1Кб = 1 000 нуклеотидів або їх пар, а 1Мб відповідно 1 млн.

У бактерії *E. coli* в геномі налічується $3,2 \times 10^6$ н.п. (3,2 Мб). Молекулярна маса дволанцюгової кільцевої молекули ДНК бактерії *E. coli* $2,5 \times 10^9$ Да. У клітині бактерії геномна ДНК має форму палички, діаметром 1×10^{-3} нм. довжиною 2×10^{-3} нм. Геномна ДНК *Mycoplasma genitalium*, однієї з найдрібніших прокаріотичних клітин, містить 580 000 н.п. або 580 Кб. У деяких бактерій кількість нуклеотидних пар у складі геному може сягати 6-9 млн. Це характерне для грампозитивних бактерій роду *Streptomyces*. Довжина неспіралізованої молекули ДНК, що входить до складу геному таких бактерій, складає $2,5-3,0 \times 10^{-3}$ нм.

Важливою особливістю геномів прокаріот є їх висока інформативність: відношення інформативних ділянок до неінформативних складає 9:1. В структурі геному бактерії *Mycoplasma genitalium* (580 тис. н.п.) близько 90% складають кодуєчі чергування нуклеотидів, які входять до складу 479 генів, локалізованих на, так званих, відкритих рамках зчитування (ORF, від англ. open reading frame), де закодована інформація про первинну структуру генних продуктів. Із 479 генів цієї бактерії ідентифіковано 329 або 69%. У геномі бактерії *E. coli* до складу ORF входить 4288 генів, з яких ідентифіковано 2656 або 62%. Більше 88% геному бактерії *E. coli* складають кодуєчі послідовності нуклеотидів.

Набір генів, які входять до складу геномів бактеріальних клітин, контролюють всі процеси їх життєдіяльності: самовідтворення структури, енергообмін, транспорт метаболітів та йонів, перебіг процесів транскрипції і трансляції. Існує поняття про, так званий, *консервативний або мінімальний набір генів* прокаріотичних клітин, необхідних для забезпечення цих процесів. Він включає близько 256 генів, серед яких більшу частину складають гени, необхідні для трансляції і транскрипції (відповідно 94 і 35), енергообміну (28), транспорту метаболітів (40), метаболічних перетворень різних сполук (6-8), секреції та адгезії (5), виконання структурних функцій (7 генів). Інші процеси життєдіяльності контролює менша кількість генів.

Одночасно з цим, деякі бактерії у складі геному містять значно більшу кількість генів. Так, в структурі ДНК збудника кліщового спірохітозу, або хвороби Лайма (*Borrelia burgdorferii*), локалізовано 863 гени, 499 з яких ідентифіковано. Крім генів, що кодують білки, в складі бактеріальних геномів виявлено гени чотирьох видів рРНК, кількох десятків тРНК. Серед генів розрізняють *регуляторні, структурні, конститутивні*. Перші забезпечують регуляторні функції, а інші – синтез відповідних матричних (інформаційних) РНК, у процесі трансляції яких синтезуються специфічні білки-ферменти. Функції частини генів бактеріальних геномів не з'ясовано. В середньому, в різних бактеріальних геномах ідентифіковано від 40 до 70% генів. До 2001 року було розшифровано структуру близько 100 бактеріальних геномів.

Особливістю геному прокаріот є його оперонна організація. Тобто, генетична інформація у клітинах прокаріот зосереджена на структурно-функціональних ділянках геному, які мають назву *оперонів*. *Оперон являє собою групу функціонально пов'язаних, скоординовано експресованих генів, об'єднаних у структурно-функціональні одиниці та фланковані з обох боків специфічними регуляторними ділянками.*

Тобто, під **опероном прокаріот** слід розуміти ділянку ДНК, обмежану промоутором і термінатором, що містить цистрони, на структурі яких закодовано білки-ферменти одного метаболічного циклу, і регулюються геном-регулятором. Оперон являє собою транскрипційну одиницю, тому його інколи називають *транскриптоном або одиницею транскрипції*.

Транскриптон – це генетична структура прокаріотичних клітин, що контролює прояви фенотипових ознак і містить чергування нуклеотидів, які визначають первинну структуру певних генних продуктів. У клітинах прокаріот функціонують оперони, що кодують

tРНК, рРНК, а також змішані оперони, які містять гени tРНК та іРНК. Оперони прокаріотичних клітин є *поліцистронними* і кодуєть не один, а кілька генних продуктів: включають кілька кодуєчих ділянок. Оперон прокаріот включає: промоутор, ген-оператор, цистрони (кодуєчі послідовності нуклеотидів) та термінатор, які знаходяться під регуляторним контролем гена-регулятора. На гені-регуляторі транскрибуються іРНК специфічних регуляторних білків, що контролюють функціонування гена-оператора. Ген-регулятор локалізований на 5'-кінці ДНК та відокремлений від оперону 5'-нетранслюючою послідовністю нуклеотидів (5'-НП). На 3'-кінці оперону міститься термінуюча ділянка, необхідна для завершення транскрипції. Ця ділянка транскрибується, але не транслюється. Завершує оперон 3'-нетранслююча послідовність нуклеотидів. Таким чином, оперон з двох боків фланкований 5'- і 3'-нетранслюючими послідовностями нуклеотидів (Рис. 12).



Рис. 12. Будова оперону прокаріот

ГР – ген-регулятор, 5'-НП – 5'-нетранслюєчі послідовності, П – промоутор, ГО – ген-оператор, КП – кодуєчі послідовності, Т – термінатор, 3'-НП – 3'-нетранслюєчі послідовності

Важливою ділянкою оперону прокаріот є *промоутор*, необхідний для ініціації транскрипції генів. На структурі промоутора знаходяться дві консенсусні послідовності нуклеотидів: мінус 35 (-35) та мінус 10 (-10) послідовності, а також стартовий кодон (+1).

Перша, (-35) послідовність, розташована на відстані 35 н.п. від стартової точки транскрипції (+1) і забезпечує зв'язування ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази, який пізнає місце початку транскрипції. До складу (-35) послідовності входить 9 пар нуклеотидів. Друга (-10) послідовність, або *бокс Прибнова*, знаходиться на відстані 10 н.п. від точки старту транскрипції і містить 6-7 пар нуклеотидів (так званий ТАТА-мотив). Його функція – локальне розкручування хеліксу ДНК та створення умов для початку транскрипції – утворення відкритого промоуторного комплексу. Після промоуторної ділянки на структурі оперону розміщений ген-оператор, який контролює функціонування цистронів і регулюється білками-репресорами, синтез яких відбувається на гені-регуляторі. Ці білки можуть контролювати функціонування одного чи кількох оперонів. Залежно від того, в якому

стані синтезується білок-репресор, існують *індуцибельні і репресибельні оперони* прокаріот, що відрізняються механізмом регуляції їх функціональної активності.

Далі, в опероні прокаріот розміщені кодуючі послідовності нуклеотидів, або цистрони, які несуть інформацію про первинну структуру генних продуктів:



Цистрони в поліцистронних геномах бактерій, що кодуєть деякі види РНК, можуть бути розмежовані спейсерами.

Спейсери (від англ. *spaiser* – проміжок) – беззмстовні, некодуєть чергування нуклеотидів, які розділяють цистрони. Вони можуть зв'язувати регуляторні білки і забезпечувати спіралізацію молекул геномної ДНК. Завершує оперон прокаріот ділянка, яка необхідна для термінації транскрипції (*термінатор*). Ця ділянка містить чергування нуклеотидів, що є сигналами закінчення транскрипції генів оперону. Транскрипційні термінатори розміщені *поліндромні чергування нуклеотидів*, які на транскрибованій РНК зумовлюють формування специфічних структур (шпильок). Після цих структур в РНК-транскрипті розміщені 5-6 залишків уридилових нуклеотидів, комплементарних до аденілових нуклеотидів ДНК-матриці. Оскільки водневі зв'язки між АУ-парами значно слабші, порівняно із зв'язками в АТ-парах, вони легко руйнуються, що і зумовлює відокремлення іРНК від матриці та термінацію транскрипції.

Кілька оперонів в структурі геному прокаріот можуть утворювати модулі, які містять кластери генів, що кодуєть генні продукти із специфічними функціями. Зчеплені гени, або цистрони, які входять до складу цих оперонів, транскрибуються у вигляді полігенного або поліцистронного транскрипту. Оперони, що контролюють синтез генних продуктів, які забезпечують виконання у клітині споріднених функцій, мають однотипні регуляторні ділянки та подібним чином реагують на специфічні сигнали регуляції.

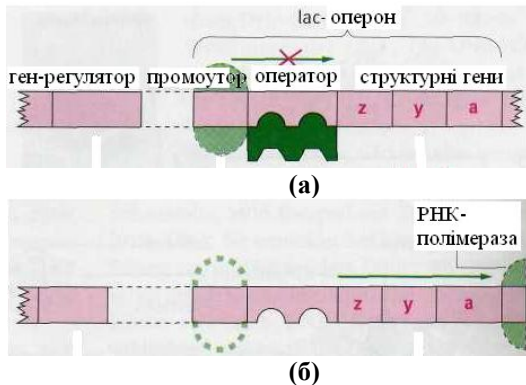
У деяких випадках гени, які контролюють синтез споріднених генних продуктів, можуть бути локалізовані не в одному, а в кількох оперонах. Зокрема, гени, що кодуєть білки рибосом, як правило, організовані у *множинні оперони*, до складу яких можуть входити

також гени, що кодують інші білки, які забезпечують перебіг окремих етапів транскрипції і трансляції.

Оперонна організація геному бактеріальних клітин забезпечує скоординовану експресію і узгоджену регуляцію генів та можливість їх транслокації (переміщення) в геномі внаслідок горизонтального перенесення між спорідненими і неспорідненими бактеріями, а також клітинами про- та еукаріот, що є важливим чинником еволюції. *Гени, що з'являються в геномі внаслідок горизонтального перенесення, мають назву ксенологів.*

Структуру геному прокаріот можна розглянути на прикладі бактерії *E. coli*. У геномі бактерії функціонує кілька оперонів: лактозний, арабінозний, триптофановий та інші, кожен з яких забезпечує синтез певних генних продуктів, необхідних для функціонування бактеріальних клітин.

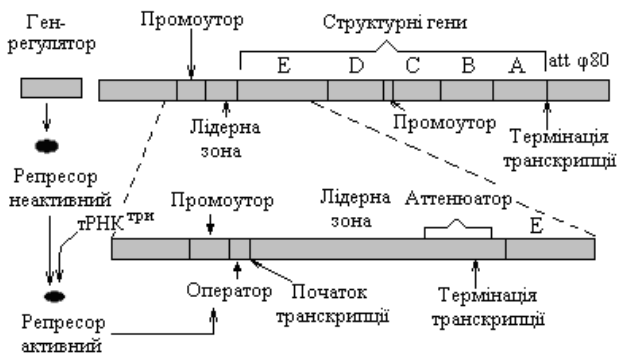
Лактозний оперон (лас-оперон) зосереджений на окремому фрагменті хромосоми та містить гени, під контролем яких знаходиться синтез іРНК трьох ферментів, необхідних для метаболізму лактози (молочного цукру): β -галактозидази, галактозидпермеази і тіогалактозидтрансацилази. Лас-оперон включає промоторну ділянку (84 н.п.), оператор (38 н.п.) та гени вказаних ферментів, які відповідно містять 3700 та по 900 н.п., тобто всього близько 5600 н.п.:



а- заблокований оперон; б-поновлений синтез іРНК.

Подібна структура характерна і для *арабінозного оперону* *E. coli*, гени А, В, D якого забезпечують синтез ферментів, необхідних для засвоєння арабінози. Ці гени утворюють три транскрипційні одиниці, одна з яких являє собою оперон араBAD. В регуляторній ділянці араBAD-оперону розміщені промоутор, ініціатор та ген-оператор.

Репресибельний *триптофановий оперон* містить 5 структурних генів (*trpA*, *trpB*, *trpC*, *trpD* і *trpE*), які розміщені лінійно і кодують іРНК трьох ферментів, необхідних для перетворення попередника триптофану (хоризмової кислоти) у амінокислоту триптофан. Перед структурними генами локалізована лідерна зона ДНК, яка включає 162 н.п. В межах лідерної зони розміщений атенуатор (специфічний регулятор інтенсивності транскрипції), який може пригнічувати функціонування оперону при наявності корепресора (амінокислоти триптофану), або посилювати – за умов наявності ініціатора:



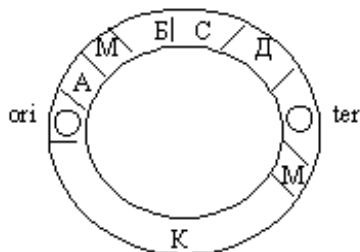
2. Цитоплазматичні генетичні структури геному прокаріот (плазміди та епісоми)

Геном бактерій, крім геномної ДНК, включає також цитоплазматичні ДНК-вмісні структури, здатні до автономної реплікації – плазміди. Плазміди містять власні гени, які є не обов'язковими для бактерій, а також гени, необхідні лише при існуванні їх за певних умов чи в певному середовищі. Геном багатьох плазмід містить гени, організовані у специфічні модулі: кон'югації, реплікації, стійкості до певних антибіотиків та інші. Типи плазмід різняться між собою за структурою та специфічними функціями, наявністю певних модулів, а також особливостями реплікації і транслокації – перенесення від клітин донора до клітин реципієнта.

Зокрема, поширеними є плазміди, які містять модулі, що зумовлюють стійкість бактерій до одного чи кількох антибіотиків (так звані, фактори резистентності або R-фактори). Ці плазміди порівняно великих розмірів і можуть стимулювати кон'югацію бактерій та поширюватися в бактеріальних популяціях. Інші плазміди визначають патогенність бактерій (збудників чуми, правця), або забезпечують їх здатність використовувати для росту і розвитку нетрадиційні джерела Карбону – вуглеводні нафти, камфору, саліцилову кислоту (плазміди

біодеградації). Дрібних плазмід у клітині може бути кілька десятків, а великих – 2-3. Дрібні плазміди кодують від 2 до 5 білків, великі до 200. Молекулярна маса ДНК плазмід знаходиться в межах $2 \times 10^4 - 3,2 \times 10^5$ Да. Як правило, у клітині присутні плазміди одного виду. Геном типової кон'югативної R-плазмиди містить ДНК довжиною 100 тис. н.п., яка організована в вигляді замкненого кільця. На структурі геному розміщені модуль кон'югації (К), гени стійкості до антибіотиків (А, Б, С, Д), мобільні IS-елементи (М), спейсери, а також точки початку і закінчення реплікації (ori і ter):

Ділянки ДНК плазмід, які знаходяться між точками ori і ter, мають назву *репліхор*. Більше 50% нуклеотидних послідовностей геному R-плазмід складають гени кон'югації і реплікації, а також гени, що визначають стійкість до антибіотиків.



У багатьох видів бактерій зустрічаються **бактеріоцинні плазміди**, які продукують специфічні білки бактеріоцини (коліцини). Бактеріоцини знищують бактерії того ж або близького виду, що не містять плазмід (коліцини бактерії *E. coli*). Плазміди, що продукують білки-коліцини, містять специфічні Col-модулі, на яких закодовано один чи декілька білків, які забезпечують резистентність до дії коліцину, і тим самим захищають клітину-продуцент від ушкоджень, які може викликати її власний засіб захисту. За способом розмноження розрізняють кон'югативні і некон'югативні плазміди.

Кон'югативні або самотрансмисивні плазміди мають кон'югативні модулі, структурні гени і регуляторні ділянки, необхідні для перенесення плазмід з однієї клітини до іншої. Гени *самотрансмисивних плазмід* кодують білки *статевих пілі*, при скороченні яких проходить зближення плазмід між собою, утворення містка, через який ДНК однієї плазмиди потрапляє до іншої.

Некон'югативні плазміди не здатні до самотрансмисивності, однак за присутності трансмісивних плазмід, можуть використовувати для цього їх кон'югативний апарат. Ці плазміди отримали назву *мобілізуючих*.

Таким чином, для плазмід характерні специфічні спільні риси:

- автономна реплікація та стабільне успадкування;
- несумісність (дві, навіть близько споріднені плазміди, не можуть існувати в одній клітині);

- здатність до кон'югації та переходу в реципієнтні клітини (функція перенесення);
- здатність надавати реципієнтним клітинам певних специфічних ознак: стійкості до дії одного чи кількох антибіотиків (тетрацикліну, пеніциліну, стрептоміцину) та використовувати для росту нетрадиційні джерела Карбону.

Інкони плазміді можуть включатися до складу хромосом бактерій. В цьому випадку вони мають назву *episom*. Після вбудовування в геном клітини-реципієнта, епісоми можуть ініціювати генетичну рекомбінацію та зумовлювати зміни в ланцюгу процесів ген → білок → ознака, внаслідок включення чи блокування певних ділянок геному.

Присутність плазмід у клітинах бактерій надає їм певних переваг: забезпечує пристосування до зміни умов середовища, впливає на прояви патогенності бактерій тощо. Зокрема, на геномі плазмід може бути закодована інформація про структуру ентеротоксинів, гемолізинів, антигенів, розміщених на поверхні бактеріальних клітин. Крім бактерій, плазміді містяться у клітинах синьо-зелених водоростей, а також в деяких еукаріотичних клітинах.

Плазміді, виділені з різних бактеріальних клітин, можуть містити подібні модулі, тому є припущення, що між геномами плазмід постійно проходить обмін ними в вигляді інтактних фрагментів ДНК. Цим пояснюється значне поширення плазмід, які зумовлюють резистентність бактеріальних клітин до антибіотиків. Вивчення цих особливостей плазмід стало передумовою для ідентифікації мобільних генетичних елементів, які поширюються не лише між плазмідами, але і плазмідами та клітинними геномами, а також у межах бактеріальних геномів.

3. Мобільні генетичні елементи геному прокариот (IS-елементи і транспозони)

IS-елементи (від англ. *insertion segments* - вбудований сегмент) – це фрагменти ДНК, довжиною 750-1500 н.п., здатні до транслокації (перенесення) з однієї ділянки геному до іншої. IS-елементи містять лише ті гени, які необхідні для їх власної транспозиції. Ці елементи виявлені в бактеріальних хромосомах у вигляді чисельних повторів нуклеотидів. На кінцях IS-елементів локалізовані прямі чи інвертовані повтори нуклеотидів, довжиною від 5 до 40 н.п.

Інтегрування IS-елементів у ту чи іншу ділянку геному (інсерція) являє собою, свого роду, мутацію, яка послаблює транскрипцію генів, відмежованих від регуляторних ділянок IS-елементом, або навпаки

посилило прояви генів. Тобто, IS-елементи можуть виявляти як позитивний, так і негативний вплив на експресію окремих генів. Інсерція IS-елементів забезпечується за участю кінцевих інвертованих повторів, що викликають дублікацію ділянок ДНК, в які вбудовується IS-елемент та фланкують його з двох боків. Зокрема, F-фактор плазмід може включатися в бактеріальну хромосому і забезпечувати перенесення її частини або всієї хромосоми в реципієнтний штам бактерії *E. coli*. Із клітини донора у клітину реципієнта переноситься, як правило, один ланцюг ДНК, на якому добудовується комплементарний.

Транспозони (Тп-елементи) – це мобільні генетичні елементи бактеріальних клітин, які являють собою фрагменти ДНК, подібні до IS-елементів, однак мають значно складнішу будову. В складі транспозонів транскокуються не лише окремі гени, але і ділянки геному, які безпосередньо до них прилягають: гени токсинів, стійкості до антибіотиків, певних ферментів метаболізму.

Інкони транспозони можуть захоплювати два IS-елементи, розташовані поруч разом з фрагментом ДНК, який їх розділяє. У складі транспозонів між різними геномами можуть мігрувати також гени стійкості до певних лікарських препаратів за схемою: плазмід → геном бактеріофага → геном бактерій → плазмід. В деяких випадках може відбуватися ексцизія (вирізання) вбудованого мобільного елемента, тобто його звільнення з геному. За цих умов фрагмент або втрачається, або вбудовується в іншу ділянку геному. Інсерцію та ексцизію транспозонів контролюють специфічні білкові фактори.

Кожен транспозон може містити один чи кілька сайтів вбудовування в певні ділянки геному. Ефекти інтегрування IS-елементів і транспозонів до складу геному залежать від того, де буде проходити їх включення в геном, які ділянки ДНК вони захоплюють з собою та яким чином проходить їх вбудовування. Інтегрування мобільних елементів в будь-який ген може зумовлювати його інактивацию або генетичну перебудову, рекомбінацію.

Важливою особливістю мобільних елементів бактеріальних клітин є те, що вони можуть не лише мігрувати з однієї ділянки геному до іншої, але і зумовлювати злиття окремих репліконів, внаслідок чого утворюються їх коінтеграції, розділені фрагментами мобільного елемента.

Мобільні елементи, подібні до транспозонів та IS-елементів, виявлено у клітинах всіх нижчих та вищих організмів. Вони можуть складати до 5% структури геномної ДНК. IS-елементи та транспозони подібні до мобільно диспергованих генів (МДГ) вищих організмів.

ТЕМА: СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМУ ЕУКАРІОТ

План

1. Структурна організація геному еукаріот.
2. Організація генів на структурі геномів еукаріот.
3. Генوم ДНК-вмісних цитоплазматичних структур.
 - 3.1. Генوم мітохондрій.
 - 3.2. Генوم хлоропластів.
4. Мобільні генетичні елементи геному еукаріот.
5. Картування геному еукаріот (самостійне вивчення).

Основна література: [1, с. 218-252]; [2, с. 150-203]; [3, с. 103-107].

Додаткова література: [2]; [3]; [10]; [9]; [17].

1. Структурна організація геному еукаріот

Еукаріоти (від *eu* – істинний, *carion* – ядро) – це одно- та багатоклітинні організми, для яких характерні переважно полігеномні клітини, морфологічно сформоване ядро і наявність у клітинах чисельних мембранних структур із специфічними функціями. Клітини еукаріот, на відміну від прокаріот, містять ядро, відмежоване від решти цитоплазми подвійною ядерною оболонкою.

Геноми еукаріотичних клітин представлені: ядерним геномом, локалізованим на структурі ядерної ДНК, а також мітохондріальним та пластидним геномами. У деяких водоростей генوم локалізований між оболонкою пластид та хлоропластним ендоплазматичним ретикулумом. Відомі дві групи організмів, що містять нуклеоморф: криптонади і хлораракхіофіти. Клітини цих організмів містять два бактеріальні геноми (генوم мітохондрій і пластид зелених/червоних водоростей) і два еукаріотичних (ядерний генوم та генوم нуклеоморфу).

Таким чином, для клітин еукаріот характерні *двохкомпонентні геноми*, представлені ядерною та мітохондріальною ДНК (гриби, вищі тваринні організми), *трьохкомпонентні*, які включають ядерну, мітохондріальну і пластидну ДНК (вищі організми) і *чотирьохкомпонентні* - містять ядерну, мітохондріальну, пластидну та нуклеоморфну ДНК.

Враховуючи це, **геном еукаріот** – це сукупність генів, зосереджених у гаплоїдному наборі хромосом клітин зародкового типу

та в позахромосомних генетичних структурах, які містяться у клітинах організму.

Носієм генетичної інформації у клітинах еукаріот є комплекс ДНК з білками гістонового та негістонового типу (нуклеогістон), який розподілений між набором хромосом клітини і характерний для кожного окремого виду організмів.

В ядрі диплоїдних клітин людини зосереджено 46 хромосом (22 пари аутомосом і 2 статеві хромосоми). Оскільки у всіх соматичних клітинах організму міститься один і той же набір хромосом, на яких зосереджений ядерний геном, всі вони несуть однотипну генетичну інформацію, тобто для соматичних клітин організму людини характерна *генетична еквівалентність*. У пресинтетичній фазі клітинного циклу (напередодні поділу), а також постійно у клітинах, які втратили здатність до поділу, кожна хромосома містить одну молекулу ДНК, довжина якої в неспіралізованому вигляді складає близько 5 см. Тобто, довжина ДНК всіх 46 хромосом клітини людини близько 2,3 м, а загальний об'єм інформації складає 750 Мб. У кожній соматичній клітині організму людини міститься 3 мільярди н.п. Загальна довжина ДНК всіх клітин організму, кількість яких 60×10^{12} , складає 100 мільярдів км, що в 600 разів перевищує відстань від Землі до Сонця. У складі хроматину молекула ДНК має високий ступінь компактизації, що забезпечує її локалізацію в ядерному апараті клітини.

Існує декілька рівнів компактизації ДНК у хромосомі: нуклеосомний, соленоїдний, супербідний, доменний, петлеподібний, що зменшує загальну довжину ДНК всіх 46 метафазних хромосом у 100 тис. разів, порівняно з її довжиною в некомпактизованому вигляді.

Гаплоїдний набір хромосом людини містить біля 30 тис. генів, що кодують білки. Решта ДНК включає регуляторні ділянки, інтрони, екзони та різні повтори нуклеотидів. До 8% геному складають ділянки ДНК, в яких заковані ретровіруси HERV (Human endogenous retrovirus), „наймолодшому” з яких HERV-K біля 5 млн. років. Сумарну кількість ДНК геному позначають символом С. Вона вимірюється пікограмами (пкг), дальтонами або кількістю нуклеотидних пар ($1 \text{ пкг} = 0,965 \times 10^9 \text{ н.п.} = 6,1 \times 10^9 \text{ Да}$). Довжину геномної ДНК клітини виражають в сантиморганах (сМ). Сантиморганіда дорівнює довжині одного млн. н.п., або одній Мб (мегабазі). Довжина молекули ДНК всіх хромосом однієї клітини людини складає більше 5980 сМ (130 сМ на одну хромосому).

Загальний розмір геному еукаріот на кілька порядків більший, ніж у прокаріот, зокрема, геном комах включає $2,3 \cdot 10^8$ н.п., рептилій – $1,5 \cdot 10^9$ н.п., ссавців – $2,6 \cdot 10^9$ н.п., людини – $3,2 \cdot 10^{11}$ н.п.

2. Організація генів на структурі геномів еукаріот

На відміну від прокаріот, гени еукаріотичних клітин не організовані в оперони і являють собою транскрипційну одиницю, до складу якої входять структурні та регуляторні ділянки, що визначають початок і закінчення транскрипції різних видів РНК клітини (іРНК, тРНК, рРНК). Ці РНК виконують роль матриць для синтезу специфічних білків (іРНК) або забезпечують формування апарату білкового синтезу та перебіг процесу трансляції (рРНК та тРНК).

Транскрипційна одиниця геному еукаріот відповідає за синтез однієї молекули іРНК, які є моноцистронними. Особливістю транскрипційних одиниць геному еукаріот є те, що в структурі деяких з них виявлено „розірвані гени” (гени, що кодують іРНК) та містять інформативні ділянки екзони та неінформативні інтрони.

Кількість і довжина інтронів та екзонів у геномах різних організмів значно варіює – від 1,5 до 18 тис. н.п. Інколи довжина інтронів значно перевищує довжину екзонів. Одночасно з цим, в структурі деяких генів містяться лише кілька інтронів або вони взагалі відсутні (Табл. 6).

Таблиця 6

Кількість інтронів на окремих генах геному еукаріот

Продукт гена	Організм	Довжина екзонів, н.п.	Інтрони	
			Кількість	Загальна довжина, н.п.
аденозиндезаміназа	людина	1,5 тис.	11	30 тис.
аполіпротеїн В	людина	14 тис.	28	29 тис.
еритропоетин	людина	582	4	1562
фактор V	людина	9 тис.	25	177 тис.
α -інтерферон	людина	600	0	0
β -глобіни	миша	432	2	762
дигідрофолатредуктаза	миша	568	5	31,5 тис.
Гіпоксантинфосфорибозил-трансфераза	миша	1307	8	32 тис.
фіброїн шовку	шовкопряд	18 тис.	1	970
цитохром b	мітохондрії дріжджів	2,2 тис.	6	5,1 тис.

Гени, які забезпечують синтез рРНК, не містять інтронів, а включають кодуючі послідовності і спейсери (проміжні послідовності, що розділяють окремі гени). Регуляторні ділянки, які визначають

початок та закінчення синтезу молекул РНК, включають селекторну зону (ТАТА-мотив), ініціюючий кодон і термінатор. Ділянка гену, на якій закодована структура відповідних РНК, що забезпечує синтез білкових молекул чи інших генних продуктів, фланкована з двох боків 5' і 3'-нетранслюючими чергуваннями нуклеотидів (Рис. 13).

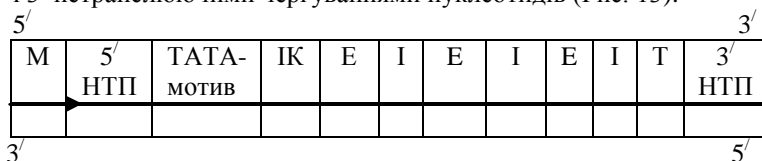


Рис. 13. Будова транскрипційної одиниці еукаріот

М – модулятор (регулятор частоти транскрипції), 5'-НТП – 5'-нетранслююча послідовність,

ТАТА-мотив – ділянка ініціації транскрипції, ИК – ініціюючий кодон,

Е – екзон, І – інтрон, Т – термінатор, 3'-НТП – 3'-нетранслююча послідовність

Тобто, транскрипційна одиниця еукаріот включає регуляторні та структурні ділянки. На певній відстані від структурних ділянок розміщений *модулятор*, який забезпечує регуляцію частоти ініціації транскрипції. Модулятор, у свою чергу, містить специфічні регуляторні елементи, які являють собою набір коротких нуклеотидних блоків, де зосереджено центри зв'язування специфічних білкових факторів. Залежно від білкових факторів, які зв'язують ці регуляторні ділянки, модулятор може виступати в ролі *енхансера* (підсилювача) чи *сайленсера* (пригнічувача) транскрипції. На основі робіт по секвенуванню окремих еукаріотичних геномів, проведених Міжнародним Консорціумом, встановлено, що до складу геному людини входить 31780 генів, дрозофіли – 13601, дріжджів – 5885 генів. Раніше вважали, що геном людини містить від 60 до 100 тис. генів, кожен з яких включає в середньому від 1 000 до 1 500 нуклеотидних пар. Як видно з наведених прикладів, до складу геному людини входить, в середньому, лише у два рази більше генів, ніж до складу геномів інших організмів, однак структурна організація їх набагато складніша.

Гени інформаційних РНК. Ці гени локалізовані на унікальних *повторах нуклеотидів ДНК* і кодують іРНК, що виконують роль матриць при синтезі білків у процесі трансляції. Для них характерна мозаїчна будова: кодуючі чергування нуклеотидів (екзони) в їх структурі чергуються з некодуючими (інтронами). Не містять інтронів лише деякі гени, що кодують гістонові білки та гени α - і β -інтерферону. Інтронні ділянки присутні також у генах іРНК геному рослин та хребетних тварин. Довжина інтронних ділянок в структурі

генів та їх нуклеотидний склад може значно варіювати в різних видів організмів. Гомологічні гени можуть містити однакову кількість інтронів, які локалізовані на одних і тих же ділянках геному. Кількість інтронів, які входять до складу генів, як правило, різна, що залежить від довжини ділянок, які кодують іРНК. У складі генів загальна довжина інтронних ділянок перевищує довжину екзонів у декілька разів. Екзонні ділянки включають в середньому до 300 н.п.

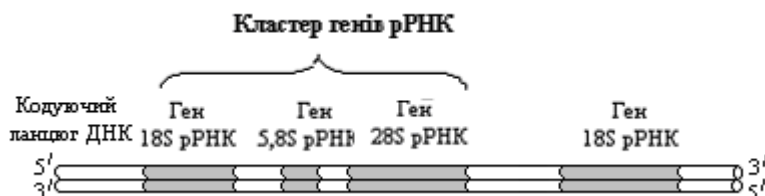
У генах, що кодують білки, інтрони розташовані між ділянками, які несуть інформацію про окремі структурні і функціональні домени. *Інтрон-екзонна, мозаїчна структура генів іРНК еукаріот*, на думку В. Гілберта (1977 р.), яка формувалася у процесі еволюційного розвитку багатоклітинних організмів, забезпечила можливість обміну ексонами між неспорідненими генами. Внаслідок такого „перетасування генів” відбувався синтез нових білків-ферментів із специфічними функціями, молекули яких включали функціональні модулі, або домени, які раніше належали іншим білкам. Це зумовило перебудову геномів організмів та сприяло їх еволюційному розвитку (гіпотеза пізнього виникнення інтронів). Згідно з іншим припущенням (Дж. Дарнел, 1978 р.), інтрони являють собою *еволюційні релікти*, які раніше були частиною гігантських генів. Тобто, мозаїчна будова генів іРНК еукаріот, у значній мірі, сприяла еволюції геномів вищих організмів, оскільки найбільших змін за цих умов зазнавали саме інтронні ділянки генів. Ці зміни були зумовлені мутаціями: інсерціями, вставками, делеціями, інверсіями. Екзонні ділянки, на відміну від інтронів, у процесі еволюції змінювалися в меншій мірі, тобто були більш консервативними. Враховуючи це, припускають, що геном прокаріот, який не містить інтронів, втратив і здатність до еволюційних змін.

Для еукаріот характерні *моноцистронні одиниці транскрипції*: один ген забезпечує синтез однієї молекули іРНК. Враховуючи «надлишковість» ДНК геному еукаріот, зумовлену відношенням інформативних ділянок до неінформативних (як 1: 9), при транскрипції утворюється первинний транскрипт, з якого внаслідок посттранскрипційної модифікації (процесінгу, або дозрівання) утворюється молекула зрілої іРНК, яка містить лише кодуючі послідовності нуклеотидів.

Гени рибосомних РНК. Ці гени кодують різні види рРНК, необхідні для формування субчасточок рибосом та утворення на їх структурі функціонально активного центру під час трансляції генетичної інформації. Кількість цих генів у складі геному різних видів еукаріот, як правило, сягає від сотень до кількох тисяч. Гени рРНК

можуть знаходитися в структурі однієї чи кількох хромосом. Зокрема, в геномі людини міститься близько 200 генів рРНК, які локалізовані на структурі 13, 15, 21, 22 хромосом. Сайти геномної ДНК, де локалізовані гени рРНК, мають специфічну структурну організацію і одержали назву *ядерцевих організаторів*.

Гени рРНК – це тандемні повтори нуклеотидів, організовані в вигляді кластерів, які утворюють одну транскрипційну одиницю. На структурі цих кластерів може бути закодовано кілька видів РНК (18S, 5,8S, 28S рРНК). Довжина кластерів трьох генів, які кодують різні види рРНК, близько 8 тис. н.п. У кластері гени розділені двома спейсерами:



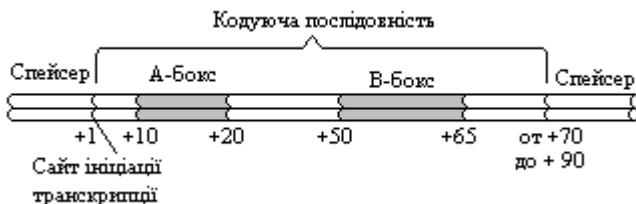
Крім того, спейсери містяться між сусідніми кластерами і можуть включати до 5 тис. н.п. На генах рибосомних РНК синтезуються високомолекулярні попередники рРНК (пре-рРНК), з яких, внаслідок посттранскрипційної модифікації, утворюються різні клітинні рРНК. Довжина кластерних ділянок та міжгенних спейсерів може варіювати в різних видів організмів. Особливістю цих ділянок є те, що вони містять прямі *тандемні повтори* нуклеотидів, подібні до сигнальних послідовностей сайту початку транскрипції. Між тандемними повторами, які локалізовані на структурі міжгенних спейсерів, може проходити кросинговер, внаслідок чого змінюється як кількість міжгенних спейсерів, так і в цілому генів рРНК.

Одиниця транскрипції рРНК у геномі людини має довжину 14 тис. н.п. і кодує всі види рРНК. На цій ділянці розташований кластер генів, який кодує 18S, 5,8S і 28S.

Гени 5S рРНК розміщені окремо від решти генів. Вони не містять інтронів і включають в середньому 120 н.п. Кількість копій гену 5S рРНК може сягати до 2 тис. Промоуторна ділянка в генах 5S рРНК розміщена серед кодуючої ділянки гену і включає 55-80 н.п.

Гени рРНК представлені великою кількістю копій. У людини, в розрахунку на гаплоїдний набір генів, кількість їх копій може складати близько 100, в соматичних клітинах земноводних – близько 900. *Особливістю генів рРНК є те, що в них відсутні інтрони.* Крім того ці гени, порівняно з іншими, містять велику кількість ГЦ-пар.

Гени транспортних РНК. На структурі геному еукаріот містяться гени, в яких закодовано близько 100 видів тРНК, що забезпечують транспорт аміноацил-тРНК до рибосом під час трансляції генетичної інформації. Гени тРНК розміщені на *помірних повторах* нуклеотидів і утворюють кластери, які локалізовані на різних ділянках геному. Всього в гаплоїдному наборі хромосом людини міститься близько 1300 генів тРНК. На кожен вид тРНК припадає по 10-20 копій генів. Організація генів тРНК у складі кластерів варіює в різних видів організмів. Гени можуть бути розділені спейсерами довжиною від ста до кількох тисяч н.п. На структурі генів, як правило, присутній один інтрон, до складу якого входить від 14 до 60 н.п.:



Інтрон локалізований поблизу ділянки, яка при транскрипції утворює 3'-кінець антикодону. Регуляторна ділянка гену тРНК розміщена посеред кодуєчих послідовностей і включає два бокси: А та В. Така будова регуляторної ділянки генів забезпечує їх ефективну транскрипцію. А-бокс розташований на кодуєчій ділянці гену тРНК на відстані від 10 до 20 н.п. від стартової точки, а В-бокс, відповідно, на відстані 50-65 н.п. Тобто, А- та В-боксы регуляторної ділянки розділені кодуєчими послідовностями нуклеотидів та є найбільш консервативними ділянками генів. Ці бокси локалізовані на дигідроуридиловій і псевдоуридиловій петлях транскрибованих тРНК. На цих ділянках знаходиться велика кількість інвертованих чергунів нуклеотидів, які під час трансляції генетичної інформації забезпечують зв'язування тРНК з рибосомним апаратом клітини і відповідним ферментом – аміноацил-тРНК-синтетазою.

3. Геном ДНК-вмісних цитоплазматичних структур

3.1. Геном мітохондрій

Мітохондрії – це клітинні органели, округлі чи еліпсоїдні двомембранні структури, локалізовані в цитоплазмі клітин еукаріот, які забезпечують процеси біоенергетики і є, свого роду, „енергетичними станціями” клітин:



Мітохондріальна ДНК, в структурі якої локалізований геном цих органел, складає менше 1% всієї ДНК клітини. Розмір мітохондріальних геномів варіює в різних видів організмів. Так, у найпростіших до його складу входить близько 40 тис. н.п., у вищих організмів – від 16 до 20 тис. н.п. У мітохондріальному геномі дріжджових клітин налічується до 80 тис. н.п., тобто практично втричі більше, ніж у мітохондріальному геномі вищих тварин і людини. Значну частину мітохондріального геному дріжджів складають інтрони та ділянки багаті АТ-парами, функції яких ще не з'ясовано. На структурі геному мітохондрій людини, який організований надзвичайно компактно, некодуєчі послідовності відсутні.

Переважає більшість білків мітохондрій синтезується на рибосомному апараті клітини. Одночасно з цим, мітохондрії містять і власний набір генів, транскрипти яких забезпечують функціонування мітохондріального апарату білкового синтезу та формування структури реплікативного апарату мітохондрій, оскільки ДНК мітохондрій реплікуються незалежно від ядерної ДНК.

На сьогодні розшифровано структуру багатьох мітохондріальних геномів та створено генетичні карти, які дають уяву про локалізацію окремих генів. Було встановлено, що подібні за нуклеотидним складом ділянки ДНК в мітохондріальних геномах різних видів організмів виконують специфічні функції. Набір генів мітохондрій людини локалізований на кільцевій молекулі ДНК, яка містить важкий (H) та легкий (L) ланцюги.

Гени мітохондріальної ДНК людини несуть інформацію про первинну структуру 13 білків, всі види тРНК та два види рРНК. Майже 60% генів мітохондріальної ДНК кодуєть компоненти НАД-дегідрогеназного комплексу, білкові субодиниці АТФ-синтетази, цитохромоксидази та цитохрому „с”. Практично всі ці гени, крім одного, а також гени двох рРНК та шести тРНК локалізовані на H-

Для тварин, зокрема ссавців, характерні спільні закономірності будови мітохондріального геному.

У клітинах рослин, як правило, міститься від 50 до 2 тис. мітохондрій, в кожній з яких може бути локалізовано до ста копій геному. Мітохондріальний геном рослин об'ємніший і включає до 2500 н.п. Ця величина значно варіює навіть в одній родині рослин. Так, у різних представників родини гарбузових ДНК мітохондріального геному може містити від трьох до 850 тис. нуклеотидних пар. Зокрема, в геномі дині міститься близько 2400 нуклеотидних пар. Такий геном кодує три рРНК, 16 тРНК, 10 рибосомних білків, частину білків електронно-транспортного ланцюга, три субодиниці АТФ-синтетази та чотири субодиниці цитохрому „с”. Для геному мітохондрій рослин характерна рекомбіногенна природа, чим пояснюється їх множинність. Велика кількість молекул ДНК утворюється в результаті рекомбінацій між чергуваннями нуклеотидів, що повторюються, та їх рекомбіногенними транслокаціями.

3.2. Геном хлоропластів

Хлоропласти – це один з видів пластид рослинних клітин, яким належить важлива роль у перебігу процесу фотосинтезу.

Вони являють собою плоскі диски, діаметром 2-10 мкм і товщиною 1 мкм, обмежені внутрішньою і зовнішньою мембранами, які розділені міжмембранним простором. Внутрішній вміст хлоропластів – *stroma*, подібний до цитозолу клітин бактерій і містить кільцеву ДНК та рибосоми, на яких проходить синтез білків, необхідних для забезпечення метаболізму цих органел:



Одночасно з цим, більшість білків хлоропластів кодуються ядерними генами клітини. Як і мітохондрії, хлоропласти мають

власний геном, представлений великою кількістю копій кільцевої ковалентно з'єднаної дволанцюгової молекули ДНК, розміри якої варіюють у різних видів рослин в межах 130-160 тис. н.п. На молекулі ДНК зосереджено близько 130 генів. На сьогодні, повністю розшифровано чергування нуклеотидів хлДНК багатьох видів рослин. Це дало можливість виявити загальні закономірності її структурної організації та консервативності в ході еволюції. Серед генів, локалізованих на хлДНК, гени 4 типів рРНК (4,5S, 5S, 16S, 23S), 30 видів тРНК, 20 видів рибосомних білків та гени двох субодиниць ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази.

При дослідженні структури геному хлоропластів тютюну вивчено локалізацію 79 генів. Значна частина транскриптів цих генів перед ініціюючим кодоном містять SD-подібні чергування нуклеотидів (послідовності Шайна-Дальгарно), до складу яких входить 20 нуклеотидів. Інші транскрипти також містять такі послідовності, однак їх локалізація не фіксована на матриці, хоч вони суттєво впливають на інтенсивність транскрипції іРНК. Хлоропластний геном кодує близько 40 білків тілакоїдної мембрани, які необхідні для формування комплексів електронно-транспортного ланцюга. Це складає близько половини білків, що входять до його складу. Решта білків тілакоїдів закодовані на генах ядерної ДНК. Структурна організація окремих ділянок ДНК хлоропластів подібна до генів бактеріальних клітин. Деякі гени хлоропластів об'єднані в оперони. Це стосується як організації промоуторних ділянок, які регулюють початок транскрипції та локалізовані на 35-10 н.п. від сайту початку транскрипції, так і термінаторів, що визначають її закінчення. На відміну від прокариот, ДНК хлоропластів містять інвертовані та неінвертовані повтори нуклеотидів. Окремі гени хлоропластів містять інтрони, тому для їх генних продуктів характерний процесінг і сплайсінг. Деякі еукаріотичні риси виявлені і у промоуторних ділянках окремих хлоропластних генів. Зокрема, в їх складі наявні три види промоуторів, які можуть розпізнаватися пластидною РНК-полімеразою, полімеразою ядра, або активуються світлом (у кукурудзи).

У пластидах рослин виявлено такий важливий процес як *РНК-редагування*, суть якого в модифікації всіх кодуючих ділянок іРНК, елімінації ініціюючих та термінуючих кодонів. Було встановлено, що білки, для яких характерні нативні властивості, синтезуються лише на відредагованих молекулах іРНК. Тобто, у пластидах на одній і тій же ділянці геному можливе утворення різних за будовою генних продуктів, які забезпечують диференціювання

клітин і тканин. Незважаючи на відносну автономію геномів цитоплазматичних ДНК-вмісних структур (мітохондрій та хлоропластів), вони, разом з ядерним геномом, складають єдину систему і функціонують синхронно та узгоджено.

4. Мобільні генетичні елементи геному еукаріот

У геномі еукаріот, залежно від особливостей структурної організації і молекулярних механізмів транслокації та інтегрування, виділяють такі види мобільних генетичних елементів: *транспозони*, *ретротранспозони* і *ретропозони*.

Значний внесок у вивчення мобільних генетичних елементів геному еукаріот було зроблено працями Г. Георгієва, який встановив, що мобільні генетичні елементи, або, так звані, *мобільно дисперговані гени (МДГ)* можуть виявляти вплив як на структуру, так і на експресію інших генів і, як наслідок, на властивості генних продуктів. Крім того, дослідженнями Г. Теміна (1972 р.) було виявлено подібність транспозонів, мобільно диспергованих генів та онкогенів провірусів, які можуть вступати в рекомбінантну взаємодію з окремими клітинними генами та зумовлювати онкотрансформацію клітин.

Транспозони. Цей вид мобільних генетичних елементів геному еукаріот подібний до транспозонів прокариот, однак має певні специфічні риси:

- до складу транспозонів крім генів, здатних до транспозиції, входять ділянки ДНК, які розміщені поруч, або фрагменти інших генів, локалізовані на певній відстані;
- кожен транспозон містить чергування нуклеотидів, які забезпечують вбудовування його в геном. Екцизія та транслокація транспозонів відбувається за участю специфічних ферментів (*рестриктаз та транслоказ*), а також внаслідок утворення їх копій, які вбудовуються в інші ділянки геному. В першому випадку відбувається поширення їх у геномі, а у другому – ампліфікація (значне збільшення копій);
- при екцизії транспозони інколи видаляються не повністю, внаслідок чого відбувається індукція хромосомних перебудов. Це зумовлює нестабільність геномів та є важливим фактором еволюції. Вбудовування та екцизію транспозонів контролюють специфічні білки;
- на кінцях транспозонів містяться інвертовані (спрямовані назустріч одні одним) повтори нуклеотидів. Транспозони в геномі можуть бути присутні в вигляді 30-50 копій;

- повні копії транспозонів містять відкриті рамки зчитування (ORF), які кодують фермент *транслоказу*, необхідний для перенесення мобільних генетичних елементів. Перед транслокацією цих елементів проходить зближення інвертованих послідовностей та вирізання їх з певних сайтів ДНК з наступним перенесенням та вбудовуванням в інші. Прикладом транспозонів еукаріот можуть бути Р-елементи геному дрозофіли та Ас-елементи геному кукурудзи.

Ретротранспозони. За структурою ретротранспозони подібні до проретровірусів, які вбудовуються в геном за участю ферменту зворотної транскриптази. Вони містять структурні ділянки, що включають 5-8 тис. н.п., і з двох боків фланковані довгими прямими кінцевими послідовностями (ДКП або LTR від англ. *long terminal replats*), до складу яких входять 300-400 н.п.

- на структурних ділянках знаходяться відкриті рамки зчитування (ORF), які кодують ферменти (*зворотню транскриптазу та інтегразу*);

- число копій ретротранспозонів, що належать до однієї родини, є стабільним для кожного окремого виду організму і може варіювати в межах від кількох десятків до сотень тисяч копій;

- окремі родини ретротранспозонів різняться за нуклеотидним складом на структурних ділянках та в ДКП-послідовностях;

- ретротранспозони виявлено в геномі дрозофіли, дріжджів, хребетних тварин і рослин.

Ефект інтегрування ретротранспозонів залежить від структури і функцій ділянки геному, в яку вони інтегруються. Якщо ретротранспозони вбудовуються поблизу генів, вони можуть виявляти як позитивний, так і негативний ефект на їх експресію. Зокрема, в деяких випадках проходить пригнічення функціональної активності гену та порушується утворення генних продуктів внаслідок термінації поблизу сайтів поліаденілування в одних ДКП, або навпаки ініціації цих сайтів в інших ДКП.

Інколи інтеграція ретротранспозонів супроводжується мутаціями, які зумовлюють пригнічення чи гіперпродукцію генних продуктів, що впливає на появу специфічних фенотипових ознак. За певних умов спостерігається також повна або часткова реверсія мутацій до норми внаслідок ексцизиї мобільного генетичного елементу при збереженні у складі хромосоми лише одного ДКП. Інтеграція ретротранспозону поруч з проонкогеном може індукувати його функціонування та зумовлює розвиток злоякісних пухлин.

Для ретротранспозонів, що не містять ДКП, можливий інший вид інтегрування, який реалізується за участю ферменту зворотної

транскриптази. За цих умов ретротранспозони транслюкуються до певних ділянок одного з ланцюгів ДНК-акцептора і включаються до його складу. Роль затравки для синтезу ДНК-копій ретротранспозону виконує комплементарний ланцюг ДНК. У цьому процесі задіяний фермент зворотна транскриптаза. Фермент спочатку синтезує невеликий фрагмент ДНК-мішені, після чого змінює матрицю і копіює РНК, яка далі видаляється, та добудовується комплементарний ланцюг ДНК. Тобто, ці ретротранспозони діють подібно до ферменту теломерази, який запобігає недореплікації 5'-кінців ДНК у процесі клітинного поділу.

Ретропозони. Цей вид мобільних генетичних елементів являє собою вбудовані в геном еукаріот ДНК-копії, які синтезуються на різних видах клітинних РНК за участю ферменту зворотної транскриптази. Відкриття ретропозонів стало передумовою для припущення про можливість перенесення інформації у клітині в напрямку РНК → ДНК та повернення її до геному в вигляді ретропозонів. Ретропозони можуть складати до 10% геномної ДНК ссавців. Таким чином, зворотний потік інформації від РНК до ДНК у клітинах еукаріот в еволюційному масштабі може бути суттєвим.

Розрізняють різні види ретропозонів, зокрема, в геномі ссавців поблизу генів, які містять інтрони та транскрибуються РНК-полімеразою II, було виявлено, так звані, *псевдогени*, що являють собою дефектні копії генів, які містять дА-полі і дТ-полі чергування нуклеотидів на 3'-кінцях молекули. Тобто, роль матриці для їх транскрипції, по суті, виконує „процесована” поліаденілована іРНК. Псевдогени, які є продуктом зворотної транскрипції іРНК, складають лише невелику частину геномних ретропозонів. Значна кількість повторів нуклеотидів, що містяться в геномі хребетних тварин, утворюється внаслідок ретропозиції ДНК-копій інших видів клітинних РНК і являє собою аномально процесовані їх клітинні транскрипти. Число копій таких повторів у складі геному еукаріот сягає до 30 тис. В довгих повторах нуклеотидів може знаходитися кілька відкритих рамок зчитування, для яких характерна гомологія за нуклеотидним складом з генами, що кодують фермент ревертазу в ретровірусів.

Отже, позахромосомні цитоплазматичні структури можуть виконувати роль матриць для нуклеотидних послідовностей, які включаються в геном у вигляді псевдогенів, причому характер їх процесінгу може визначати особливості структури новоутворених генів.

Таким чином, **структурна організація геному еукаріот має такі особливості:**

- геном еукаріот локалізований на хромосомній ДНК та позахромосомних ДНК-вмісних структурах (мітохондріях, пластидах);
- для клітин еукаріот характерні дво-, три- і чотирикомпонентні геноми;

- геномна ядерна ДНК еукаріот асоційована з білками гістонового і негістонового типу і локалізована в ядерному апараті клітини;

- відношення інформативних ділянок до неінформативних на структурі геному еукаріот складає 1:9 і лише 0,4% закодованої інформації використовує клітина протягом життєвого циклу. У зв'язку з цим порушується принцип колінійності – відповідності первинної структури ДНК первинній структурі білків, які синтезуються на рибосомному апараті клітини за участю транскрибованих на структурі ДНК специфічних іРНК. Синтезовані первинні генні транскрипти відповідних РНК перед трансляцією, зазнають специфічної посттранскрипційної модифікації (процесінгу і сплайсінгу). Крім того, гени або їх кластери, які кодують субодиниці олігомерних білків можуть знаходитися на різних ділянках хромосоми або навіть на різних хромосомах. Тому такий важливий постулат молекулярної генетики як *один ген – один білок для еукаріот формулюється як: один ген – кілька поліпептидних ланцюгів, один поліпептидний ланцюг – кілька генів*;

- для генів ядерного геному еукаріот не характерна оперонна організація як і поняття „промоутор”. У цьому випадку мова може йти лише про наявність промоуторної ділянки на структурі ДНК, функціонування якої знаходиться під впливом складних регуляторних механізмів. Ця ділянка може впливати як на окремі гени, так і на групу генів, локалізованих на значній відстані від неї;

- переважна більшість генів на структурі геному еукаріот представлена великою кількістю копій, які утворюють мультигенні родини (множинні гени). Наявність чисельних копій генів у мультигенних родин забезпечує варіативність структури первинних транскриптів та посилює їх експресію. Така множинність, у першу чергу, характерна для генів, які кодують первинні транскрипти, необхідні для формування апарату білкового синтезу (тРНК, рРНК) та для формування вищих рівнів структурної організації ДНК;

- гени, продуктами транскрипції яких є гомологічні білки, що виконують подібні функції, на структурі геному утворюють кластери, розмір та кількість яких може варіювати;

- гени, що кодують іРНК можуть мати *мозаїчну будову*. На структурі цих генів інформативні ділянки (екзони) чергуються з неінформативними (інтронами). Кількість інтронів у складі генів, а також їх довжина різні. Як правило, загальна довжина інтронних ділянок перевищує довжину екзонів у кілька разів;

- всього в геномі людини зосереджено більше 30 тисяч генів, кожен з яких містить 1000-1500 нуклеотидних пар;

- інформаційні РНК геному еукаріот є моноцистронними;

- гени іРНК локалізовані на унікальних повторах нуклеотидів, для них характерна “мозаїчна” інтрон-екзонна структура;

- гени рРНК зосереджені на ділянках ДНК, які мають назву ядерцевих організаторів, де локалізовані тандемні повтори нуклеотидів. Кластери генів рРНК утворюють транскрипційну одиницю, на якій закодовано 18S, 16S, 28S РНК. Ці гени розділено двома спейсерами. Гени рРНК не містять інтронів і багаті ГЦ-парами нуклеотидів;

- на структурі геному еукаріот закодовано близько 100 видів тРНК. Вони розміщені на помірних повторах нуклеотидів, утворюють кластери і можуть бути розділені спейсерами та містять один інтрон, локалізований на ділянці, яка при транскрипції утворює 3' кінець антикодону;

- геном еукаріот містить велику кількість міні- та мікросателітів, мобільно диспергованих елементів, які складають від 10 до 30% геному у тварин і до 50% геному рослин. Ці елементи можуть транслокуватися як в межах однієї хромосоми, так і між різними хромосомами. Мобільні елементи, як правило, розсіяні по всьому геному, або локалізуються на певних ділянках хромосом;

- до 35% генів геному можуть транскрибуватися з різних рамок зчитування, а близько 40% первинних транскриптів зазнають альтернативного сплайсінгу;

- в геномі людини, порівняно з геномами інших організмів, міститься значно більше генів, транскрипти яких забезпечують такі важливі функції, як підтримання показників гомеостазу та стану імунного захисту, перебігу процесів транскрипції і трансляції;

- гени, які кодують білки, складають, в середньому, 2% геному, гени різних видів РНК – близько 20%. До 50% геному людини складають різні повтори нуклеотидів, значна кількість яких за будовою подібна до структури РНК інтегрованих форм інфекційних ретровірусів птахів і ссавців. Це, так звані, *ендогенні ретровіруси геному*, яких на даний час виявлено близько 30 тис.

ТЕМА: МАТРИЧНИЙ СИНТЕЗ БІОПОЛІМЕРІВ. ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ РЕПЛІКАЦІЇ

План

1. Види матричного синтезу біополімерів.
2. Загальні закономірності реплікації.
3. Реплікація в клітинах прокариот.
4. Реплікація ДНК бактеріальних плазмід.

Основна література: [1, с. 253-294]; [2, с. 204-232]; [3, с. 13-26].

Додаткова література: [1]; [2]; [3]; [4]; [17]; [18]; [19].

1. Види матричного синтезу біополімерів

Вивчення механізмів матричного синтезу біополімерів тривалий час було однією з найважливіших проблем біологічної науки, від вирішення якої, у значній мірі, залежав як її прогрес, так і розвиток та становлення нової галузі знань про живу природу – молекулярної біології. Це стало можливим лише після з'ясування генетичної ролі нуклеїнових кислот. Зокрема, було встановлено, що саме цей вид біополімерів клітини започатковує потік генетичної інформації у клітині та, внаслідок матричного синтезу білків, забезпечує прояви всіх фенотипових ознак організму.

Матричний синтез – це синтез біополімерів клітини на інформативній матриці, яка несе генетично запрограмовану інформацію про їх первинну структуру та біологічні функції.

За матричним механізмом синтезуються такі важливі біополімери клітини як білки та нуклеїнові кислоти. Ці нітрогеновмісні гетеробіополімери складаються з різних мономерних ланок, лінійна послідовність яких несе певне інформаційне навантаження, що реалізується в їх первинній структурі.

Залежно від виду матриці, способу її використання, а також шляхів, напрямків і механізмів передачі генетичної інформації розрізняють кілька видів матричного синтезу:

- **Реплікація** (від англ. *replication* – копіювання, самоподвоєння) – передача інформації між одним видом нуклеїнових кислот: ДНК → ДНК або РНК → РНК (у РНК-вмісних вірусів). Суть реплікації у специфічному копіюванні структури та подвоєнні ланцюгів з утворенням комплементарних копій, що забезпечує збереження видоспецифічної генетичної інформації та можливість її передачі наступним поколінням.

Матрицею, в цьому випадку, є два взаємно комплементарні ланцюги ДНК або ланцюг РНК. *Одноланцюгова матриця копіюється, або самоподвоюється*, за принципом комплементарності і виконує роль своєрідного „штампу” для відтворення власної первинної структури. Наслідком реплікації є утворення нового покоління молекул, які є точною копією вихідної матричної молекули. Матричні (батьківські) і синтезовані (дочірні) ланцюги взаємокомплементарні та протилежно спрямовані, мають, відповідно, напрям $3' \rightarrow 5'$ та $5' \rightarrow 3'$. Синтезовані дочірні ланцюги містять елементи матриці, тобто, реплікація проходить за *напівконсервативним механізмом*. Перевагою цього механізму є те, що ймовірність помилок при передачі генетичної інформації наступним поколінням нівелюється, оскільки копіювання є в достатній мірі точним процесом.

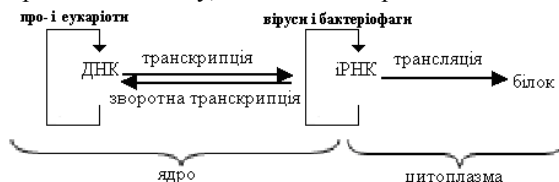
• **Транскрипція** (від англ. *transcriptio* – переписування) – *передача генетичної інформації між різними видами нуклеїнових кислот*: ДНК \rightarrow РНК та РНК \rightarrow ДНК. При транскрипції інформація, закодована на структурі нуклеїнових кислот, за принципом комплементарності переписується (транскрибується) з утворенням різних видів РНК (іРНК, тРНК, рРНК).

Розрізняють *пряму транскрипцію*, внаслідок якої відбувається передача інформації від ДНК до РНК та *зворотню транскрипцію*, потік інформації, в цьому випадку, спрямований від РНК до ДНК. Роль матриці при прямій транскрипції виконує один з ланцюгів ДНК – *матричний* або плюс-ланцюг (+), ($3' \rightarrow 5'$), комплементарний до нього *кодуючий* або мінус-ланцюг (-), відповідно, ($5' \rightarrow 3'$). Матриця “*переписується*” (транскрибується) за принципом комплементарності. При зворотній транскрипції роль матриці виконують молекули вірусних РНК. Транскрипція, на відміну від реплікації, проходить за *консервативним механізмом* – у транскрибованих молекулах відсутні елементи матриці.

• **Трансляція** (від лат. *translatius* – передавати, переносити) – *передача інформації між різними видами біополімерів*: іРНК \rightarrow білок.

У цьому виді матричного синтезу роль матриці виконує іРНК, транскрибована на одному з ланцюгів ДНК (матричному). Матриця *переводиться* (трансльюється) за принципом комплементарності. Трансляція відбувається в цитоплазмі на рибосомному апараті клітини, де проходить переведення генетичної інформації, закодованої на матричному ланцюгу ДНК, у чергування амінокислотних залишків на структурі білкових молекул. Безпосереднім „перекладачем” (адаптором) генетичної інформації є різні види тРНК, за участю яких відбувається активація та транспорт до рибосом протейногенних

амінокислот з утворення пептидних зв'язків. Всі три види матричного синтезу: реплікація, транскрипція і трансляція, а також генетична рекомбінація лежать в основі експресії (прояву) генів хромосом. Потік генетичної інформації, який реалізується внаслідок поєднання всіх трьох видів матричного синтезу, має такий напрямок:



У клітинах про- та еукаріот цей потік реалізується по-різному. У прокариотичних клітинах процес транскрипції і трансляції не розділені у просторі та часі і можуть проходити одночасно, оскільки в них відсутнє обмежене мембраною ядро. У клітинах еукаріот реплікація, транскрипція та трансляція розділені у просторі і часі та відбуваються, відповідно, в ядрі та цитоплазмі (Рис. 15).

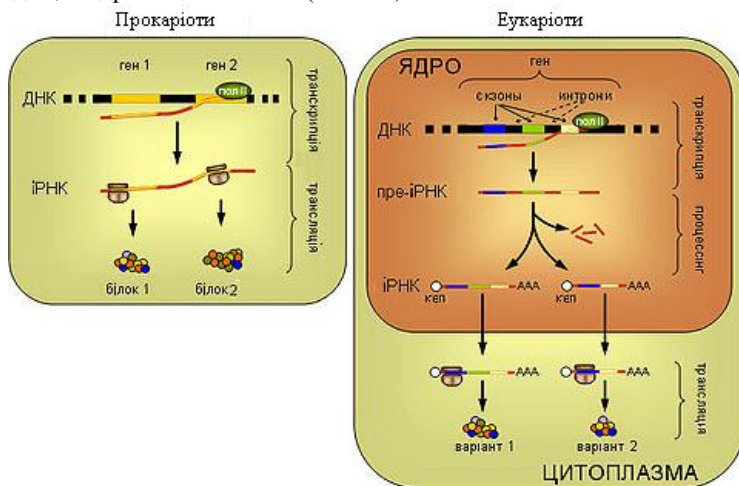


Рис. 15. Передача генетичної інформації у клітинах про- і еукаріот.

Таким чином, перший вид матричного синтезу (реплікація) забезпечує відтворення та збереження генетичної інформації закодованої на структурі геномних ДНК чи РНК. При транскрипції відбувається передача цієї інформації внаслідок утворення комплементарних копій певних ділянок кодуючого (+)-ланцюга ДНК. Третій вид матричного синтезу – трансляція, забезпечує реалізацію

генетичної інформації у клітині внаслідок синтезу видоспецифічних білків.

2. Загальні закономірності реплікації

Реплікація тісно пов'язана з поділом клітин (клітинним циклом). В еукаріотичних клітинах реплікація передує їх поділу і відбувається в S-фазі клітинного циклу, коли проходить *дезінтеграція гетерохроматину*, втрата ним конденсованої суперспіралізованої структури і формування активного розрихленого *еухроматину*. У прокаріот цей процес триває протягом всієї інтерфази.

Розрізняють кілька видів реплікації:

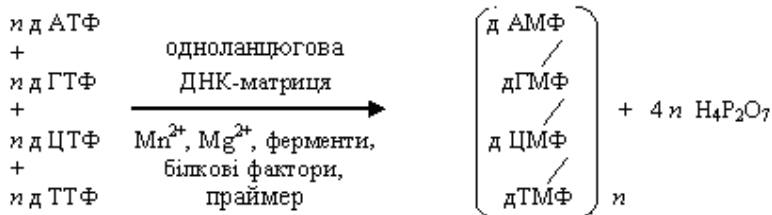
- вегетативну (під час поділу клітини);
- репаративну (при репарації ушкоджень);
- кон'югативну (при розмноженні бактеріальних клітин).

Внаслідок реплікації наступне покоління клітин отримує генетичну інформацію, закодовану в чергуванні триплетів в структурі ДНК.

Для вегетативної реплікації ДНК характерний *напівконсервативний механізм*, суть якого в тому, що кожне наступне покоління дочірніх молекул, яке отримало інформацію від вихідної (батьківської) молекули ДНК, містить у своєму складі елементи матриці. Тобто, в кожному наступному поколінні молекул один з ланцюгів (батьківський) отриманий від вихідної молекули ДНК, а другий (дочірній) є його комплементарною копією.

Вперше реплікацію було вивчено у клітинах прокаріот, однак пізніше було з'ясовано, що *загальні закономірності цього процесу є спільними для всіх живих організмів та неклітинних форм живого:*

- вихідними сполуками або субстратами для реплікації є дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфати аденіну, гуаніну, цитозину і тиміну, які за участю специфічних ферментів та білкових факторів сполучаються між собою і утворюють наступне покоління молекул. За цих умов, проходить утворення дезоксиполінуклеотидних ланцюгів (схема А. Коренберга):



- для перебігу реплікації необхідна наявність матриці – двох взаємокомплементарних ланцюгів ДНК, при розходженні яких утворюється дві одноланцюгові матриці;
- у процесі реплікації реалізується принцип комплементарності: до складу реплікованого ланцюга включаються дезоксирибонуклеозид-монофосфати, комплементарні до матричного ланцюга;
- матричний ланцюг ДНК реплікується в напрямку $3' \rightarrow 5'$, а синтезований комплементарний до нього має напрям $5' \rightarrow 3'$;
- реплікативна вилка, яка утворюється при розходженні ланцюгів може мати різну форму, що залежить від особливостей організації генетичного матеріалу у складі геному;
- реплікація асиметричний процес – один з ланцюгів ДНК реплікується в напрямку до реплікативної вилки (ведучий ланцюг), а інший – від реплікативної вилки (запізнюючий ланцюг), однак реплікація кожного з них проходить лише в напрямку $3' \rightarrow 5'$;
- ділянка ДНК, яка повністю самовідтворюється у процесі реплікації має назву *реплікону*. У клітинах прокариот реплікон є аналогом хромосоми і являє собою *монорепліконну* систему, а в еукариотичних клітинах кожна хромосома є *полірепліконною* системою;
- реплікон містить специфічні сигнали початку та закінчення реплікації (точки *ori* і *ter*);
- процес реплікації забезпечує складний реплікативний комплекс, який включає велику кількість факторів і має назву *реплісоми*.

Для перебігу реплікації необхідна наявність:

- 4 видів рибо- і дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатів (АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ та дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дУТФ) ;
- затравного ланцюга РНК-кової структури – *праймера (затравки)*, що зумовлено особливістю функціонування ферменту ДНК-залежної ДНК-полімерази III;
- білкових факторів, які забезпечують початок реплікації, формування дочірніх ланцюгів ДНК, завершення реплікації та постреплікативну модифікацію і репаративні процеси;
- комплексу ферментів, необхідних для перебігу реплікації: ініціації, елонгації, термінації;
- йонів Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , які виконують роль кофакторів ряду ферментів, забезпечують іонізацію азотистих основ нуклеотидів та утворюють реакційно здатні хелатні комплекси.

Білкові фактори необхідні для:

- пізнання сайту початку реплікації (точки *ori*) відповідними ферментами та зв'язування їх з ДНК;
- утворення реплікативної вилки з вивільненням одноланцюгових матриць;
- стабілізації утвореної структури;
- синтезу затравних ланцюгів на структурі матриці;
- перебігу полімеразної реакції;
- транслокації праймосоми в межах реплікону;
- енергозабезпечення процесу реплікації;
- завершення реплікації;
- поновлення структури матриці.

Вказані процеси забезпечують специфічні ДНК-розкручуючі, ДНК-зв'язуючі та ДНК-дестабілізуючі білки (топоізомерази, свівелази, хелікази, гірази), білки активатори праймази, β -білок, ρ -білок та інші.

Значна кількість білкових факторів задіяна також у завершенні реплікації та наступному поновленні спіралізованої структури ДНК.

Ферментні системи забезпечують:

- початок реплікації (ініціацію);
- синтез праймера на ведучому ланцюгу та фрагментів Оказакі на запізнюючому;
- перебіг полімеразної реакції – синтез ведучого і запізнюючого ланцюгів;
- вирізання РНК-ових фрагментів та забудову утворених прогалин;
- формування нативних дочірніх ланцюгів, комплементарних до матриці, завершення реплікації та репарацію можливих помилок реплікації.

Характерною особливістю ферментів реплікації є те, що вони мають олігомерну структуру і володіють кількома видами ферментативної активності.

Білкові фактори і ферменти реплікації входять до складу реплікативного комплексу, який забезпечує перебіг цього процесу на ведучому та запізнюючому ланцюгах.

Склад реплікативних комплексів та їх функції у клітинах про- і еукаріот подібні, хоч існують певні особливості, зумовлені організацією їх генетичних структур.

3. Реплікація в клітинах прокаріот

Цей процес у клітинах прокаріот має певні особливості, зумовлені тим, що їх геномна ДНК не асоційована з білками і має специфічну організацію у вигляді лінійних чи кільцевих одно- або дволанцюгових форм, які можуть знаходитися у спіралізованому стані (закручені самі на себе), без участі гістонових білків.

Специфічною особливістю реплікації в бактеріальних клітинах є те, що перед її початком проходить суперспіралізація ДНК, яка необхідна для перевірки цілісності сахарофосфатного остову ДНК, що є важливим для наступного перебігу реплікації. Крім того, в суперспіральній формі легше, ніж у кільцевій, розходяться комплементарні ланцюги ДНК та утворюється реплікативна вилка.

Ділянка реплікону прокаріот, на якій розпочинається реплікація, має назву *реплікона*, або точки огі (від англ. *origin* – початок). Реплікатор містить специфічне чергування нуклеотидів (ділянку багату АТ-парами), що полегшує розходження ланцюгів. Реплікація в клітинах прокаріот відбувається за участю білкових факторів і ферментів, що входять до складу реплікативного комплексу (Табл. 7).

Таблиця 7

Склад реплікативного комплексу клітин прокаріот

<i>Білкові фактори (активність, функції)</i>	<i>Ферменти (активність, функції)</i>
Dna A (АТФ-азна) розпізнавання сайту реплікації	ДНК-залежна ДНК полімераза I, (екзонуклеаза 5'→3' та 3'→5', 5'→3' полімеразна)
Dna B (хеліказна) утворення одноланцюгової ДНК-матриці	ДНК-залежна ДНК полімераза II, (3'→5' та 5'→3', екзонуклеаза) видалення праймерів
Dna C (лігазна) об'єднання факторів реплікації	ДНК-залежна ДНК полімераза III, (5'→3' - полімеразна, 3'→5' - екзонуклеаза) реплікація ДНК
Dna G (праймазна) синтез праймера	Праймаза (ДНК-залежна-РНК-полімеразна) синтез праймерів
β-білок, білки γ – комплексу (полімеразна) реплікація ведучого і запізнюючого ланцюгів	ДНК-ліаза (ліазна) видалення праймерів
білок η' (АТФ-азна) енергозабезпечення руху праймосоми	ДНК-лігаза (лігазна) зеднання мононуклеотидів після вирізання праймерів
білок τ забезпечує синхронність реплікації ведучого і запізнюючого ланцюга	АТФ-аза (АТФ-азна) гідроліз АТФ та енергозабезпечення процесу реплікації

Як видно з наведених даних, ферменти, що забезпечують реплікацію в клітинах прокариот мають певні особливості:

- ДНК-залежні ДНК-полімерази I, II і III складаються з кількох субодиниць та володіють кількома видами ферментативної активності;
- ДНК-залежна РНК-полімераза, або праймаза, у вигляді субстратів для синтезу використовує рибонуклеозид-5'-трифосфати, а як матрицю – один з ланцюгів ДНК і проводить синтез коротких затравних фрагментів з РНК-овою структурою (праймером);
- ДНК-лігази необхідні для з'єднання мононуклеотидів після вирізання праймерів та формування запізнюючого полінуклеотидного ланцюга;
- ДНК-ліази забезпечують видалення праймерів;
- АТФ-аза необхідна для вилучення енергії та забезпечення перебігу лігазної реакції.

Головним ферментом реплікації у клітинах прокариот є *ДНК-полімераза III*. Фермент має олігомерну природу і складається з 10 субодиниць (α , β , γ , δ , δ' , ϵ , θ , τ , χ , ψ). Для реплікації необхідна повна форма ферменту (холоензим), який містить набір всіх субодиниць.

Субодиниці ферменту утворюють два протомери, тобто фермент є димером, який фіксує комплекс інших полімераз на певній ділянці ДНК і запобігає їх дисоціації. Для ДНК-полімерази III характерні два види ферментативної активності: *5'→3'-полімеразна (проводить нарощування ланцюга, комплементарного до матриці 5'→3')* і *3'→5'-екзонуклеазна (корегує помилки реплікації)*. Для ДНК-полімерази II характерні два види ферментативної активності: *3'→5'- та 5'→3'-екзонуклеазна*. За участю цього ферменту проходить видалення праймерів з РНК-овою структурою на запізнюючому ланцюгу ДНК.

ДНК-полімераза I володіє трьома видами ферментативної активності: *5'→3'-екзонуклеазною (відщеплює нуклеотиди від 5'-кінця РНК-затравки кожного попереднього фрагменту Оказакі)*, *3'→5'-екзонуклеазною (корегує можливі помилки на подовженому фрагменті ДНК)* та *5'→3'-полімеразною (приєднує дезоксирибонуклеотиди до 3'-кінців фрагментів)*.

Для перебігу реплікації важливими є також білкові фактори, за участю яких проходять всі етапи реплікації: ініціація, елонгація та термінація.

- ініціаторний білок Dna A розпізнає сайт початку реплікації та сприяє об'єднанню решти білкових факторів, які приймають участь в ініціації реплікації, так званих, допоміжних білків;
- білок Dna B, для якого характерна хеліказна активність, приймає участь у розкручуванні хеліксу ДНК;

- білок Dna C забезпечує взаємодію праймази з матричним ланцюгом ДНК;
- білок Dna G необхідний для синтезу праймера на запізнюючому ланцюгу ДНК і відіграє важливу роль в ініціації реплікації;
- білок ρ володіє АТФ-азною активністю та постачає енергію для руху праймосоми;
- білки γ -комплексу необхідні для розпізнавання праймерів на матричних ланцюгах ДНК;
- білок τ забезпечує синхронність реплікації ведучого і запізнюючого ланцюга;
- β -білок стимулює активність білків γ -комплексу;
- tus -білок гальмує активність хелікази та зумовлює термінацію реплікації.

Реплікацію в клітинах прокариот можна розглянути на прикладі перебігу цього процесу в клітинах бактерії *E. coli*, геном якої являє собою дволанцюгову кільцеву молекулу ДНК. Реплікація включає: ініціацію, елонгацію та термінацію.

Ініціація реплікації. Суть процесу в *утворенні реплікативної вилки* та синтезі праймера. Оскільки для забезпечення напівконсервативного механізму реплікації ДНК необхідна наявність одноланцюгової матриці, важливою умовою початку ініціації є дестабілізація структури ДНК та розкручування хеліксу з утворенням реплікативної вилки.

У бактерії *E. coli* реплікація розпочинається із специфічного сайту початку реплікації – точки *oriC*. На репліконі хромосоми *E. coli* є одна ділянка початку реплікації (*oriC*), яка включає 258 нуклеотидних пар і містить специфічні чергування нуклеотидів, що зв'язують білкові фактори (Dna B, Dna C, Dna G), які забезпечують розкручування хеліксу ДНК та синтез праймера. Для них характерна хеліказна, топоізомеразна, гіразна, АТФ-азна та праймазна активність.

Праймери мають РНК-ову структуру, оскільки відбір рибонуклеозидтрифосфатів з середовища відбувається за участю ДНК-залежної РНК-полімерази (праймази). Праймери являють собою олігонуклеотидні фрагменти, які включають 8-10 нуклеотидів і містять на 3' кінці вільну ОН-групу.

Синтез праймерів каталізує мультиферментний комплекс – *праймосома*. Праймосома, у свою чергу, є компонентом складнішого комплексу – *реплісоми*, до складу якого входить цілий ряд ферментів та білкових факторів. За участю реплісоми проходить АТФ-залежне формування димерного комплексу холоферменту ДНК-полімерази III, зв'язаного з 3'-кінцями праймерів. Розпочинається синтез праймера із

приєднання ДНК-зв'язуючого білка до стартової точки ведучого полінуклеотидного ланцюга матриці. Далі, за участю праймази, синтезується затравний ланцюг РНК-ової структури, який комплементарний до матриці ДНК. Після закінчення синтезу на ведучому ланцюгу, праймосома приєднується до ланцюга, що запізнюється та за участю β -білка ініціює синтез на ньому не одного, а кількох праймерів. Праймосома рухається по цьому ланцюгу від реплікативної вилки, протилежно до ведучого ланцюга ДНК, однак в напрямку $3' \rightarrow 5'$. Враховуючи це, β -білок називають мобільним промоутором реплікації. Енергія для руху праймосоми забезпечується АТФ-азною активністю білка p' .

Тобто синтез праймера (затравного ланцюга з РНК-ковою структурою) проходить як на ведучому, так і на запізнюючому ланцюгах. Для кільцевих молекул ДНК прокаріот характерна двоспрямована реплікація: реплікативні вилки від точки огі рухаються у двох напрямках. За участю хеліказної і праймазної активності білкових факторів проходить їх спржене функціонування: хелікази розплітають дуплекс ДНК, а праймази забезпечують синтез праймерів (Рис. 16).



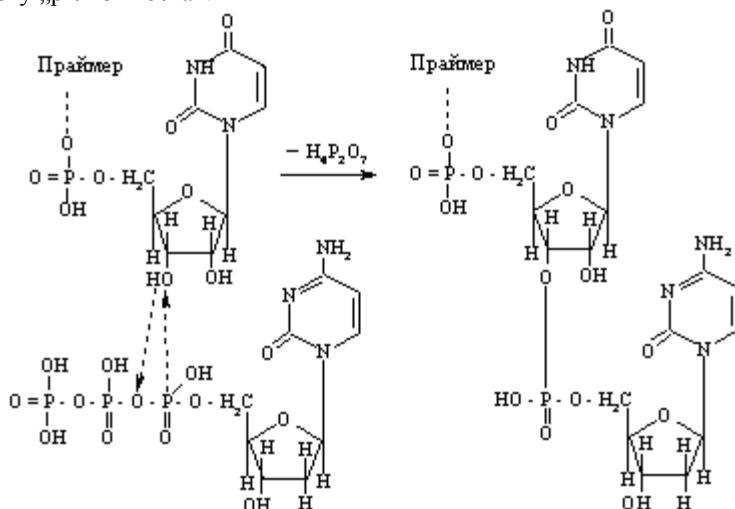
Рис. 16. Ініціація реплікації.

Необхідність такого механізму ініціації зумовлена тим, що ДНК-полімераза III не може самостійно розпочати синтез ДНК на структурі матриці з використанням вільних нуклеозид-5'-трифосфатів. Тому для початку синтезу ДНК (ініціації дії ДНК-полімерази III) необхідна затравка, яка б містила вільну 3'-ОН-групу, за допомогою якої може відбуватися полімеразна реакція – подовження полінуклеотидного ланцюга ДНК (“ріст з хвоста”).

Елонгація реплікації. Включає процеси подовження полінуклеотидних ланцюгів ДНК та сполучення синтезованих фрагментів з утворенням комплементарних копій (дочірніх ланцюгів). У цьому процесі задіяний реплікативний комплекс, до складу якого входить ДНК-залежна-ДНК-полімераза III, β -білок і білки γ -комплексу, необхідні для розпізнавання праймерів на матричних ланцюгах ДНК.

Білки γ -комплексу зв'язуються з єдиним праймером на ведучому ланцюгу, а також з кожним із праймерів на запізнюючому. Далі, за участю β -білка, до праймерів приєднується ДНК-залежна ДНК-полімераза III. Димер β -білка утворює кільце навколо ланцюгів ДНК, що реплікуються, і стимулює АТФ-азну активність білків γ -комплексу. Це зумовлює доступність 3'-кінця праймера для ферменту ДНК-полімерази III.

Білки γ -комплексу та β -білок, як правило, зв'язані з системою праймер – матриця, що сприяє перебігу реплікації за участю ДНК-залежної ДНК-полімерази III, для якої характерна ДНК-полімеразна та нуклеотидилтрансферазна активність. Тобто, ДНК-полімераза III активує два субстрати: з'єднаний за принципом комплементарності з матрицею кінець затравки, яка містить вільну 3'-ОН-групу рибози, та дезоксирибонуклеозид-5-трифосфати (дНТФ), що надходять з середовища. За участю ферменту проходить нуклеофільна атака α -фосфату дезоксирибонуклеозидтрифосфату 3'-ОН-групою, яка міститься на кінці затравки, внаслідок чого дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфат приєднується до атома Оксигену гідроксильної групи в 3'-положенні. Результатом цього є утворення 5'→3'-фосфодієфірного зв'язку та вивільнення пірофосфату. Продукт реакції містить вільну 3'-ОН-групу, по якій знову повторюється полімеразна реакція, що дістала назву „ріст з хвоста”:

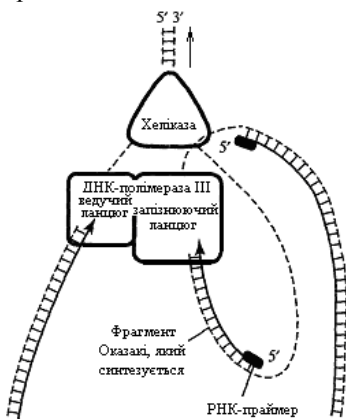


У результаті багаторазового повторення цієї реакції відбувається поступове комплементарне нарощування дочірнього ланцюга.

Дослідженнями японського вченого Р. Оказакі (1968 р.) встановлено, що реплікація запізнюючого ланцюга відбувається не безперервно, як ведучого, а фрагментарно, оскільки на цьому ланцюгу ініціюється синтез не одного праймера, а їх великої кількості, внаслідок подовження яких по 3'-ОН-групи утворюються фрагменти, які дістали назву "фрагментів Оказакі". Чергування дезоксирибонуклеотидів на синтезованих фрагментах комплементарні до відповідної ділянки матричного ланцюга.

Поступове нарощування фрагментів Оказакі ферментом ДНК-залежною-ДНК-полімеразою триває доки не досягне місця локалізації наступної затравки, з якої розпочинається ріст нового фрагменту. Ведучий і запізнюючий ланцюги ДНК реплікуються синхронно завдяки участі в цьому процесі димерного ДНК-полімеразного комплексу.

Утворення цього комплексу відбувається за участю білка τ (однієї з субодиниць олігомерного комплексу ДНК-полімерази III). На структурі реплікативної вилки один і той же димерний комплекс проводить як високопроцесивний безперервний синтез ведучого ланцюга, так і фрагментарний синтез запізнюючого:



Мірою процесивності є довжина фрагменту, який синтезується в одному циклі реплікації без від'єднання димера від матриці. Для з'єднання фрагментів Оказакі необхідне видалення праймерів з РНК-овою структурою. Це відбувається внаслідок дії специфічної нуклеази (Н-РНК-ази), або 5'→3'-екзонуклеазної активності ДНК-полімерази I. Після видалення рибонуклеотидів праймера проходить їх заміна на відповідні дезоксирибонуклеотиди. Далі, кінці прогалин, за участю ферменту ДНК-лігази, з'єднуються між собою, внаслідок чого формується суцільний запізнюючий дочірній ланцюг ДНК. Репліковані

ланцюги утворюють дві дочірні молекули ДНК, кожна з яких містить один батьківський та один дочірній ланцюги і є точною копією вихідної молекули (Рис. 17).

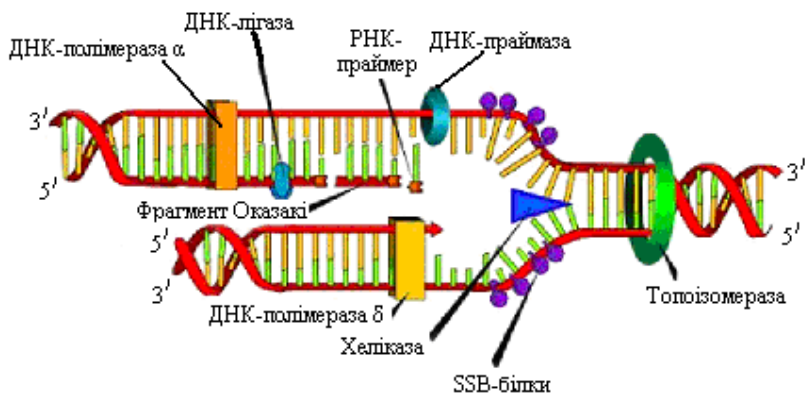


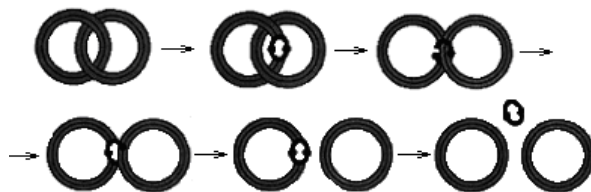
Рис. 17. Формування комплементарних дочірніх ланцюгів на структурі матриці.

Термінація реплікації. Механізм термінації реплікації, або завершення синтезу ДНК, має свої особливості. В геномі деяких бактерій термінація відбувається за участю специфічного термінатора, в інших геномах такий термінатор відсутній. Тому припускають, що реплікація у прокаріот завершується після того, як вичерпується матриця (у бактерій, які містять лінійні дволанцюгові ДНК) або коли при подвоєнні кільцевих молекул ДНК зустрічаються дві реплікативні вилки. Закінчення процесу реплікації у клітинах бактерії *E. coli* відбувається на сайті *ter*, розміщеному на протилежній до точки огі ділянці кільцевої молекули.

На структурі хромосоми *E. coli* міститься 6 *ter*-сайтів. Вважають, що специфічний білок *tus* зв'язується з *ter*-сайтами і припиняє дію хелікази (білка *Dna B*). Синтез ведучого ланцюга завершується на першому нуклеотиді, розміщеному біля місця зв'язування цього білка. Сайти термінації спрацьовують лише в одному напрямку. Для кожного циклу реплікації використовується лише один сайт термінації. Реплікативна вилка, яка зупиняється на цьому сайті, зустрічається з іншою, що наближається з протилежного кінця.

Внаслідок росту ведучого і запізнюючого ланцюгів вздовж кільцевої матриці проходить зближення 3'- і 5'-кінців одного ланцюга або в точці початку реплікації (при однонаправленій реплікації), або посередині кільця (при двонаправленій реплікації). В цьому випадку,

кільця зв'язуються ДНК-лігазою, внаслідок чого утворюються дві зчеплені одна з одною кільцеві молекули ДНК – *катенани* – циклічні структури, об'єднані між собою подібно до окремих ланок у ланцюгу. Утворені катенани за участю ферменту топоізомерази IV розділяються, внаслідок тимчасового дволанцюгового розриву, результатом чого є утворення двох дочірніх дволанцюгових кільцевих молекул ДНК та повне розділення утворених бактеріальних хромосом до початку поділу клітини:



Реплікація проходить з високою точністю та швидкістю: 1-2 тис. нуклеотидів за секунду у прокаріот і близько 100 нуклеотидів у еукаріот (на 10^{10} пар нуклеотидів трапляється лише одна помилка).

4. Реплікація ДНК бактеріальних плазмід

Для реплікації ДНК бактеріальних плазмід характерні специфічні риси, оскільки, в переважній більшості, цей процес відбувається за участю реплікативного апарату клітини-хазяїна, хоч і не завжди узгоджено з реплікацією бактеріальної хромосоми. Кожна плазміда являє собою окремий реплікон, що включає один або кілька *реплікативних модулів*, які містять точки *ori* і *ter* та певні регуляторні ділянки, що дає змогу автономно реплікуватися та контролювати власну реплікацію.

Якщо реплікація регулюється узгоджено з реплікацією бактеріального геному, то має місце *реплікація із строгим контролем*. При наявності у клітині більшої кількості плазмід (10-30) та відсутності такої узгодженості, має місце *реплікація із ослабленим контролем*.

Специфічні риси має реплікація плазміди Col E1, для якої характерна односпрямована реплікація. Геном плазміди, як правило, не кодує жодного ферменту, необхідного для перебігу цього процесу. Сайт початку реплікації містить дві промоуторні ділянки, на одній з яких проходить синтез РНК-праймера, необхідного для ініціації реплікації. Довжина праймера залежить від типу плазміди, що реплікується, тому після синтезу вона зазнає специфічного процесінгу за участю РНК-ази H.

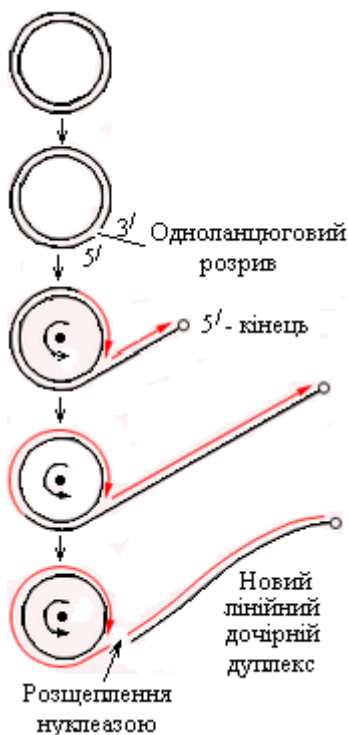
Зріла молекула праймера містить близько 500 нуклеотидів і використовується ДНК-полімеразою I для синтезу ведучого ланцюга. У вигляді затравки може бути використаний 3'-кінець праймера, однак за цих умов реплікація буде відбуватися менш ефективно.

В інфікованих плазмідами бактеріях часто формується декілька репліконів, локалізованих на молекулі ДНК. Така модель реплікації ДНК дістала назву „кільця, що котиться”:

Суть цього процесу в тому, що в одному з ланцюгів дволанцюгової кільцевої молекули ДНК з'являється одноланцюговий розрив і його 5'-кінець фіксується на цитоплазматичній мембрані. Далі проходить напівконсервативна реплікація під час якої другий ланцюг зберігає кільцеву форму: він ніби котиться і являє собою безкінечну матрицю.

Якщо реплікація завершується в тій же точці, звідки вона розпочалася, то формується геном мономер, а якщо кільце рухається далі, то утворюються олігомерні геноми, які внаслідок рекомбінації можуть мономеризуватися і перетворюватися в кільцеві форми. Такий механізм реплікації характерний також для бактеріофагів T4 і λ .

У клітинах еукаріот за участю подібного механізму відбувається ампліфікація – вибіркова багатократна реплікація генів, що кодують рРНК.



ТЕМА: ОСОБЛИВОСТІ РЕПЛІКАЦІЇ ДНК У КЛІТИНАХ ЕУКАРІОТ ТА У ГЕНОМАХ ВІРУСІВ

План

1. Реплікація ДНК у клітинах еукаріот.
2. Постреплікативна модифікація ДНК.
3. Механізми реплікації вірусних геномів.
 - 3.1. Реплікація РНК-геномних вірусів (РНК-залежний синтез РНК).
 - 3.2. Реплікація ДНК-геномних вірусів.

Основна література: [1, с. 253-294]; [2, с. 204-232]; [3, с. 13-26].

Додаткова література: [1]; [2]; [3]; [4]; [17]; [22].

1. Реплікація ДНК у клітинах еукаріот

Основні риси реплікації у клітинах про- і еукаріот подібні: це стосується механізму ініціації, фрагментарного синтезу на запізнюючому ланцюгу, РНК-праймерного початку реплікації. Різниця стосується, як правило, складу ферментних систем, білкових факторів, що забезпечують перебіг цього процесу та окремих механізмів його регуляції.

Реплікативна вилка в клітинах еукаріот також асиметрична і має Y-подібну форму, тому реплікація ДНК одного ланцюга дещо випереджає реплікацію іншого. Перший ланцюг, який рухається до реплікативної вилки, має назву ведучого, а другий – запізнюючого. Ведучий і запізнюючий ланцюги реплікуються в напрямку $3' \rightarrow 5'$.

Перебіг реплікації у клітинах еукаріот відбувається за участю ферментів і білкових факторів.

• **Ферменти реплікації – ДНК-залежні ДНК-полімерази α , β , γ , δ , ϵ і ζ** утворюють мультиферментний реплікативний комплекс у складі якого кожен з них виконує специфічні функції:

• α , σ і ϵ (реплікативні ДНК-полімерази) забезпечують синтез ведучого і запізнюючого ланцюгів;

• ДНК-полімераза β необхідна для репарації помилок реплікації;

• ζ -полімераза проводить SOS-репарацію;

• γ -полімераза забезпечує реплікацію мітохондріальної ДНК.

Тобто, функції окремих компонентів реплікативного комплексу різні.

Тобто, для кожного із вказаних компонентів мультиферментного комплексу характерна специфічна ферментативна активність.

Білкові фактори та ферменти реплікації клітин еукаріот

<i>Ферменти (активність, функції)</i>	<i>Білкові фактори (активність функції)</i>
ДНК-полімераза α (полімеразна) синтез праймерів на ланцюгах ДНК, приєднання праймази	PCNA (лігазна) білок утворення комплексу з ДНК-полімеразою σ , фактор процесивності
ДНК-полімераза β (полімеразна) процесінг фрагментів Оказакі	RFC (полімеразна) реплікативний фактор, активація ферменту ДНК-полімерази 2
ДНК-полімераза σ (полімеразна, 3'→5'-екзонуклеазна) синтез ведучого ланцюга	білок FEN1 (лігазна) фактор дозрівання, видалення праймерів
ДНК-полімераза γ (3'→5'-екзонуклеазна, полімеразна) реплікація і репарація мітохондріальної ДНК	MF1 (лігазна) видалення праймерів
ДНК-полімераза ϵ (полімеразна) синтез запізнюючого ланцюга	білок Rev 3 (лігазна) фактор репарації, репарація помилок реплікації
ДНК-полімераза ζ (полімеразна) SOS-репарація	білок Rev 7 (лігазна) фактор репарації
ДНК-лігаза S (лігазна) з'єднання фрагментів Оказакі	
РНК-аза H1 (лігазна) видалення праймерів	

В активних центрах ДНК- і РНК-полімераз містяться йони Zn^{2+} , та Mg^{2+} , які з іонізованими функціональними групами азотистих основ нуклеотидів утворюють функціонально-активні хелатні комплекси.

- **Білкові фактори реплікативного комплексу** клітин еукаріот також виконують специфічні функції. Зокрема, білок PCNA (фактор процесивності реплікації) і RFC (фактор реплікації C) утворюють стабільний комплекс з ДНК-полімеразою δ і стимулюють активність ДНК-полімерази ϵ . При реплікації у клітинах еукаріот вони виконують роль, подібну до β -білка і білків γ -комплексу E. coli. – забезпечують реплікацію ведучого та запізнюючого ланцюгів ДНК. Білок FEN1 та MF1 (фактори дозрівання) володіють 5' → 3'-екзонуклеазною активністю і разом з РНК-азою H1 видаляють праймери на дочірніх ланцюгах ДНК. Білки Rev3 і Rev7 необхідні для репарації помилок реплікації (Табл. 8).

Реплікація у клітинах еукаріот, як і у прокариот, також включає: ініціацію, елонгацію і термінацію. Ці процеси відбуваються подібно до відповідних етапів реплікації у клітинах прокариот.

Одночасно з цим, реплікація у клітинах еукаріот має і певні специфічні риси:

- для вищих організмів характерний складніший механізм ініціації: множинність репліконів, *жорсткий порядок включення їх протягом S-фази клітинного циклу – на початку, посередині і наприкінці*, часова узгодженість наступних актів лігування ДНК по фланкуючих реплікони кінцях, складний зв'язок реплісом з ядерним матриксом та своєрідний механізм реплікації теломерних ділянок еукаріотичних хромосом;

- реплікація ДНК в клітинах еукаріот відбувається лише в S-фазі клітинного циклу і проходить на специфічних структурах, асоційованих з дифузним ядерним матриксом. В їх складі виявлено *синтесоми*, які включають більше 30 білкових факторів (мультибілковий 21S комплекс);

- кластери реплікативних вилок активуються одночасно в усіх хромосомах;

- самостійні одиниці реплікації ДНК мають назву *репліконів*. Їх реплікація проходить незалежно один від одного;

- ДНК еукаріот являє собою полірепліконну систему, що містить велику кількість репліконів, з середини яких у двох напрямках рухаються реплікативні вилки;

- реплікативні вилки на структурі ДНК зосереджені нерівномірно: на одних ділянках міститься їх велика кількість, а на інших вони менш чисельні. На хромосомах еукаріот реплікативні вилки згруповані у специфічні реплікативні одиниці, які можуть включати від 20 до 80 сайтів початку реплікації;

- утворення нових реплікативних вилок проходить поступово під час S-фази клітинного циклу до того часу, доки не завершиться реплікація всієї хромосомної ДНК;

- реплікативні вилки рухаються із швидкістю 100 нуклеотидів за секунду. Тобто в 10 разів повільніше, ніж у прокаріот, що, очевидно, зумовлене суперспіралізацією хроматину;

- сайти початку і закінчення реплікації локалізовані на певних ділянках геному, які містять специфічні чергування нуклеотидів;

- відстань між точками оґі приблизно дорівнює відстані між сусідніми доменними структурами хроматину. На кожній доменній структурі є лише один сайт початку реплікації;

- на структурі хромосом еукаріот утворюється велика кількість стартових точок реплікації оґі (оріджинів) – від 10 до 100 тисяч, розмічених на певних ділянках полінуклеотидного ланцюга ДНК;

- синтез ведучого і запізнюючого ланцюга каталізують різні ДНК-полімерази, відповідно α і δ , тоді як у прокаріотичних клітинах, зокрема, у клітинах бактерії *E. coli* обидва ланцюги синтезуються за участю димерів ДНК-полімерази III;

- у клітинах еукаріот ДНК-полімераза α забезпечує ініціацію реплікації на ведучому ланцюгу в точках початку реплікації, а ДНК-полімераза δ – циклічну реініціацію синтезу фрагментів Оказакі на запізнюючому;

- видалення праймерів з РНК-овою структурою у клітинах еукаріот відбувається за участю $5' \rightarrow 3'$ -екзонуклеази і РНК-ази H, а з'єднання кінців, забудованих прогалин, – за участю ДНК-лігازی I;

- реплікація у клітинах еукаріот відбувається за принципом „все або нічого” тобто, якщо процес розпочався в S-фазі, він продовжується до повного його завершення. Такий перебіг реплікації реалізується внаслідок специфічного пізнання певних ділянок хромосом, деконденсації їх, що створює рівні умови для пізнання сайтів реплікації за участю специфічних білкових факторів. Це, у свою чергу, ініціює зміну структури решти хроматину та сприяє перебігу реплікації на інших ділянках хроматину.

2. Постреплікативна модифікація ДНК

Після реплікації молекули ДНК зазнають специфічної постреплікативної модифікації, яка є необхідною умовою функціонування їх у клітинах.

Одним з важливих механізмів постреплікативної модифікації ДНК є метилювання азотистих основ нуклеотидів. Цей процес відбувається відразу по закінченню реплікації, або через певний проміжок часу після її завершення, за участю ферментів метилаз, які функціонують в ядрі та мітохондріях. Кофактором цих ферментів є S-аденозилметіонін. Метилюються не всі азотисті основи нуклеотидів, а переважно залишки цитозину (близько 5%).

Метилювані залишки розміщені на структурі ДНК нерівномірно. Вони локалізовані лише на окремих локусах – промоторних ділянках та в центромерному гетерохроматині еукаріот, а також на спейсерних послідовностях у прокаріот. Відомо, що в комплементарних парах азотистих основ нуклеотидів зв'язок між АТ-парами міцніший, ніж між АУ: додаткова метильна група тиміну посилює гідрофобні властивості азотистої основи і, разом з наявністю дезоксирибози, сприяє формуванню дволанцюгової молекули ДНК. Метилювання цитозину в C_5 -положенні піримідинового циклу виявляє подібний ефект: стабілізує і зміцнює зв'язки між ГЦ-парами та з'єднує

ланцюги ДНК на певних локусах. Під час старіння клітин знижується як активність метилаз, так і кількість 5-метилцитозину в структурі ДНК, що, очевидно, є одним з проявів старіння клітин на рівні геному.

Одночасно з цим, у пухлинних клітинах активність ДНК-метилаз підвищується, внаслідок чого зростає вміст 5-метилцитозину. Цей ефект спостерігається в іморталізованих клітинах як *in vivo*, так і *in vitro*. Підвищення рівня 5-метилцитозину є необхідною, однак не єдиною причиною пухлинного росту.

Метилування цитозину, очевидно, забезпечує регуляцію активності генів, оскільки існує позитивна кореляція між функціональною активністю клітин і вмістом 5-метилцитозину. Непрямим доказом цього є також те, що інтенсивно метилуються переважно промоуторні ділянки генів, яким належить важлива роль у регуляції транскрипції та синтезі генних продуктів. Ще одним важливим наслідком метилування ДНК є те, що посилення цього процесу на центромерних ділянках запобігає передчасній їх реплікації, яка повинна проходити не в S-фазі хромосом, а перед розходженням хроматид – в анафазі.

На відміну від клітин еукаріот, роль метилування азотистих основ ДНК у прокаріот була з'ясована значно пізніше. Виявилося, що бактеріальні ДНК-метилази, переважно, входять до складу системи модифікації і рестрикції. Крім ДНК-метилаз ця система включає і ендонуклеази (рестриктази), здатні вирізати певні чергування нуклеотидів.

Метилування сайтів на структурі ДНК запобігає дії ферментів рестриктаз з тією ж сайт-специфічністю. У зв'язку з цим, метильована молекула ДНК бактеріальних клітин не руйнується рестриктазами, на відміну від чужерідної ДНК, яка проникає у клітину. В цьому випадку система рестрикції і модифікації захищає бактеріальні клітини від вірусів та бактеріофагів.

У клітинах про- і еукаріот присутній також інший вид метилування, пов'язаний з репарацією помилок реплікації. Роль акцептора метильної групи, в цьому випадку, в структурі ДНК бактерій виконує аденін, а в еукаріотичних клітинах – гуанін. Метильовані азотисті основи нуклеотидів (6-N-метиладенін і 6-O-метилгуанін) є специфічними мітками на батьківському ланцюгу ДНК, які пізнають системи репарації та забезпечують корегування помилок реплікації.

3. Механізми реплікації вірусних геномів

3.1. Реплікація РНК-геномних вірусів (РНК-залежний синтез РНК)

Цей процес у РНК-геномних вірусів подібний до механізму РНК-полімеразної реакції. У вигляді субстратів для реплікації використовуються рибонуклеозидтрифосфати. Ланцюг, що синтезується, є антипаралельним і комплементарним до матричного, напрямком реплікації $3' \rightarrow 5'$. Залежно від виду РНК, що входить до складу геному різних вірусів, їх реплікація має певні особливості.

Реплікація (+) РНК-геномних вірусів. Геномна РНК цих вірусів не асоційована з білками, у зв'язку з чим, після проникнення у клітину, вірус втрачає білкову оболонку і його РНК стає доступною для зв'язування з рибосомами клітини-хазяїна. Тобто, генома (+) РНК, може безпосередньо використовуватися у процесі трансляції у вигляді іРНК. За цих умов, проходить синтез поліпептидних ланцюгів семи вірусних білків, шість з яких включається до нових вірусних часточок, а сьомий – виконує роль РНК-реплікази, яка в них відсутня. Враховуючи це, реплікація вірусної РНК в інфікованій клітині може розпочинатись лише після її трансляції та синтезу необхідного ферменту.

Реплікація вірусної РНК відбувається у два етапи: на першому (+) РНК виконує роль матриці, на якій синтезується (-) ланцюг РНК, а на другому – (-) ланцюг виконує роль матриці для синтезу (+) ланцюга РНК, ідентичного до вихідної вірусної РНК. В цьому процесі задіяні ферменти реплікації клітини-хазяїна. Утворений (+) ланцюг РНК може використовуватися для трансляції в ролі іРНК, а також для реплікації (утворення нових ланцюгів РНК) та формування нових вірусних часточок. Такий механізм відтворення геному характерний для вірусу поліомієліту, енцефаліту та вірусу тютюнової мозаїки.

Реплікація (-) РНК-геномних вірусів. У цих вірусів реплікація проходить по-іншому, оскільки (-) РНК не може виконувати роль безпосередньої матриці у процесі трансляції. Дві РНК-синтетази та (-) РНК та входять до складу нуклеокапсиду. Після проникнення в інфіковану клітину один з цих ферментів забезпечує транскрипцію (-) РНК, внаслідок чого утворюються вірусні пре-іРНК, які далі зазнають процесінгу (приєднується „кеп” та поліА-фрагменти). Після цього іРНК звільняються з нуклеокапсиду і зв'язуються з рибосомами клітини-хазяїна. Друга РНК-синтетаза забезпечує реплікацію, яка проходить у два етапи: синтез на (-) ланцюгу РНК (+) ланцюга та утворення на ньому, як на матриці, (-) ланцюга РНК. Синтезовані

ланцюги РНК утворюють комплекси з вірусними білками, внаслідок чого формуються нові нуклеокапсиди.

Тобто, в цієї групи вірусів геномна РНК кодує лише комплементарний (+) ланцюг, який і є носієм генетичної інформації. На цьому ланцюгу містяться також чергування нуклеотидів, які кодують вірусну репліказу та білки оболонки вірусу. У зв'язку з цим, геномна РНК не може індукувати розмноження вірусу без наявності необхідного для цього ферменту реплікази, який кодується комплементарним до неї ланцюгом. Такий перебіг реплікації характерний для параміксовірусів, вірусів грипу та сказу.

Реплікація (\pm) РНК-геномних вірусів. Цей процес має багато спільного з реплікацією дволанцюгової ДНК, однак проходить за участю ферменту РНК-синтетази. Спочатку, внаслідок транскрипції (-) ланцюгів на (\pm) РНК за участю вказаного ферменту утворюються (+) ланцюги РНК, які далі використовуються в ролі матриці для синтезу вірусних білків. Роль матриці для синтезу дволанцюгових (\pm) РНК виконують обидва ланцюги вірусної РНК. Для перебігу реплікації необхідна наявність усіх 4 видів рибонуклеозидтрифосфатів, РНК-матриці, йонів Mg^{2+} , ферментів реплікації.

Таким чином, як видно із наведених вище схем щодо механізмів реплікації вірусів з РНК-геномами негативної і позитивної полярності, основна відмінність між цими процесами в тому, що віруси з негативними геномами перед початком синтезу вірусних білків синтезують позитивний ланцюг РНК. Цей процес забезпечується наявністю у складі капсиду РНК-вірусу ферменту РНК-залежної РНК-полімерази, який відсутній в інфікованих вірусом клітинах. У (+)-РНК-геномних вірусів їх РНК може безпосередньо виконувати роль матриці для трансляції білків.

Реплікація вірусних РНК може пригнічуватися актиноміцином Д, на відміну від синтезу РНК клітини-хазяїна, що вказує на те, що цей процес незалежний від геному ДНК клітини. Оскільки синтез клітинних і вірусних РНК відбувається за принципово різними механізмами, це створює можливість для пошуків специфічних інгібіторів синтезу вірусних РНК, що є важливою умовою в боротьбі з вірусними захворюваннями.

3.2. Реплікація ДНК-геномних вірусів

Залежно від організації геномної ДНК вірусів (одно- чи дволанцюгової, кільцевої чи лінійної) та форми реплікативної вилки, яка може нагадувати окремі літери грецького алфавіту, розрізняють кілька видів реплікації: Υ (ігрек), δ (сигма) і θ (тета). Крім того, за

напрямок руху реплікативної вилки від початкової точки *ori C* у вірусів розрізняють одно- та двоспрямовану реплікацію.

Υ-тип реплікації у вірусів подібний до цього процесу в про- та еукаріот. Він характерний для вірусів, які у складі геному містять лінійну дволанцюгову ДНК. Реплікація таких молекул ДНК розпочинається в точці *ori C* і реплікується як єдине ціле, тобто ДНК цих вірусів являє собою монорепліконну систему.

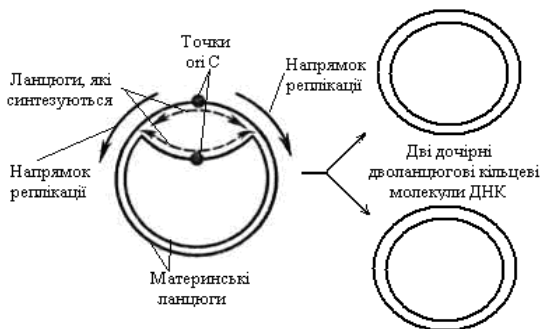
Реплікативна вилка, яка утворюється за участю специфічних білкових факторів, від точки *ori C* може рухатись в одному чи двох напрямках. При двоспрямованій реплікації від точки *ori C* реплікативні вилки рухаються у двох напрямках, внаслідок чого на структурі ДНК утворюється реплікативне „вічко”, яке розширюється, доки не вичерпається реплікон.

Реплікація ланцюгів ДНК проходить в напрямку $3' \rightarrow 5'$, а синтезовані комплементарні ланцюги мають напрямок $5' \rightarrow 3'$. Реплікативна вилка асиметрична: один (ведучий) ланцюг реплікується до реплікативної вилки безперервно, а другий (запізнюючий) – від реплікативної вилки фрагментарно. Після закінчення реплікації утворюються дві дочірні дволанцюгові лінійні молекули, які є точною копією вихідної молекули ДНК:

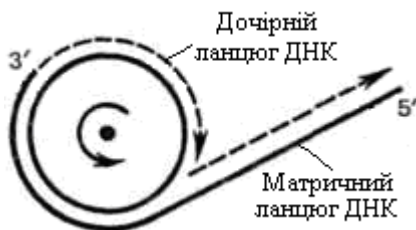


(θ)-тип реплікації характерний для кільцевих дволанцюгових молекул ДНК, які входять до складу геному бактеріофага λ . Реплікація розпочинається в точці *ori C* і може проходити в одному чи двох напрямках.

При двоспрямованій реплікації цей процес проходить у протилежних напрямках від точки *ori C* до зустрічі двох реплікативних вилок, внаслідок чого утворюється структура, що нагадує грецьку літеру тета (θ). Результатом θ -реплікації є утворення двох ідентичних копій вихідної молекули ДНК:



Для деяких вірусів характерний механізм реплікації, який передбачає розрив одного з ланцюгів дволанцюгової кільцевої молекули ДНК. Утворений вільний 3'-кінець нарощується і залишається зв'язаним з матрицею, а 5'-кінець поступово витісняється новим синтезованим полінуклеотидним ланцюгом. За цих умов, один ланцюг ДНК нарощується внаслідок руху реплікативної вилки навколо кільцевого матричного ланцюга. Внаслідок нарощування цього ланцюга, витіснений ланцюг із звільненим 5'-кінцем виконує роль лінійної матриці, на якій синтезується комплементарний. Цей процес продовжується доки не утвориться дочірній ланцюг ДНК, внаслідок одного обороту кільцевої матриці (реплікону). Такий механізм реплікації отримав назву *сігма-типу* (*δ-типу*). Він характерний також для нижчих організмів, у процесі життєвого циклу яких проходить перетворення кільцевих молекул ДНК у лінійні:



Сігма-тип реплікації характерний також для бактеріофага фХ-174, геном якого представлений одноланцюговою кільцевою молекулою ДНК. Сігма-реплікація відбувається за консервативним механізмом, який не характерний для інших організмів.

ТЕМА: ЗАХИСТ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ ТА ПІДТРИМАННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ГЕНОМУ

План

1. Безреплікативна репарація. Супресії.
2. Пряма безреплікативна репарація ушкоджень ДНК (реактивація).
3. Постреплікативна репарація ДНК (репарація помилок реплікації).
4. Захист геному від чужорідного генетичного матеріалу.
5. Пригнічення відтворення у клітині чужорідного генетичного матеріалу.
6. Пригнічення експресії інтегрованого чужорідного геному.
7. Молекулярні механізми апоптозу.

Основна література: [1, с. 295-316]; [2, с. 329-350]; [3, с. 27-84; 443-500].

Додаткова література: [1]; [2]; [3]; [12]; [16]; [19]; [24].

Усталені поняття про стабільність геномів було спростовано в 70-х роках минулого століття після відкриття мігруючих генетичних структур: IS-елементів та транспозонів у геномах прокаріот і мобільно-диспергованих генів в еукаріотичних геномах (явище „дрейфу” генів). З мігруючими генетичними елементами пов’язували появу певного типу мутацій, які можуть виявляти специфічний вплив на структуру і функції геному.

Крім того, було встановлено, що геноми клітин живих організмів які, в переважній більшості, представлені молекулами ДНК різної форми та розмірів, є надзвичайно вразливі і чутливі до дії ушкоджуючих чинників хімічної, фізичної чи біологічної природи. Під їх впливом на різних ділянках геному можуть з’являтися структурно-функціональні зміни, які виявляють негативну дію на процеси експресії генів та прояви специфічних фенотипових ознак організму. Окрім того, порушення функціонування генетичних структур клітини може стати причиною розвитку різних патологічних станів, аутоімунних захворювань, передчасного старіння та зумовити онкотрансформацію клітин організму. Враховуючи це, у процесі тривалої еволюції живих організмів повинні були сформуватися специфічні молекулярні механізми, які забезпечували підтримання стабільності геному, поновлення нативної структури носія генетичної інформації та корегування можливих помилок, зумовлених негативним впливом мутагенних факторів.

Вказані механізми найкраще вивчено у клітинах прокаріот, в першу чергу, у клітинах бактерії *E. coli*. Одночасно з цим, деякі з них функціонують і у клітинах вищих організмів, хоч можуть мати певні особливості, зумовлені структурною організацією їх геному. Захисні механізми, що постійно функціонують у клітинах, отримали назву *конститутивних*, функціонування інших включається в екстремальних ситуаціях, коли з'являється реальна небезпека, яка загрожує життєдіяльності організму.

Як правило, серед *конститутивних механізмів самозахисту та підтримання стабільності геному розрізняють:*

- супресію (виправлення помилок, зумовлених порушенням генетичного коду);
- пряму, безреплікативну репарацію ушкоджень ДНК (реактивацію);
- модифікацію і рестрикцію;
- пригнічення у клітині функціонування чужорідного геному;
- гальмування експресії чужорідної генетичної інформації.

1. Безреплікативна репарація. Супресії

Супресії – це вид безреплікативної репарації, свого роду, „зворотні” мутації, які поновлюють структуру генів, порушену внаслідок негативного впливу мутагенів, що зумовлює появу в структурі ДНК точкових мутацій (делецій чи інсерцій). Тобто, супресії, по суті, забезпечують корегування порушення змісту генетичного коду.

Назву „супресорні” ці мутації отримали у зв'язку з тим, що вони пригнічують (супресують) прямі мутації та корегують і поновлюють структуру генів, які зазнали дії мутагенних чинників.

Розрізняють *істинні зворотні мутації, або істинні реверсії*, які забезпечують поновлення чергування нуклеотидів в структурі певного гену, що зазнав впливу мутагену, та *супресорні мутації*, при яких ушкодження зберігаються, але їх негативний вплив нівелюється додатковою мутацією. Тобто, ці мутації виправляють або пригнічують (супресують) прямі мутації і поновлюють структуру геномної ДНК.

Наявність таких мутацій вперше було виявлено в 20-х роках минулого століття.

Згодом було виокремлено три групи супресій: прямі внутрішньогенні, непрямі позагенні і прямі позагенні.

Прямі внутрішньогенні мутації корегують структуру мутованих генів внаслідок зсуву рамки зчитування і є результатом другої точкової мутації (інсерції чи делеції) на тому ж гені, що зумовлює нейтралізацію негативної дії попередньої мутації та поновлення його

структури. Якщо у випадку мутації проходить включення додаткового нуклеотиду (плюс мутація), то внаслідок супресії буде відбуватися видалення одного нуклеотиду (мінус мутація). Тобто, в основі механізму прямої внутрішньогенної мутації лежить виправлення помилок в структурі ДНК, внаслідок появи мутації, з протилежним знаком. Повне поновлення змісту генетичної інформації, закодованої в структурі мутованого гену, можливе в тому випадку, коли друга супресорна мутація відбувається поблизу першої.

При *непрямих позагенних супресіях* структура та функції генних продуктів, як правило, не поновлюються. Повернення до вихідного стану може відбуватися лише внаслідок додаткової мутації у гені, що міститься на певній відстані від мутованого. За цих умов первинні генні порушення нівелюються, а метаболічні перетворення різних сполук спрямовуються обхідними шляхами.

У випадку *прямих позагенних супресій* корегування ушкоджень генетичних структур відбувається тоді, коли дія позагенного супресора спрямована на первинне генне порушення. Цей вид супресії вперше було виявлено в 1960 році на основі аналізу міссенс-мутантів *E.coli*, в яких спостерігалось порушення синтезу незамінної амінокислоти триптофану внаслідок точкової мутації на структурі гену, що кодує фермент триптофансинтетазу. Суть мутації в тому, що у 211 положенні поліпептидного ланцюга ферменту, амінокислота гліцин замінюється на аргінін. При додатковому мутагенезі отримали мутанти, в яких фермент був представлений двома фрагментами, один з яких виявився каталітичноактивним. Супресорна мутація, яка зумовлює утворення цього ферменту була локалізована поза межами триптофанового оперону, однак забезпечувала корегування первинного генного порушення.

Враховуючи те, що поява точкових мутацій в генах відбувається не надто часто, супресія, як форма самозахисту генетичної інформації, має другорядне значення.

2. Пряма безреплікативна репарація ушкоджень ДНК (реактивація)

Крім супресії, у клітинах живих організмів задіяні інші молекулярні механізми, які дають змогу підтримувати стабільність геному за участю специфічних систем репарації.

Корегування ушкоджень ДНК при прямій безреплікативній репарації (реактивації) відбувається за участю специфічних ферментів. Зокрема, у бактерій видалення ушкоджених ДНК, зумовлених дією алкілюючих агентів, відбувається за участю ферментів

метилтрансфераз. Ці ферменти переносять метильний чи етильний радикал з алкілованої азотистої основи на один із залишків цистеїну, який міститься в складі ферменту. За цих умов, він втрачає ферментативну активність, однак може виконувати роль регулятора активності власного гену чи ряду інших генів.

Світлова ексцизійна репарація (фотореактивація) – це один з видів безреплікативної репарації, внаслідок якої проходить руйнування тимінових димерів, утворених під впливом ультрафіолетового випромінювання. Процес ініціюється опроміненням клітин променями світла, довжиною хвилі 340-500 нм, і відбувається за участю специфічного ферменту – фотоліази. Для цього ферменту характерна висока субстратна специфічність до ділянок ДНК, на яких локалізовані тимінові димери. Після зв'язування ферменту комплекс ДНК-фотоліаза зберігається до освітлення видимим світлом, після чого фермент руйнує ковалентні зв'язки між циклами піримідинів та поновлює структуру ДНК.

ДНК-фотоліаза – це ФАД-залежний фермент, молекула якого включає 470 амінокислотних залишків, а молекулярна маса складає 49 тис. Да. Фермент міститься у клітинах вищих і нижчих організмів.

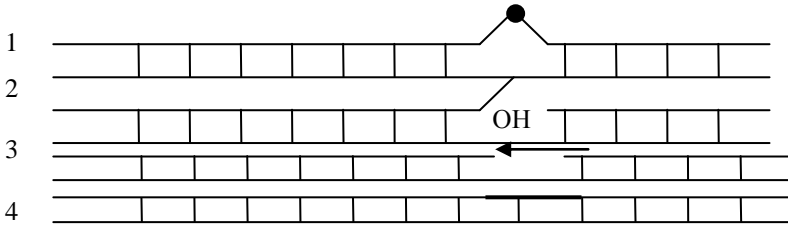
При генетичному порушенні функціонування цієї репаративної системи розвивається спадкове захворювання – *пігментна склеродермія*, ознакою якого є висока чутливість шкіри до УФ-випромінювання. У хворих спостерігається також синдром передчасного старіння.

Крім фотореактивації у клітинах може бути задіяний інший механізм видалення тимінових димерів, який не залежить від світла – це, так звана, *темнова ексцизійна репарація*.

Темнова ексцизійна репарація відбувається за участю комплексу ферментів, які поступово корегують структуру ДНК і видаляють ушкоджені фрагменти. Темнова ексцизійна репарація, на відміну від фотореактивації, не залежить від світла і є багатоступеневим процесом, в перебігу якого задіяні ферментні системи, що узгоджено проводять поновлення структури ДНК в кілька етапів:

- розрив ланцюга ДНК у місцях локалізації тимінових димерів за участю ендонуклеази (1);
- видалення (ексцизія) за участю ліази одноланцюгового фрагменту ДНК, який містить димер (2);
- репаративний синтез ДНК (забудова утвореної прогалини на структурі ДНК за участю полімерази) (3);

- ковалентне лігання з'єднання фрагментів, внаслідок утворення міжнуклеотидних фосфодіестерних зв'язків (4):



У бактерій зустрічається інший механізм ексцизії ушкодженого фрагменту ДНК, який містить тимінові димери – забудова ушкодженої ділянки *de novo*. Процес відбувається у два етапи: за участю ферменту ексцинуклеази, який знаходить ушкодження, проходить вирізання фрагменту з 12-13 нуклеотидів в структурі ДНК, де містяться тимінові димери та наступна забудова утвореної прогалини за участю ферментів, що володіють ДНК полімеразною активністю.

В клітинах еукаріот цей процес забезпечує репараційна ендонуклеаза II, яка руйнує міжнуклеотидний зв'язок біля 5'-кінця димеру, а інша специфічна ендонуклеаза видаляє близько 100 нуклеотидів. Забудову утвореної прогалини забезпечує ДНК-полімераза β , а ДНК-лігаза поновлює міжнуклеотидні зв'язки.

У процесі темної ексцизійної репарації задіяний ще один фермент – полі-(АДФ-рибозо)-полімераза, який забезпечує АДФ-рибозилування білків хроматину, внаслідок чого послаблюються їх зв'язки з ДНК що стимулює дію ферментів репарації. Донором АДФ-рибози, за цих умов, виступає НАД⁺, який особливо інтенсивно використовується при ексцизійній репарації ушкоджень, зумовлених рентгеновським випромінюванням.

Важливе значення при видаленні ушкоджень в структурі ДНК мають також ферменти *ДНК-N-глікозидази*, які розпізнають модифіковані азотисті основи, що утворюються внаслідок дії різних окисників.

Розрізняють два види ферментів ДНК-N-глікозидаз: ендонуклеази III та формамідопіримідин-ДНК-глікозидази. Перші видаляють на ушкоджених ділянках ДНК окиснені та дезаміновані піримідинові, а другі – пуринові основи. Зокрема, фермент урацил-ДНК-глікозидаза видаляє азотисту основу урацил, в результаті чого утворюється апіримідиновий сайт. Далі, за участю репараційної ендонуклеази I, розщеплюється остов полінуклеотидного ланцюга по місцю видалення цієї основи. Специфічна екзонуклеаза видаляє

дезоксирибозофосфат, а β -ДНК-полімераза добудовує репарований ланцюг, який з'єднується за участю ДНК-лігази.

Одночасно з цим, за таким механізмом не може бути репарований дезамінований 5-метилцитозин, оскільки це може викликати втрату змісту генетичного коду на певних локусах ДНК: внаслідок гідролітичного дезамінування 5-метилцитозин перетворюється в тимін, а аденін – в гіпоксантин. В цьому випадку тимін і урацил будуть комплементарні не гуаніну, як цитозин і 5-метилцитозин, а аденіну.

Важливе значення для видалення ушкоджень на структурі ДНК мають ферменти Ар-ендонуклеази, які розщеплюють Ар-сайти внаслідок руйнування сахарофосфатного остову та створюють умови для дії наступних ферментів – екзонуклеаз, що вирізають і видаляють ушкоджені ділянки полінуклеотидного ланцюга ДНК. Звільнені ділянки забудовуються за участю ферменту ДНК-полімерази I, зорієнтованої на комплементарний ланцюг ДНК. ДНК-полімераза I подовжує 3'-кінець одного з ланцюгів по місцю розриву в ланцюгах ДНК та видаляє нуклеотиди з 5'-кінця молекули. Завершує процес репарації фермент ДНК-лігаза, яка з'єднує відрепаровані ділянки ланцюга внаслідок утворення фосфодієфірних зв'язків. У цьому процесі можуть бути задіяні кілька різних Ар-ендонуклеаз.

У клітинах еукаріот присутні також ферменти ДНК-інсертази, які приєднують азотисті основи до дезоксирибози, у випадку їх втрати, та поновлюють комплементарність ланцюгів ДНК.

Важливе значення при ексцизійній репарації ушкоджень ДНК має АТФ-залежний механізм репарації або *нуклеотидна ексцизійна репарація*, суть якої в видаленні ушкоджених олігонуклеотидних фрагментів ДНК з наступною реконструкцією їх за участю комплексу ферментів репарації. Видалення таких фрагментів проходить з двох боків від пошкодженого нуклеотиду. Як правило, видаляється ділянка, що включає 12-13 нуклеотидів у прокаріот і 24-32 нуклеотиди в еукаріот. Вирізання ушкоджених ділянок ДНК відбувається за участю ферменту оксинуклеази, для якого характерна хеліказна, ендонуклеазна і фосфодієстеразна активність. Утворені прогалини на структурі ДНК забудовуються за участю ДНК-полімерази I і ДНК-лігази. В цілому, АТФ-залежна ексцизійна репарація включає такі етапи: пізнавання пошкодженої ділянки, подвійне розрізання ланцюгів ДНК, відновлювальний синтез та з'єднання відрепарованих ділянок. Слід підкреслити, що ексцизійна репарація найінтенсивніше відбувається на сайтах ДНК, які транскрибуються. Це важливо з огляду на те, що деякі ушкодження, наприклад, тимінові димери, можуть

блокувати перебіг транскрипції. У клітинах бактерії *E. coli* посилення репаративних процесів під час транскрипції забезпечується специфічним білковим комплексом – транскрипційно-репаративним фактором (TRCF).

Світлову фотореактивацію та темнову ексцизійну репарацію виявлено у всіх видів організмів – від найпростіших до хребетних. В основі цих процесів лежить один і той же механізм: порушена ділянка ДНК видаляється і на основі структури матриці за принципом комплементарності ушкоджена ділянка поновлюється. Тобто, ці процеси мають загальнобіологічне значення, що забезпечує можливість виживання організмів за умов впливу таких поширених мутагенів, як ультрафіолетове і радіоактивне випромінювання, хімічні мутагени, температурні чинники.

Вважають, що 80-90% всіх онкозахворювань пов'язані з порушенням процесів репарації ДНК. З дефектами системи репарації пов'язані також інші захворювання, такі як триходистрофія (ламкість волосся через дефіцит Сульфуру), аномалії шкіри і кісткової тканини, дефекти статевого розвитку, карликовість, глухота, атрофія органів зору, макроцефалія та ін.

3. Постреплікативна репарація ДНК (репарація помилок реплікації)

Постреплікативна репарація включає:

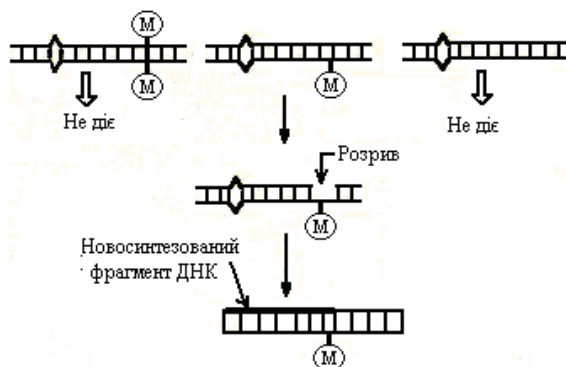
- видалення місметчів;
- рекомбінантну репарацію;
- SOS-репарацію.

Видалення місметчів. Цей процес забезпечує виправлення помилок реплікації, в результаті яких порушується утворення комплементарних пар азотистих основ, що зустрічається, в середньому, з частотою один випадок на 10 тис. нуклеотидів. Результатом цього є включення в дочірній ланцюг ДНК некомплементарних пар азотистих основ нуклеотидів (місметчів). Оскільки ДНК-полімераза I не завжди може корегувати такі помилки реплікації, репаративні процеси на структурі ДНК, в цьому випадку, забезпечує специфічна система репарації, яка пов'язана з метилюванням азотистих основ нуклеотидів (аденіну, гуаніну). Суть процесу в тому, що після реплікації, через певний проміжок часу, внаслідок постреплікативної модифікації відбувається метилювання ведучого ланцюга ДНК по залишках аденіну (в прокариот) та гуаніну (в еукариот). Дочірній ланцюг залишається неметилюваним. Метилюються, як правило, залишки пуринів на ділянках ДНК, де містяться місметчі, щоб система репарації

могла відрізати ушкоджений ланцюг від неушкодженого. Тобто, цей вид метилювання є свого роду сигналом, який індукуює включення системи репарації.

Метилювані пуринові азотисті основи дають змогу розпізнати матричний ланцюг ДНК, первинна структура якого реплікується повинна бути точно відтворена в комплементарній копії – дочірньому ланцюгу. Крім того, сигналом для розпізнавання місметчів в структурі ДНК є дестабілізація подвійної спіралі та утворення одностанцюгових розривів. У цьому виді репарації задіяний комплекс ферментів, який володіє хеліказною, нуклеазною і АТФ-азною активністю. Комплекс ферментів сканує ланцюг ДНК і видаляє ділянки дочірнього ланцюга, які знаходяться поблизу місметчів, а утворені прогалини забудовує комплементарними нуклеотидами.

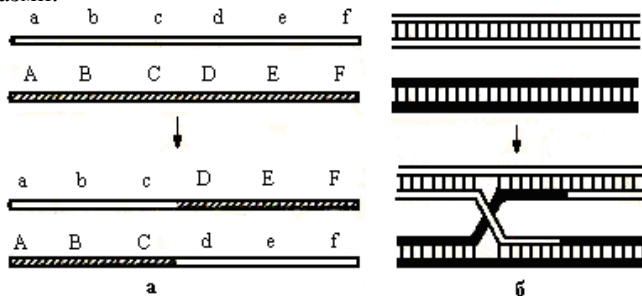
Репаративний комплекс рухається по дуплексу ДНК, доки не натрапить на неметилюваний фрагмент 5'-ГАТЦ-3', який може знаходитися лише на дочірньому ланцюгу. На цьому фрагменті утворюється розрив і розпочинається рух ферментативного комплексу у зворотному напрямку – до місця порушення структури. За участю 3'→5' екзонуклеазної активності репаративного комплексу проходить видалення некомплементарних нуклеотидів, що містяться в дочірньому ланцюгу. Після цього, за участю ДНК-полімеразної активності комплексу проходить забудова видаленого фрагменту. Далі комплекс рухається у зворотному напрямку і за участю лігазної активності поновлює міжнуклеотидні зв'язки по місцю їх розриву:



Цей механізм репарації було досліджено на бактеріальних клітинах, в яких присутні специфічні метилази, а також ферменти ендонуклеази і рестриктази, які розпізнають в структурі ДНК чергування нуклеотидів, що містять метилюваний аденін. Контроль за

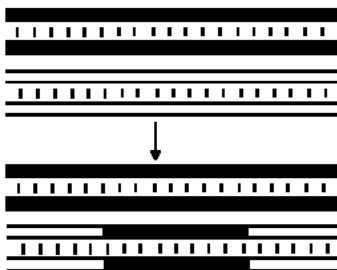
порушенням комплементарного з'єднання азотистих основ нуклеотидів в структурі ДНК у клітинах бактерій *E. coli* забезпечують продукти генів *hes F* і *mut S*. Функціонування системи репарації є енергозалежним процесом і проходить з використанням енергії АТФ. Одночасно з цим, захист генетичного матеріалу за участю системи репарації і рестрикції не завжди ефективний, що підтверджується існуванням вірусів бактерій – бактеріофагів. Бактеріофаги мають специфічні механізми захисту від рестрикції. Це, в першу чергу, їх здатність нівелювати пізнавання рестриктазами клітин-реципієнтів фагової ДНК. До складу ДНК деяких бактеріофагів входять мінорні основи – оксиметилцитозин (бактеріофаги T2, T4, T6), у зв'язку з чим рестриктази не пізнають цей субстрат. Крім того, бактеріофаги можуть кодувати нуклеотиди, які руйнують немодифіковані ДНК клітини-реципієнтів.

Рекомбінантна постреплікативна репарація. Цей процес ґрунтується на здатності фрагментів молекул ДНК, для яких характерна гомологія за первинною структурою, до взаємного обміну певними ділянками внаслідок розриву, з'єднання та зміни чергувань нуклеотидів. Зокрема, при гомологічній рекомбінації проходить обмін між варіантами одних і тих же чергувань нуклеотидів. Реалізується цей вид репарації внаслідок комплементарності гомологічних ділянок ланцюгів ДНК, що належать різним молекулам, результатом чого є утворення проміжного комплексу – структури Холідея, або напівхіази:



На цій структурі проходить комплементарна взаємодія одноланцюгових гомологічних ділянок ДНК, що належить різним молекулам, внаслідок чого формуються гетеродуплексні структури. У випадку, коли на гетеродуплексних структурах, утворених внаслідок рекомбінації, проходить репарація некомплементарних азотистих основ нуклеотидів, інформація, закодована на одному з ланцюгів гетеродуплексу, замінюється інформацією, що міститься на іншому ланцюгу, на якому відсутні такі ушкодження. Тобто, в цьому випадку

одна з двох рекомбінантних структур зникає і перетворюється на іншу (проходить конверсія генів):



При рекомбінантній репарації ушкоджений і неушкоджений ланцюги ДНК виявляються з'єднаними з неушкодженими комплементарними ділянками, що створює можливість проведення репаративних процесів за участю специфічних механізмів та ферментних систем.

Описані вище види репарації функціонують у клітинах постійно, тому вони отримали назву *конститутивних*.

SOS-репарація. Цей вид репарації вперше було виявлено М. Радманом (1974 р.). Він включається у випадку неефективної дії попередніх механізмів та індукується впливом шкідливих чинників, які можуть викликати загибель клітини та організму в цілому. Це, зокрема, значне збільшення одноланцюгових фрагментів ДНК, поява у клітині надмірної кількості модифікованих метаболітів, сигналів зупинки реплікації, тощо. Індукція системи SOS-репарації у клітинах бактерії *E. coli* ґрунтується на взаємодії продуктів двох генів *Rec A* і *Lex A*.

При незначних ушкодженнях генетичних структур, як правило, проходить індукція лише частини генів SOS-системи, що зумовлює синтез невеликої кількості репаративних білків, які функціонували і раніше. В випадку значних ушкоджень ДНК індукуються всі гени SOS-системи, внаслідок чого в метаболізмі клітини відбуваються суттєві зміни: проходить гальмування реплікації, блокується поділ клітин, індукується синтез білків теплового шоку, посилюється генетична мінливість. При тотальному порушенні структури ДНК відбувається індукція генів *umu C* і *umu D*, генні продукти яких стимулюють особливий вид репарації, спряженої з виникненням мутацій, що підвищують виживання клітин в екстремальних умовах. За цих умов, під впливом продуктів вказаних генів та генів *Rec A* білка, посилюється активність ДНК полімераз, які копіюють ушкоджену ділянку матриці. Зокрема, корегуюча активність ζ -субодиниці ДНК-

полімерази може специфічно пригнічуватися Rec A білком, зв'язаним з ушкодженою ділянкою ДНК, наприклад, тиміновим димером. Ушкоджена ділянка матричного ланцюга видаляється, а утворена прогалина забудовується комплементарними нуклеотидами. Оскільки активність генів *umu C* і *umu D* може зумовлювати появу мутацій, вважають, що *SOS-репарація ціною підвищення мутагенезу забезпечує підтримання життєздатності ушкоджених клітин*.

Включення механізмів SOS-репарації є, свого роду, сигналом небезпеки, який зумовлює специфічну перебудову метаболізму клітини, спрямовану на мобілізацію захисних механізмів та забезпечення виживання в екстремальних умовах. Інтенсивність індукції SOS-системи у клітині, до певної міри, є свідченням посилення здатності до виживання, тому деякі помірні бактеріофаги використовують індукування SOS-системи як сигнал для посилення самовідтворення. Тривалість SOS-репарації незначна, через певний час включаються інші конститутивні репаративні механізми. За цих умов, пригнічується дія факторів, які викликали SOS-відповідь клітини.

4. Захист геному від чужорідного генетичного матеріалу

Цей процес відбувається за участю особливої системи модифікації рестрикції, яка знаходиться під регуляторним впливом різних механізмів, зокрема, вибіркового руйнування чужорідної ДНК без будь-якого негативного впливу на ДНК клітини-хазяїна. У перебігу процесу задіяні дві специфічні ферментні системи, одна з яких проводить модифікацію власної ДНК, а інша – рестрикцію немодифікованої, чужорідної ДНК. Ферменти системи модифікації рестрикції часто утворюють єдиний комплекс який, залежно від потреб, може проводити той чи інший процес. Вони, як правило, гальмують обмін генетичним матеріалом внаслідок трансформації, трансдукції і кон'югації та, одночасно з цим, є надійним захистом від вірусної інфекції.

Суть модифікації в вибіркового метилюванні окремих азотистих основ нуклеотидів на певних ділянках ДНК за участю ферментів *ДНК-метилаз*. На сайті, специфічному для метилтрансфераз, метилюються, як правило, лише одна чи дві азотисті основи нуклеотидів на структурі напівметилюваної дволанцюгової молекули ДНК. В цій молекулі внаслідок постреплікативної модифікації залишки аденіну і цитозину метилювані лише в одному ланцюгу. Одно- чи дволанцюгові молекули ДНК бактеріальних клітин практично не метилюються цими ферментами.

У клітинах вищих організмів відбувається реплікативне та постреплікативне метилювання. Перебіг реплікативного метилювання включає два етапи: спочатку метилюються фрагменти Оказакі, а згодом решта ділянок полінуклеотидного ланцюга. Ці процеси забезпечують різні метилази.

Метилювання азотистих основ нуклеотидів на структурі ДНК еукаріот відбувається також на ранніх етапах ембріогенезу. Інтенсивність цього процесу знижується по мірі диференціювання клітин.

Рестрикцію чужорідних ДНК забезпечують *рестрикційні ендонуклеази*, відкриті в 50-х роках ХХ ст. На сьогодні вивчено декілька сотень цих ферментів, для яких характерна висока субстратна специфічність. Розрізняють кілька класів рестриктаз.

Рестриктази I класу (RI) здатні проводити дволанцюговий розрив ланцюгів ДНК на відстані 100-7000 пар нуклеотидів від сайту пізнання, причому місце внесення розриву не фіксоване. У зв'язку з цим, при дії цього класу рестриктаз на немодифіковану молекулу ДНК утворюються фрагменти, гетерогенні за довжиною.

Рестриктази II класу (RII) проводять рестрикцію на чітко визначених ділянках: всередині сайту пізнання, який являє собою комплементарне (у двох ланцюгах) чергування нуклеотидів. Результатом дії цього класу рестриктаз є утворення рестриктів, що містять ідентичні 3' і 5'-кінцеві нуклеотиди. Реакції рестрикції є енергозалежні та вимагають присутності АТФ і специфічних кофакторів та йонів Mg^{2+} .

Рестриктази цього класу, крім рестрикції, можуть забезпечувати також сайт-специфічну рекомбінацію. У зв'язку з цим, їх широко використовують для фізичного картування різних геномів, вивчення первинної структури ДНК, створення гібридних генетичних структур (рекомбінантних ДНК).

Різні підкласи RII можуть проводити рестрикцію з утворенням „тупих” і „липких” кінців, що забезпечує можливість створення штучних рекомбінантних ДНК, які використовують в дослідженнях з генетичної інженерії.

Рестриктази III класу (RIII) поєднують властивості двох попередніх класів.

При проникненні у клітину чужорідної ДНК, ланцюги якої не містять модифікованих основ, посилюється ферментативна активність рестрикційного комплексу, що зумовлює дволанцюговий розрив молекули ДНК на певній відстані від сайту пізнання, наслідком чого є руйнування чужорідного генетичного матеріалу.

5. Пригнічення відтворення у клітині чужорідного генетичного матеріалу

Важливим механізмом підтримання стабільності генетичних структур є пригнічення відтворення у клітині чужорідного генетичного матеріалу. При дії на клітину різних ушкоджуючих чинників, в тому числі і при інфікуванні вірусами, проходить синтез специфічного захисного фактора глікопротеїнової природи, який дістав назву *інтерферону*. Свою назву цей фактор отримав у зв'язку з тим, що було встановлено взаємне пригнічення вірулентності різних вірусів (інтерференція) при інфікуванні ними клітин з інтервалом 24 год., внаслідок синтезу у клітині захисного білка (інтерферону).

Інтерферон виявляє специфічний вплив на окремі фази репродукції вірусів в інфікованій клітині. Проникнення в клітину різних вірусів зумовлює індукування синтезу специфічних видів інтерферону і, відповідно, запускає різні механізми репресивного впливу на їх відтворення. Ці механізми можуть реалізуватися внаслідок пригнічення активності вірусних РНК-полімераз, синтезу структурних вірусних білків, формування віріонів та вихід з клітини нових вірусних часточок. Особливістю противірусної дії інтерферону є те, що він пригнічує дію як РНК-, так і ДНК-геномних вірусів. Одночасно з цим, для інтерферону характерна висока видова специфічність: для лікування людини можна використовувати лише інтерферон, виділений з лейкоцитів людини. Інтерферон має пролонгуючий ефект – його дія виявляється протягом тривалого часу після певного латентного періоду.

Крім антивірусних ефектів інтерферон виявляє також імуномодулюючу та протипухлинну дію. Найвищий імуномодулюючий ефект характерний для γ -інтерферону.

Протипухлинна дія інтерферону ґрунтується на його здатності підвищувати активність природних кілерів – специфічних клітин селезінки, які різняться від Т і В лімфоцитів тим, що мають цитотоксичну дію на клітини пухлин.

Враховуючи це, різні види інтерферонів (α , β , γ) використовують для профілактики і лікування вірусних та онкозахворювань, імунодефіцитних станів та ін.

Тривалий час інтерферон отримували при культивуванні лейкоцитів людини *in vitro*. Однак, значно перспективнішим є отримання його методами генної інженерії – введення гену інтерферону людини в бактеріальні клітини. Зокрема, при культивуванні бактерії *E. coli* на відповідних середовищах вихід інтерферону складає 25% від маси клітинного білка. Здатність клітин

до продукування інтерферону є свідченням існування механізмів самозахисту генетичного матеріалу від ушкоджуючої дії чужорідних геномів, без яких еволюційний розвиток організмів був би неможливий.

6. Пригнічення експресії інтегрованого чужорідного геному

Важливе значення для підтримання стабільності геному має також пригнічення експресії інтегрованих чужорідних генів. Свідченням наявності такого механізму самозахисту є те, що при інтегруванні геному бактеріофага у хромосому бактеріальної клітини, він перетворюється у профаг, а клітина стає лізогенною і передає його наступному поколінню. Це явище характерне і для геному вищих організмів: при інтегруванні вірусного геному спостерігається явище *вірогенії*, при якому нащадки інфікованої клітини зберігають на певних ділянках хромосоми геном вірусу. Зокрема, в геномі людини виявлено велику кількість інтегрованих вірусних геномів, експресія генів яких загальмована специфічними молекулярними механізмами. Одночасно з цим, в деяких випадках, внаслідок порушення захисних механізмів, частина інтегрованих чужорідних генів може транскрибуватися, що зумовлює розвиток різних захворювань.

Всі вказані вище механізми самозахисту генетичних структур реалізуються на клітинному рівні. Крім того, в багатоклітинних організмах, у процесі еволюції, сформувалися специфічні механізми підтримання стабільності генетичного матеріалу, здатності до конкурентного функціонування чужорідних геномів, а також розмноження власних клітин, які зазнали онкотрансформації. Це, в першу чергу, забезпечується наявністю природних систем неспецифічної резистентності (фагоцитоз, система комплементу).

У вищих організмів сформувався також високоспецифічний механізм самозахисту в вигляді імунної системи, яка здатна проводити генетичний контроль за присутністю у клітині чужорідної генетичної інформації та забезпечувати її елімінацію і знищення. Цей генетичний контроль реалізується за участю антитіл, які реагують на присутність антигенів утворенням імунних комплексів. Вказаний генетично детермінований процес призводить до руйнування антигенів та зумовлює надійний захист організму від генетично чужорідних структур. У випадку, коли механізми підтримання стабільності генетичної інформації не можуть забезпечити ліквідацію небезпечних ушкоджень, включаються інші, суть яких у програмуванні клітинної смерті – апоптозу. Тобто, у клітинах функціонують не лише досконалі

системи захисту, але і специфічні механізми самоліквідації у випадку, коли ушкодження клітини стає незворотним та складає небезпеку для існування організму.

7. Молекулярні механізми апоптозу

Як для організму в цілому, так і для окремих клітин, органів та тканин властива певна тривалість життя: вони народжуються, диференціюють, розвиваються та гинуть. Загибель всього організму і клітин є загальнобіологічним процесом, невідворотним по своїй суті та результатом термінальної диференціації чи старіння. Однак, в ряді випадків можуть гинути, на перший погляд, життєздатні клітини, які не досягли термінальної фази диференціації, тобто клітини, які не повністю вичерпали власний потенціал та енергетичні резерви. Гіпотеза про те, що в геномі може бути задіяний механізм запрограмованої смерті на клітинному рівні вперше була підтверджена Дж. Керр, А. Уїльє та А. Куре (1972 р.). У 2002 р. С. Бреннеру, Г. Хорвіцу і Дж. Салстону було присвоєно Нобелівську премію в галузі фізіології і медицини за ідентифікацію генів, які включають програму апоптозу в нематод. Ці гени кодують білки, що запускають складний каскад реакцій, в результаті якого проходить руйнування клітин на окремі фрагменти, що можуть використовуватися в вигляді матеріалу для побудови інших клітинних структур.

Одночасно з цим, за участю апоптозу можуть видалятися також зайві, ушкоджені чи хворі клітини (в тому числі і онкотрансформовані). Цей процес може охоплювати велику кількість клітин, і навіть органи, оскільки сигнали про знищення передаються через міжклітинні контакти, що спостерігається при сепсисі, інфаркті міокарда та інших деструктивних процесах в органах і тканинах. У цьому випадку, загибель клітин пояснювали тим, що порушується постачання поживних речовин та кисню, тобто мікрооточення цих клітин припиняє забезпечення їх життєдіяльності. Одночасно з цим, чисельні дослідження дали змогу дійти висновку, що загибель клітин, очевидно, зумовлена включенням механізмів самознищення, які притаманні самій клітині. Ці механізми включаються також при дії на клітину шкідливих ендо- та екзогенних факторів, що вказує на можливість запрограмованої смерті клітини – апоптозу (від грец. *падолист*).

Залежно від причин розвитку розрізняють:

- апоптоз, зумовлений порушенням метаболізму всередині клітини (внутрішній);

- апоптоз, зумовлений дією екзогенних чинників, який реалізується через специфічні клітинні рецептори (апоптоз „по команді”, вимушений апоптоз).

Перший вид апоптозу може бути зумовлений внутрішніми чинниками, зокрема, порушенням метаболізму у клітині, що викликає дегенеративні зміни (від лат. *degenero* – *виродження*), наслідком яких є порушення функціонування як окремих клітинних органел, так і клітин в цілому. Як правило, дегенерація зумовлена ендогенним нагромадженням у клітині різних сполук, внаслідок порушення метаболізму. Апоптоз може бути спричинений також появою ушкоджень хромосомного апарату, які не підлягають репаративним процесам, та мембранних структур внаслідок пероксидного окиснення ліпідів, тощо. Особливо небезпечними є ушкодження мембран мітохондрій, що може призвести до вакуолізації їх вмісту та втрати специфічних функцій. Причиною цих ушкоджень є дія різних видів опромінення, хімічних реагентів, а також токсичних сполук, що утворюються внаслідок порушення метаболічних процесів у клітині.

Індукторами апоптозу також можуть стати активні форми кисню O^* або радикали $-OH^*$, внаслідок дії яких звільняється велика кількість апоптогенних факторів. Значна кількість цих факторів утворюється при руйнуванні мембран мітохондрій. У переважній більшості, апоптоз реалізується за участю цитоплазматичних рецепторів та мітохондріальних апоптогенних факторів, у зв'язку з чим В. Скулачов назвав мітохондрії „термоядерними станціями” клітини, які здатні не лише забезпечувати біоенергетику, але за певних умов викликати її самоліквідацію. З апоптозом зв'язано також пошкодження ДНК. Воно зумовлює нагромадження у клітині специфічного білка p53, який може пригнічувати поділ клітин та індукувати апоптоз. Підвищення активності білка p53 стимулює цілий ряд ефектів. В першу чергу, за цих умов підвищується активність генів, які кодують білки „кілерних” рецепторів, що сприймають сигнали апоптозу (білок Fas, DR-5). Зокрема, посилюється активність гену p21, продукт якого (білок p21) пригнічує реплікацію (зв'язує білок PCNA, необхідний для перебігу процесу). Активація білка p53 також може запускати мітохондріальний механізм апоптозу: змінюється співвідношення між активністю генів, що регулюють проникність мітохондріальних мембран, внаслідок чого посилюється каспазний каскад. Білок p53 активує гени, продукти яких виділяються із загинувших клітин і впливають на їх оточення, внаслідок чого порушується проліферація сусідніх клітин, гальмується ангиогенез (новоутворення судин у сусідніх тканинах). Факторами, які пригнічують функціонування білка p-53 є білки онкогенних вірусів

(білок E-6 вірусу папіломи людини – HPV5, а також білки Pcl-2 аденовірусів). У зв'язку з цим, онкотрансформацію клітин часто пов'язують з порушенням системи апоптозу, внаслідок чого клітини виходять з-під контролю метаболізму та зазнають неконтрольованого росту і поділу.

Апоптоз „по команді” зумовлений дією негативних зовнішніх чинників. Цей вид апоптозу може бути *фізіологічно доцільним та патологічним*. У першому випадку клітина є практично повністю життєздатною, однак з позицій цілісного організму існування її є недоцільним, або навіть шкідливим. У зв'язку з цим посилюються сигнали про необхідність „самоліквідації”.

Прикладом такого апоптозу є процеси, що відбуваються на певних фазах онтогенезу. Це, зокрема, загибель клітин лялечок при метаморфозі комах, редукція пронефруса та ряду інших зачатків (хорди, мезонефрального та промезонефрального каналів) в ембріогенезі, зникнення міжпальцевих перетинок в ході ембріонального морфогенезу. Наслідком апоптозу „по команді” може бути інволюція цілих органів. Це спостерігається, зокрема, в горбуші після нересту, що призводить до її загибелі. Апоптоз „по команді” відбувається також при формуванні і функціонуванні імунної системи: загибель стимульованих антигеном лімфоцитів при тривалій відсутності антигенів, знищення аутореактивних клонів Т- і В-лімфоцитів, загибель лімфоцитів під впливом надлишку глюкокортикоїдів та ін. Механізми апоптозу „по команді” задіяні також у регуляції гемопоезу: за відсутності факторів, необхідних для розвитку кровотворних клітин, деякі з них, в яких розпочалася диференціація, можуть гинути. Апоптоз „по команді” відбувається також під час розвитку ряду патологічних станів: при онкозахворюваннях клітини пухлин можуть зазнавати апоптозу під впливом Tumor necrosis factor (ФНО₂), який зв'язується на їх поверхні з специфічними рецепторами R-1 ФНО₂.

Апоптоз – багатоступеневий процес, який розпочинається із сприймання клітиною певних сигналів і закінчується руйнуванням її вмісту під впливом лізосомних ферментів. Специфічні рецептори, локалізовані на поверхні клітини, отримують сигнал від відповідного індуктора (ліганду), наслідком чого є реалізація програми загибелі клітини. За участю специфічних адапторів (молекул посередників) сигнал передається до ядерного апарату клітини. Для перебігу апоптозу необхідні специфічні протеолітичні ферменти (каспази лізосом), адапторні білки, що контролюють їх активність, та рецепторні білки факторів некрозу.

Каспази – це цистеїнові протеази, які селективно розщеплюють білки по карбоксильних групах залишків аспарагінової кислоти. Вони синтезуються в вигляді неактивних попередників – проферментів (прокаспаз). При активації каспаз відбувається відщеплення від прокаспазу N-кінцевого домену і формування двох субодиниць – малої та великої, з яких формується тетрамерна структура з двома активними центрами. Всього у клітинах можуть бути присутні близько 10 різних каспаз, які здатні поетапно запускати протеоліз (каспазний каскад). Розрізняють *ініціюючі* та *ефекторні* каспази. Останні зумовлюють незворотність апоптозу. Під впливом сигналів, які надходять з плазмолем, проходить активація каспази 8, а при надходженні сигналів з мітохондрій (при підвищеній проникності мембран) активується каспаза 9. Одночасно з цим, всі ці сигнали надалі передаються на каспазу 3, яка запускає ланцюг ферментативних перетворень та гідролітичне розщеплення цитоплазматичних і ядерних білків. Ефекторні каспази (каспазу другого порядку) забезпечують інактивацію та розщеплення життєвоважливих білків клітини, зокрема таких як ферменти репарації ДНК, протеїнкази, ДНК і РНК полімерази, ендонуклеази, а також білків цитоплазми – протеїнкази, фосфоліпази А₂, білків цитоскелету. Мішенями каспаз можуть бути ферменти реплікації і репарації ДНК, регуляторні білки, інгібітори ендонуклеаз. За участю ендонуклеаз проходить міжнуклеосомний розрив хроматину на лінкерних ділянках ДНК, внаслідок чого утворюються фрагменти, що відповідають розмірам нуклеосомних часточок (180-200 н.п.).

Особливий перебіг апоптозу характерний для ВІЛ-інфікованих клітин. Ряд білків ВІЛ є активаторами чи інгібіторами апоптозу. Зокрема, Tat-білок вірусу є активатором апоптозу Т-лімфоцитів. При прогресуванні захворювання зростає число Т-клітин, які забезпечують експресію рецепторів Fas, що зумовлює Fas-залежний апоптоз. Вірусний білок gp-120, зв'язуючись з рецептором CD-4 Т-клітин, теж зумовлює їх апоптоз. Інші білки ВІЛ, зокрема, білок Vg_g, навпаки, є інгібіторами апоптозу. Слід підкреслити, що наявність механізмів апоптозу у клітинах організму має певне значення. Цей процес, у першу чергу, забезпечує підтримання гомеостазу чисельності клітин та їх диференціювання, свого роду засіб самозахисту організму від появи генетичних дефектів. Це дає змогу позбутися старіючих і хворих клітин, в яких можлива поява мутацій, що можуть бути потенційно небезпечними для організму. У зрілому організмі апоптоз проходить паралельно з мітозом і сприяє регуляції клітинних популяцій. Зокрема, апоптоз зумовлює знищення надлишку лімфоцитів, що може

спостерігатися при бактеріальних інвазіях організму, забезпечує елімінацію генетично видозмінених клітин, які втратили механізми регуляції та вийшли з-під контролю метаболізму і можуть стати причиною розвитку онкозахворювань. Враховуючи це, втрата здатності до апоптозу може стати причиною патологічних змін в організмі. Цьому, зокрема, сприяють віруси, які містять гени, що кодують іРНК, генні продукти яких мають антиапоптозні ефекти.

Одночасно з цим, можна припустити, що uszkodження клітин, яке запускає апоптоз, повинно бути значним, але не надмірним, тобто, у клітині присутні певні резерви до виживання. При надмірному uszkodженні клітин процес загибелі стає невідворотним, проходить некроз клітинного вмісту, який суттєво різниться від апоптозу. Некроз супроводжується структурно-функціональними змінами у клітині: набряком, порушенням структури мембран, звільненням лізосомних ферментів, появою ознак запального процесу у тканинах, які відсутні при апоптозі (Рис.18).

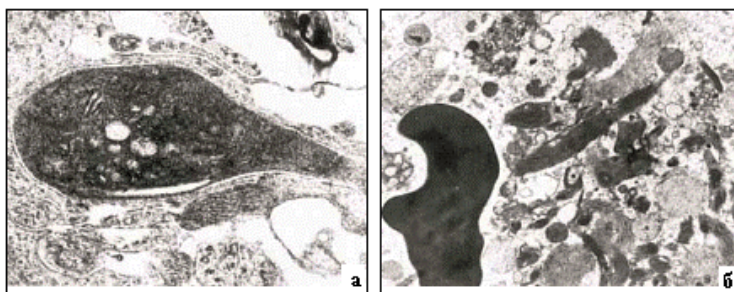


Рис. 18. Апоптоз (а) та некроз (б) гангліозних клітин.

Тобто, апоптоз відбувається у клітині, яка ще зберігає певні ознаки життєдіяльності, а некроз розвивається при незворотному uszkodженні клітини, коли механізми апоптозу вже не можуть реалізуватися внаслідок їх повної втрати та блокування енергетичних і пластичних резервів.

В апоптозних клітинах, як правило, зберігається плазмолема та проходить їх інтенсивний фагоцитоз, внаслідок чого компоненти загиблої клітини не потрапляють у міжклітинний простір і не викликають запальних процесів. При некрозі пошкоджуються як мембранні структури, так і плазмолема, що зумовлює підвищення проникності мембранних структур для води та йонів, відбуваються метаболічні зміни, які можуть стати причиною загибелі клітин.

ТЕМА: ПЕРЕДАЧА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ. ПРЯМА ТА ЗВОРОТНА ТРАНСКРИПЦІЯ

План

1. Загальні закономірності передачі генетичної інформації.
2. Транскрипція у клітинах прокаріот.
 - 2.1. Ініціація транскрипції.
 - 2.2. Елонгація транскрипції.
 - 2.3. Термінація транскрипції.
3. Регуляція транскрипції у прокаріот (індукція і репресія)
4. РНК-залежний синтез ДНК (зворотна транскрипція).

Основна література: [1, с. 317-330; 358-361]; [2, с. 243-260; 233-235]; [3, с. 125-131; 136-140].

Додаткова література: [1]; [2]; [3]; [4]; [6]; [8]; [18]; [25].

1. Загальні закономірності передачі генетичної інформації

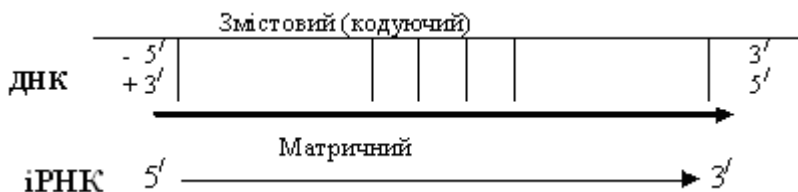
Транскрипція (від грецького *transkriptio* – переписування) – другий вид матричного синтезу та перший етап експресії генів у представників різних таксономічних груп (про- і еукаріот, вірусів, бактеріофагів). Результатом транскрипції є передача видоспецифічної генетичної інформації між різними видами нуклеїнових кислот ДНК → РНК (пряма транскрипція) або РНК → ДНК (зворотна транскрипція в РНК-геномних вірусів).

На відміну від реплікації, яка тісно пов'язана з поділом клітини, транскрипція відбувається в усіх клітинах незалежно від їх поділу, під час будь-якої фази мітотичного циклу в еукаріот, крім періоду реплікації. У прокаріот, в яких клітинний цикл нетривалий, реплікація і транскрипція можуть відбуватися одночасно, однак на різних ділянках кільцевої молекули ДНК. Транскрипція окремих генів може проходити багаторазово, залежно від потреб клітини.

Внаслідок транскрипції синтезуються всі види РНК: іРНК, тРНК, рРНК, які виконують специфічні функції в забезпеченні метаболізму клітини. Основою транскрипції, як і реплікації, є фундаментальний принцип комплементарності азотистих основ нуклеотидів, що входять до складу полінуклеотидних ланцюгів РНК і ДНК. *Під час транскрипції матриця переписується за принципом комплементарності: кожна синтезована молекула РНК комплементарна лише певній ділянці матричного ланцюга ДНК.*

У більшості видів вищих організмів, ДНК це дволанцюгова молекула, яка складається із взаємокомплементарних антипаралельних ланцюгів, що мають напрям $3' \rightarrow 5'$ та $5' \rightarrow 3'$. Одночасно з цим, транскрибується, як правило, один з них – *матричний або плюс (+) ланцюг*. Причиною цього є те, що для антипаралельних ланцюгів ДНК комплементарна виродженість відсутня і вони не можуть кодувати один білок.

Крім того, фермент, який забезпечує транскрипцію – ДНК-залежна РНК-полімераза, каталізує цей процес лише в напрямку $3' \rightarrow 5'$. Тобто, матричний ланцюг ДНК має напрям $3' \rightarrow 5'$ і є комплементарним до транскрибованої іРНК, напрям якої $5' \rightarrow 3'$. Мінус (-) ланцюг (змістовий або кодуючий) комплементарний до матричного, його напрям $5' \rightarrow 3'$:



Внаслідок транскрипції в структурі РНК комплементарно відтворюється генетична інформація, закодована в змістовому, кодуючому ланцюгу ДНК.

Тобто, синтезована молекула іРНК комплементарна до матричного (+) ланцюга ДНК і є точною копією змістового (-) ланцюга, лише відрізняється за нуклеотидним складом: замість тимінових нуклеотидів містить урицилові. Різні види РНК, як правило, транскрибуються на певних ділянках геномної ДНК.

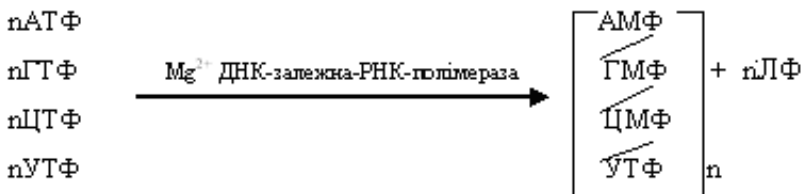
На відміну від реплікації, під час транскрипції транскрибується не вся молекула ДНК, а лише окремі її сайти, тобто використовується *локально розкручена матриця*.

Сайти ДНК, які зчитуються за принципом комплементарності у процесі транскрипції і несуть інформацію про одну (в еукаріот) чи кілька (у прокаріот) іРНК, включають цистрони або структурні гени і мають назву *одиниці транскрипції (транскриптон)*.

Як правило, він включає ділянки ДНК, які містять регуляторні сигнали початку транскрипції (ініціації) та її закінчення (термінації). У прокаріот ці сигнали знаходяться в межах одного оперону, а у клітинах еукаріот, геном яких не має оперонної організації, вони можуть бути розміщені на різних ділянках геному.

Загальну схему транскрипції було запропоновано А. Коренбергом (1958 р.).

Субстратами, що використовуються для синтезу РНК, є рибонуклеозид-5'-трифосфати, які у процесі полімеризації втрачають пірофосфатні залишки і утворюється полінуклеотид:



Для перебігу транскрипції необхідна наявність:

- локально розкрученої одноланцюгової матриці (+ ланцюг ДНК, 3' → 5');
- ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази;
- чотирьох видів рибонуклеозидтрифосфатів (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ);
- йонів Mg^{2+} , оскільки ДНК-залежна РНК-полімераза активна лише за їх присутності (в молекулі ферменту є специфічні *консенсусні послідовності* із 10 амінокислотних залишків, які хелатують ці йони).

Транскрипція має певні особливості, якими вона відрізняється від реплікації:

- синтез всіх трьох видів РНК (іРНК, тРНК, рРНК) забезпечує фермент ДНК-залежна РНК-полімераза для якого характерна нуклеотидилтрансферазна активність;
- *консервативний механізм*: у транскрибованому ланцюгу РНК відсутні елементи матриці;
- для перебігу транскрипції *не потрібна одноланцюгова матриця*: проходить локальне розкручування певних ділянок ДНК, навіть без порушення структури нуклеосом (в еукаріот);
- для початку транскрипції *не використовується РНК-затравка* (полімеризація без затравки) *та білкові фактори*;
- на відміну від реплікації, яка проходить лише під час поділу клітин (в інтерфазі), транскрипція відбувається постійно, протягом клітинного циклу;
- інтенсивність транскрипції регулюється за участю специфічних молекулярних механізмів.

2. Транскрипція у клітинах прокаріот

Вперше процес транскрипції було вивчено у клітинах прокаріот. Деякі дослідження показали, що загальні закономірності цього процесу характерні і для еукаріотичних клітин, хоч і мають певні особливості. Так, у клітинах прокаріот транскрипція відбувається на ділянках ДНК, які мають назву *оперону або транскриптону*. Транскриптони у прокаріот обмежені двома ділянками: промоутором і термінатором. У бактерій транскрипція проходить на генах оперону, які кодують різні РНК. Оперони, як правило, включають чергування нуклеотидів, що визначають структуру кількох іРНК, які є поліцистронними.

Транскрипції включає кілька етапів:

- приєднання ферменту до матриці у стартовій точці транскрипції (+1);
- утворення закритого промоуторного комплексу на ділянці ТАТА-боксу (боксі Прибнова);
- ініціація транскрипції;
- елонгація транскрипції;
- термінація транскрипції.

2.1. Ініціація транскрипції

Суть ініціації транскрипції полягає у приєднанні до матричного ланцюга ДНК ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази та утворенні відкритого промоуторного комплексу. В цьому задіяний ДНК-розкручуючий сайт ферменту, який взаємодіє з матрицею за допомогою «цинкових пальців», що знаходяться на поверхні його зверхвторинних структур.

Фермент ДНК-залежна РНК-полімераза являє собою складний олігомерний комплекс з молекулярною масою 480 тис. Да, який складається з кількох протомерів, що містять дві субодиниці типу α , по одній β і β' та γ субодиницю. Вони виконують структурну функцію, тому мають назву *конститутивних*, і формують основу ферменту (кор), який виявляє каталітичну активність лише після приєднання до нього σ -фактора. За цих умов, утворюється активна форма ферменту – холоензим, що володіє специфічними ферментативними властивостями. Всі субодиниці холоензиму зв'язані між собою силами слабкої взаємодії і кожна із них, під час транскрипції, виконує певні функції. Зокрема, β -субодиниця каталізує зв'язування рибонуклеозид-5'-трифосфатів та формування ланцюга синтезованої РНК, β' -субодиниця забезпечує приєднання ферменту до певних ділянок ДНК, а комплекс субодиниць α і β' необхідний для специфічної взаємодії з промоуторною ділянкою ДНК, де проходить ініціація транскрипції. В

цих процесах задіяна також і γ -субодиниця ферменту. Слід підкреслити, що таку будову ферменту мають не всі нижчі організми, зокрема, в деяких бактеріофагів він не має олігомерної будови і складається з одного поліпептидного ланцюга, з молекулярною масою 100 кДа.

У прокариот, геном яких має оперонну організацію, приєднання ферменту до матриці відбувається на ділянці промоутора, для якої характерне специфічне чергування мононуклеотидів (-35 послідовність). На промоуторній ділянці прокариот міститься дві консенсусні послідовності нуклеотидів: перша 5'-ТАТАТТ-3' знаходиться на відстані мінус 10 нуклеотидів від старту транскрипції, а друга 5'-ТТGAGA-3' віддалена від неї на 35 нуклеотидів. Ці послідовності знаходяться на змістовому ланцюгу ДНК і саме на них орієнтується фермент ДНК-залежна РНК-полімераза, яка вибирає місце старту транскрипції.

Після приєднання ферменту до матриці, утворюється закритий промоуторний комплекс. Далі фермент рухається по матриці і поступово розкручує її перед сайтом транскрипції, внаслідок чого утворюється лабільний *відкритий промоуторний комплекс*.

Утворення відкритого промоуторного комплексу та локальне розкручування хеліксу внаслідок руйнування водневих зв'язків між комплементарними АТ-парами азотистих основ нуклеотидів відбувається на ділянці ТАТА-боксу (бокс Прибнова). На структурі комплексу проходить транскрипція ділянки ДНК довжиною до 20 мононуклеотидів. Після цього, фермент поновлює структуру ДНК на транскрибованій ділянці, а РНК-транскрипт звільняється з фермент-субстратного комплексу. Швидкість транскрипції РНК бактерії *E.coli* 30 нуклеотидів за секунду, хоч вона може змінюватися (паузи транскрипції).

Ділянки ДНК, на яких проходить утворення відкритих промоуторних комплексів, мають вигляд потовщень (кілець Бальбіані), які можна спостерігати в електронному мікроскопі. Утворення цих потовщень є функціональним вираженням активності генів певної ділянки хромосоми (Рис. 19).

Встановлено, що у зв'язуванні ферменту з певною ділянкою промоутора задіяні 60 нуклеотидів на структурі ДНК. Вибір ланцюга ДНК в ролі матриці визначається напрямом руху ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази, який залежить від нуклеотидної послідовності промоуторної ділянки. Промоутор орієнтований таким чином, що РНК-полімераза може проводити транскрипцію лише в

одному напрямку $3' \rightarrow 5'$, а синтезовані транскрипти РНК відповідно мають напрям $5' \rightarrow 3'$.

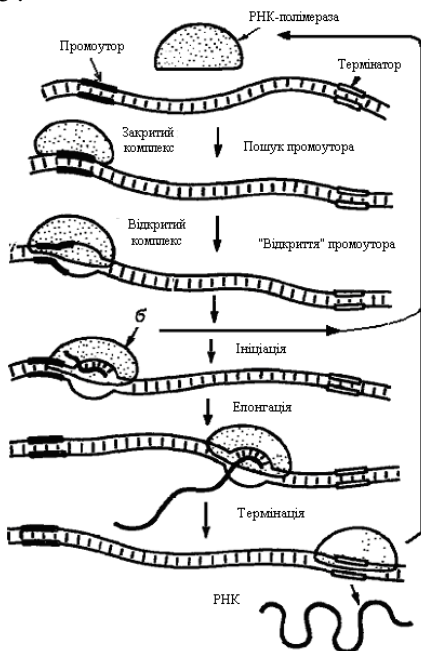


Рис. 19. Етапи транскрипції у клітинах прокаріот (за О. Спіріним).

Після завершення ініціації транскрипції σ -фактор відокремлюється від кор-ферменту і замінюється на фактор елонгації. Наступні етапи синтезу проходять без його участі.

2.2. Елонгація транскрипції

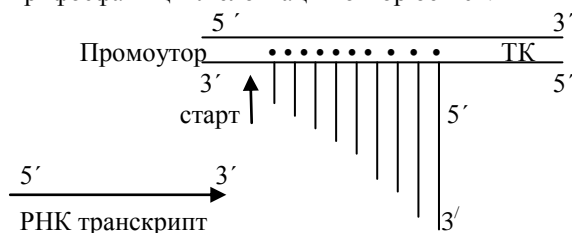
В елонгації транскрипції задіяні два активні центри ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази (Т і Р), які забезпечують комплементарне приєднання рибонуклеозидфосфатів, що надходять із середовища, до мононуклеотидів ДНК матриці.

Спочатку Т-центр ферменту зв'яже $3'$ -ОН групу нуклеозидтрифосфату, захопленого з середовища, який є комплементарним до першого нуклеотиду стартового кодону матричного ланцюга ДНК, та приєднає його водневим зв'язком до комплементарної азотистої основи нуклеотиду, що міститься на матриці (сайті ініціації) без виділення пірофосфату. Тобто, перший нуклеотид транскрибованої іРНК на $5'$ -кінці містить трифосфатне

угруповання. Оскільки сигналом початку ініціації в стартовій точці транскрипції (+1) є триплет ТАЦ на структурі (+)-ланцюга ДНК, то першим нуклеотидом, який приєднується до матриці, буде комплементарний до тимідин-5'-монофосфату аденозин-5'-трифосфат.

Таким чином, на цьому етапі транскрипції, Т-центр ферменту зв'язаний з 3'-ОН групою першого нуклеозид-5'-трифосфату, а Р-центр вільний. Далі Р-центр ферменту захоплює з середовища наступний нуклеозид-5'-трифосфат, який є комплементарним до другого нуклеотиду ініціюючого кодону. За цих умов проходить нуклеофільна атака α -фосфату, принесеного нуклеозид-5'-трифосфату, 3'-ОН групою першого нуклеотиду, зв'язаного з Т-центром ферменту, внаслідок чого утворюється 3'→5'-міжнуклеотидний зв'язок, виділяється пірофосфат та звільняються Т- і Р-центри ферменту.

РНК-полімераза транскокується по матриці в напрямку 3'→5'. Т-центр ферменту зв'язує 3'-ОН групу кінцевого нуклеозид-5'-монофосфату, а Р-центр з середовища захоплює наступний нуклеозид-5'-трифосфат і цикл елонгації повторюється:



У кожному циклі до зростаючого полінуклеотидного ланцюга додається по одному нуклеозидмонофосфату, внаслідок чого ланцюг РНК подовжується в напрямку 5' → 3'. Ріст ланцюга продовжується доки на ділянці оперону не з'являться сигнали термінації, які визначають закінчення синтезу РНК.

Швидкість елонгації складає 30-40 нуклеотидів за секунду і проходить з великою точністю, частота помилок складає $2 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-4}$, тобто на 20 тис. нуклеотидів може включитись один некомплементарний нуклеотид. Кожна транскрибована молекула РНК – це одноланцюгова комплементарна копія порівняно невеликої ділянки плюс-ланцюга ДНК.

2.3. Термінація транскрипції

Завершення транскрипції відбувається за участю специфічних термінуючих чергувань нуклеотидів, „стоп-сигналів”, розміщених на 3'-кінці бактеріальних оперонів. Ділянки термінації багаті ГЦ-парами,

для яких характерна центральна вісь симетрії, а тому вони являють собою самокомплементарні паліндромні послідовності. За цими ділянками на матричному ланцюгу ДНК локалізовані оліго-А-послідовності (4-8 аденилових нуклеотидів).

Транскрипція оліго-А-послідовностей на структурі матричної ДНК призводить до утворення ділянки РНК/ДНК дуплексу, стабілізованого неміцними АУ-парами, що зумовлює руйнування зв'язків між матричним ланцюгом ДНК і молекулою РНК, що транскрибується.

В свою чергу, перед завершенням транскрипції на РНК-транскрипті утворюються елементи вторинної структури у вигляді шпильок, які порушують міцність ДНК/РНК-транскрипту у відкритому промоторному комплексі і видаляють з нього РНК-полімеразу.

Вважають, що в розпізнаванні термінаторів важлива роль належить *білковим факторам термінації (ро-факторам)*, які зв'язуються з ділянкою термінації і приєднуються до РНК-транскрипту перед термінатором. Для ро-фактору характерна АТФ-азна активність, внаслідок чого він може змінювати конформацію ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази та сприяти видаленню його з промоторного комплексу (Рис. 20).

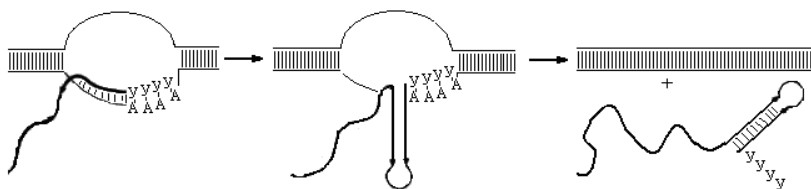


Рис. 20. Термінація транскрипції внаслідок утворення шпильок (за О. Спіріним)

Характерним для транскрипції у прокаріот є те, що цей процес відбувається в ядерній зоні клітини і після його закінчення до іРНК приєднуються рибосоми та розпочинається процес трансляції. Тобто, для них характерним є утворення *транскрипційно-трансляційного комплексу*.

3. Регуляція транскрипції у прокаріот (індукція і репресія)

Протягом тривалого еволюційного розвитку живих організмів, незалежно від рівня їх організації, сформувався складний та узгоджений механізм регуляції процесів життєдіяльності, що забезпечило пристосування їх до різних умов існування. В цьому плані

важливою є регуляція транскрипції, оскільки інтенсивність цього процесу, у значній мірі, впливає на якісний і кількісний склад білків, необхідних для виконання специфічних функцій, від яких залежить спрямованість метаболічних процесів в організмі.

Концепція регуляції транскрипції у прокаріот була розроблена лауреатами Нобелівської премії французькими вченими Ф. Жакобо і Ж. Моно (1961 р.) на основі спостережень за функціонуванням *Ласт-оперону* бактерії *E. coli*. Згідно з цією концепцією регуляція транскрипції відбувається на рівні геномної ДНК, гени якої мають оперонну організацію і містять структурні та регуляторні ділянки. Регуляторні ділянки контролюють функціональну активність структурних генів внаслідок їх „включення” чи „виключення” залежно від потреб клітини в певних генних продуктах. Ці ділянки представлені промотором і геном-оператором, що знаходяться безпосередньо біля групи структурних генів, та геном-регулятором, який локалізований на деякій відстані від них.

Ген-оператор є, специфічним „пусковим механізмом”, який посилює або гальмує функціонування структурних генів. Функції гену-оператора контролюються геном-регулятором. Зв'язок між геном-регулятором і структурними генами забезпечують месенжери-посередники (білки репресори). Назва „білки репресори” пов'язана з тим, що вони гальмують (репресують) активність гена-оператора, внаслідок чого припиняється функціонування всієї групи структурних генів, які знаходяться під їх безпосереднім контролем. Білки-репресори мають високу спорідненість до гена-оператора та здатність до специфічного зв'язування з ним. Крім того, вони можуть зворотно зв'язувати певні низькомолекулярні сполуки, так звані, *індуктори*, або *ефектори*. Білки-репресори можуть перебувати в активному або пасивному стані. Перехід із одного стану в інший регулюється продуктами внутрішньоклітинного метаболізму або субстратами, що надходять із зовнішнього середовища.

Залежно від стану, в якому знаходиться білок-репресор розрізняють індукцибельну і репресибельну системи генної регуляції транскрипції (індукція, репресія).

- При **індукцибельній системі** білок-репресор, що є продуктом транскрипції гена-регулятора, перебуває в активному стані (Рис. 21а). Його вплив на ген-оператор зумовлює блокування оперону та припинення синтезу іРНК і специфічних білків-ферментів. Синтез їх може поновлюватися лише в тому випадку, коли у клітині з'являються субстрати, для перетворення яких необхідні ці ферменти. Білок-репресор сполучається з цими субстратами (індукторами) і втрачає

здатність контролювати ген-оператор, внаслідок чого поновлюється синтез іРНК та відповідних білків-ферментів. Індуктор, який утворює комплекс з білком-репресором, очевидно, зумовлює зміну його третинної структури, внаслідок чого останній втрачає здатність до зв'язування з геном-оператором. За цих умов ген-оператор виходить з-під контролю гена-регулятора, переходить в активний стан та індукуює функціонування блоку структурних генів оперону (Рис. 21б).

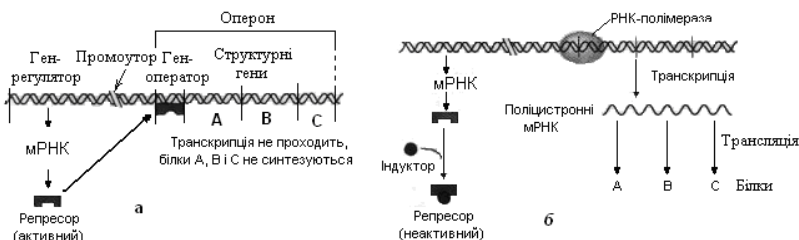


Рис. 21. Механізм індукції транскрипції.

Оскільки білки-ферменти, що синтезуються внаслідок функціонування структурних генів, спрямовані на утилізацію індуктора, білок репресор буде пасивним доки під впливом індуктованих ферментів не відбудеться повне перетворення субстрату (індуктора). Після цього він переходить в активний стан та гальмує ген-оператор. Наслідком цього є припинення функціонування структурних генів і синтезу іРНК, які є матрицями для трансляції білків-ферментів.

Отже, при індукції регулятором транскрипції генів оперону є вихідний субстрат ланцюга ферментативних перетворень (має місце прямий позитивний зв'язок). Суть його в тому, що вихідний субстрат (індуктор) стимулює синтез білків-ферментів, необхідних для його використання. Прикладом індукційної системи регуляції транскрипції може бути синтез у клітинах бактерій *E. coli* ферменту галактозидази, який зумовлює гідроліз молочного цукру (лактози) до глюкози і галактози. Зокрема, було встановлено, що штами бактерій, які в вигляді субстрату для свого росту і розвитку використовують глюкозу, припиняють ріст, якщо потрапляють у середовище, яке містить лактозу (індуктор). Гальмування росту бактерій буде проходити доки не відбудеться індукований лактозою синтез ферменту галактозидази, здатного розщеплювати цей субстрат. Отже, лактоза, що знаходиться в середовищі, виконує роль індуктора, який

сполучається з білком-репресором і розблоковує ген-оператор. За цих умов, на генах поновлюється синтез іРНК, що кодують первинну структуру ферменту галактозидази, трансляція яких далі проходить на рибосомному апараті клітини. Оскільки синтез ферменту відбувається під впливом індуктора, він має назву *індукованого*, а система, в якій проходить цей синтез, дістала назву *індуцибельної*. Тобто за цих умов має місце посилення (індукція) функціонування генів.

- При *репресибельній системі генної регуляції транскрипції* білок-репресор перебуває в пасивному стані і не може впливати на функціонування гена-оператора та групи структурних генів, які знаходяться під його регуляторним впливом (Рис. 22а).

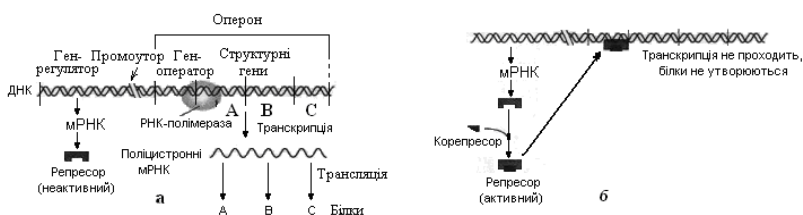


Рис. 22. Механізм репресії транскрипції.

Його активація, блокування гена-оператора та гальмування транскрипції структурних генів відбувається під впливом ко-репресора, який утворює комплекс з білком-репресором. Внаслідок цього білок репресор переходить в активний стан: зв'язується з геном-оператором та блокує його функціонування. Ко-репресорами є кінцеві продукти метаболізму певних субстратів. Блокування гена-оператора припиняється коли вичерпується ко-репресор. За цих умов білок-репресор переходить у пасивний стан, і не виявляє гальмівної дії на ген-оператор та групу структурних генів, що зумовлює поновлення синтезу білків-ферментів (Рис. 22б).

Отже, *при репресії регулятором функціонування генів оперону є кінцевий продукт ланцюга метаболічних перетворень певних субстратів (регуляція за типом негативного зворотного зв'язку)*. В цьому випадку, кінцевий продукт метаболізму гальмує реакції перетворення вихідних субстратів. Значна кількість генів у геномі прокариот постійно знаходиться в активному стані і швидкість їх транскрипції може змінюватися лише спряжено із зміною загального метаболізму клітини.

Такі гени не зазнають вибіркової регуляції внаслідок індукції чи репресії і кодують білки, які є життєвонеобхідними для клітини. Ці

білки, як і гени, що їх кодують, мають назву *конститутивних*. Продуктами конститутивних генів є, зокрема, ферменти метаболізму глюкози у клітинах бактерії *E. coli*. Роль регулятора транскрипції у деяких бактеріальних оперонах може виконувати *аттенуатор*, який локалізований на лідерній зоні оперону, що розміщена перед ініціюючим кодоном першого структурного гена.

При наявності у складі оперону аттенуаторів регулятором транскрипції є не її початок, після зв'язування ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази з (-35)-послідовністю промотора, а закінчення цього процесу на аттенуаторі. Оперони, які в вигляді регулятора транскрипції містять аттенуатор, як правило, контролюють синтез іРНК, які є матрицею для трансляції ферментів синтезу життєвоважливих для бактеріальної клітини сполук, наприклад, незамінних амінокислот.

Така будова характерна, зокрема, для триптофанового оперону (*trp*), генний продукт якого (іРНК) є матрицею для трансляції ферментів синтезу амінокислоти триптофану. Крім індукції і репресії в клітинах прокариот регуляція транскрипції може відбуватися також за участю інших механізмів: внаслідок ефективного зв'язування ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази з промотором, а також транслокації цього ферменту від промоторної ділянки до структурних генів.

4. РНК-залежний синтез ДНК (зворотна транскрипція)

Крім прямої транскрипції, характерної для клітин вищих організмів, внаслідок якої проходить передача генетичної інформації в напрямку ДНК → РНК, в деяких РНК-геномних онкогенних вірусів може відбуватися зворотний процес: передача інформації від РНК до ДНК. Оскільки в цьому випадку, передача інформації відбувається в напрямку протилежному до прямої транскрипції, він дістав назву *зворотної транскрипції*.

Вперше експериментальне підтвердження можливості такого процесу було отримано Г. Темінім і Д. Балтимором (США, 1970 р.). Для перебігу зворотної транскрипції необхідна наявність специфічного ферменту РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази, або ревертази). Цей фермент було виділено з вірусу пташиного мієлобластозу та саркоми Рауса, так званих, ретровірусів, які містять (+) РНК-геноми.

Геномна РНК цих вірусів за будовою нагадує іРНК еукаріотичних клітин: на 5'-кінці міститься „кеп”, а на 3'-кінці – поліаденілова послідовність нуклеотидів. Оскільки в кожному віріоні

Фермент зворотна транскриптаза закодована на гені *pol*: дві його субодиниці формуються внаслідок альтернативного сплайсінгу. Для ферменту характерні два види ферментативної активності: полімеразна (синтез ДНК на матриці РНК) та ендонуклеазна (РНК-азна), що забезпечує руйнування молекули РНК у складі РНК/ДНК-гібриду, який утворюється внаслідок полімеразної реакції.

Для ініціації дії ревертази необхідна присутність затравки, або праймера, роль якого виконує один з видів клітинних тРНК. Ця тРНК на 3'-кінці містить нуклеотидну послідовність комплементарну до 5'-кінця вірусної РНК. За принципом комплементарності, ця ділянка зв'яже тРНК, яка разом з ревертазою міститься у складі віріону та надходить до інфікованої клітини.

Після інфікування клітини ретровірусом, на структурі вірусної (+) РНК синтезується (-) ланцюг ДНК (кДНК). Молекула кДНК переписує інформацію із структури (+) РНК вірусу, яка містить, так звані, довгі кінцеві повтори, $u3'$ та $u5'$ -послідовності нуклеотидів.

Синтез кДНК на структурі матриці, за участю ферменту ревертази, включає кілька етапів. Спочатку за участю тРНК-затравки синтезується короткий фрагмент кДНК. Цей фрагмент являє собою транскрипт, комплементарний до прямих кінцевих повторів (R) $u3$ і $u5$ вірусної РНК.

Утворений на 5'-кінці РНК/ДНК-фрагмент руйнується за участю ендонуклеазної активності ревертази, у зв'язку з чим одноланцюговий 3'-кінець синтезованого фрагменту кДНК може вступати в комплементарну взаємодію з молекулою вірусної РНК, в якій на 3'- і 5'-кінцях містяться аналогічні нуклеотидні послідовності (R).

На наступному етапі РНК-залежного синтезу ДНК роль матриці виконує 3'-кінець синтезованого фрагменту кДНК (-) ланцюга, який приєднаний до R-послідовності на 3'-кінці вірусної РНК.

Ця матриця використовується для транскрибування вірусного (+) ланцюга РНК та утворення (-) ланцюга кДНК, на структурі якого закодована інформація, отримана від (+) РНК вірусу. Синтезований (-) ланцюг ДНК виконує роль матриці для синтезу матричного (+) ланцюга ДНК. Далі ланцюг РНК-ової структури (вірусної РНК), як і тРНК-затравка, руйнуються внаслідок ендонуклеазної активності ревертази.

Синтезована за участю ревертази дволанцюгова молекула ДНК, що містить плюс- і мінус-ланцюги, потрапляє до ядерного апарату клітини-реципієнта, де за участю комплементарних сайтів ДКП та ферменту інтегрази вірусної часточки формується кільцева форма ДНК:



Фермент інтеграза забезпечує включення ДНК, яка несе інформацію про вірусний геном, до ДНК інфікованої клітини. Інтегрована ДНК може тривалий час знаходитися у складі хромосоми клітини-реципієнта у вигляді провірусу без будь-яких проявів патогенності.

У випадку транскрипції ділянки ДНК клітини-хазяїна, до складу якої була інтегрована ДНК-ова копія вірусного геному та наступної трансляції, можливий розвиток вірусної інфекції.

Первинні транскрипти вірусу, як і транскрибована РНК клітини-реципієнта, зазнають посттранскрипційної модифікації (процесінгу і сплайсінгу), крім РНК, яка включається до складу віріону.

У геномі людини і вищих хребетних міститься велика кількість інтегрованих вірусів (SV40, аденовіруси, вірус герпесу, гепатиту В і С та інші), які за певних умов можуть провокувати розвиток захворювань.

Дослідженнями останніх років було встановлено, що для знешкодження особливо небезпечних інтегрованих вірусів, зокрема, вірусу простого герпесу, який паразитує в нервових клітинах, важливим є „провокування” його функціонування у клітині, оскільки саме в цей час вірусна інфекція найкраще піддається лікуванню.

На структурі геномної ДНК вищих організмів виявлено специфічні онкогени (ons-гени), що являють собою геноми вірусів. Гени інтегрованих ретровірусів дістали назву V-ons. Сайти ДНК в геномах еукаріот, що містять гомологічні нуклеотидні послідовності до V-ons, дістали назву C-ons-генів.

ТЕМА: ТРАНСКРИПЦІЯ В КЛІТИНАХ ВИЩИХ ЕУКАРІОТ

План

1. Особливості транскрипції в клітинах вищих еукаріот.
2. Посттранскрипційна модифікація первинних транскриптів (процесінг РНК).
 - 2.1. Процесінг пре-іРНК.
 - 2.2. Процесінг пре-рРНК.
 - 2.3. Процесінг пре-тРНК.
3. Регуляція транскрипції генів у клітинах еукаріот.

Основна література: [1, с. 331-358]; [2, с. 261-295]; [3, с. 125-135].

Додаткова література: [1]; [2]; [3]; [4]; [6]; [19].

1. Особливості транскрипції в клітинах вищих еукаріот

Загальний механізм транскрипції у клітинах вищих еукаріот подібний до цього процесу в клітинах інших організмів. Одночасно з цим, існують специфічні особливості цього процесу, зумовлені організацією геному, специфічною будовою генів та механізмів їх регуляції:

- для геному вищих еукаріот не характерна оперонна організація генів, а поняття „оперон” для них має відносне значення, у зв’язку з чим, існують певні особливості початку і перебігу окремих етапів транскрипції та її закінчення, а також регуляції функціональної активності генів;

- транскрипція розпочинається на сайтах ДНК, які містять специфічні чергування нуклеотидів (ТАТА мотиви) та ініціюючий кодон ТАЦ. Для рРНК такими сайтами є ділянки ДНК ядерцевих організаторів, для іРНК і тРНК, відповідно, унікальні та помірні повтори нуклеотидів;

- для зв’язування ферменту ДНК-залежної полімерази, який розпочинає транскрипцію, використовуються короткі послідовності нуклеотидів (мотиви), які знаходяться на певній відстані від стартового ініціюючого кодону;

- транскрипція у клітинах еукаріот проходить за участю не одного ферменту, як у прокаріот, а трьох різних ДНК-залежних РНК-полімераз: I(A), II(B), III(C). Перший фермент забезпечує синтез 25S і 18S рРНК, другий – іРНК, а третій – тРНК і 5S рРНК. Кожен із

вказаних ферментів транскрибує різні сайти ДНК, на яких закодована специфічна генетична інформація;

- жоден із вказаних ферментів не може самостійно зв'язуватися з відповідними сайтами початку транскрипції, для цього використовуються специфічні для кожного з них білкові фактори (TF-фактори): TF-I, TF-II, TF-III, які одночасно забезпечують і її регуляцію;

- безпосередні генні транскрипти клітин еукаріот моноцистронні і є продуктом не одного, а кількох генів, які можуть бути локалізовані на різних ділянках однієї хромосоми, чи на різних хромосомах. Це, зокрема, характерне для транскриптів іРНК олігомерних білків;

- в геномі еукаріот наявні “розірвані гени”, які містять інформативні ділянки – екзони та неінформативні – інтрони, що характерно для іРНК та тРНК;

- внаслідок транскрипції утворюється гетерогенна ядерна РНК, яка включає суму всіх первинних транскриптів;

- первинні транскрипти іРНК еукаріот являють собою комплементарні копії матричного ланцюга, які не можуть бути безпосередньо використані для трансляції генетичної інформації. У зв'язку з цим, вона зазнає специфічної постреплікативної модифікації – процесінгу або дозрівання;

- процесінг включає: рестрикцію, сплайсінг і модифікацію, які відбуваються за участю специфічних ферментів. Внаслідок цього, утворюються зрілі молекули РНК, здатні до виконання специфічних функцій;

- перебіг процесінгу різних генних продуктів (іРНК, тРНК, рРНК) має певні особливості, зумовлені їх структурно-функціональними особливостями;

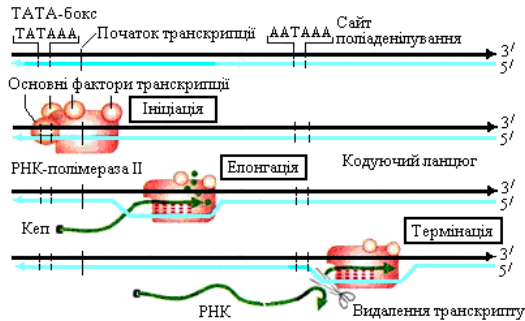
- для транскриптів іРНК характерні різні види сплайсінгу: аутосплайсінг, альтернативний та транссплайсінг;

- після дозрівання, молекули РНК в складі рибонуклеопротеїнових комплексів (інформосом) надходять до цитоплазми клітин де виконують специфічні функції в процесі трансляції генетичної інформації;

- на відміну від прокаріот, в яких ініціація транскрипції розпочинається із розпізнавання ферментом ДНК-залежною РНК-полімеразою ТАТА-последовностей боксу Прибнова, що міститься на промоторі, в клітинах еукаріот цей процес відбувається на промоторній ділянці генів де містяться специфічні чергування нуклеотидів;

- для ініціації транскрипції необхідна присутність специфічних білкових факторів;
- перебіг транскрипції, зокрема, ініціації залежить від взаємодії транскрипційних факторів з енансерами певного гену.

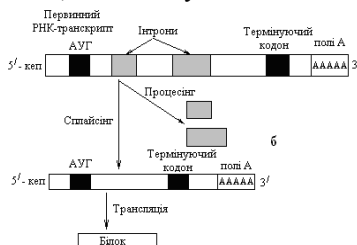
Транскрипція у клітинах еукаріот, як і у прокаріот, також включає: ініціацію, елонгацію і термінацію. Ці процеси відбуваються за схемою, подібною до відповідних етапів транскрипції у клітинах прокаріот:



Суть ініціації транскрипції полягає у приєднанні відповідного ферменту до сайту початку транскрипції на матричному ланцюгу ДНК та утворенні відкритого промоторного комплексу. На етапі елонгації транскрипції проходить подовження ланцюга молекули РНК і завершується після досягнення сайту термінації, що містить специфічні паліндромні послідовності нуклеотидів.

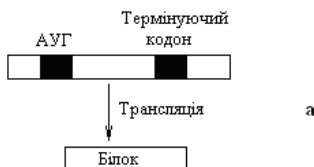
2. Посттранскрипційна модифікація первинних транскриптів (процесінг різних видів РНК)

Для утворення інформативних молекул РНК, здатних виконувати специфічні функції, необхідним є перетворення первинних транскриптів у функціонально зрілі молекули, що відбувається в результаті *процесінгу або дозрівання*. Як вказувалося раніше, суть цього процесу в модифікації певних залишків нуклеотидів на 3'- і 5'-кінцях молекули, рестрикції, сплайсінгу.



У прокариот дозрівання характерне лише для первинних транскриптів рРНК і тРНК, оскільки поліцистронні іРНК цих організмів не містять інтронів, і можуть безпосередньо використовуватися для трансляції, оскільки ці процеси не розділені у просторі і часі та можуть відбуватися одночасно.

Тобто, в клітинах прокариот іРНК без попередньої посттранскрипційної модифікації транслюється з утворенням відповідних генних продуктів:



В клітинах еукаріот, враховуючи особливості організації їх геному, всі види первинних транскриптів, які утворюються в ядерному апараті, повинні зазнавати посттранскрипційної модифікації. Перебіг цих процесів має певні особливості для кожного з видів РНК клітини.

2.1. Процесінг пре-іРНК

Для формування функціонально зрілих молекул іРНК необхідним є видалення інтронів та з'єднання екзонних ділянок, а також проведення специфічної модифікації окремих нуклеотидних залишків на 5'- і 3'-кінцях молекул. Це забезпечує функціонування зрілої іРНК в цитоплазмі та виконання нею специфічних функцій.

Тобто, функціонально зріла молекула іРНК, яка у клітинах еукаріот є моноцистронною, повинна містити лише інформативні та регуляторні ділянки, які під час трансляції забезпечують синтез специфічних генних продуктів. Регуляторні ділянки транскрибуються але не транслюються.

Процес посттранскрипційної модифікації пре-іРНК еукаріот включає вирізання інтронів та з'єднання екзонів, а також специфічну модифікацію 3'- і 5'-кінців молекули. У цих процесах задіяні специфічні ферменти, для яких характерні різні види ферментативної активності (рестриктазна, лігазна, АТФ-азна, ендо- і екзонуклеаза), а також особливий вид РНК, локалізований в ядерному матриксі – *малі ядерні РНК* (мяРНК). Ці РНК мають специфічну первинну структуру (багаті уридилловими нуклеотидами), у зв'язку з цим їх позначають U-РНК. Кількість U-РНК у клітинах еукаріот може бути різною. Зокрема, у дріжджових клітинах присутні 25 різних видів U-РНК. У клітинах

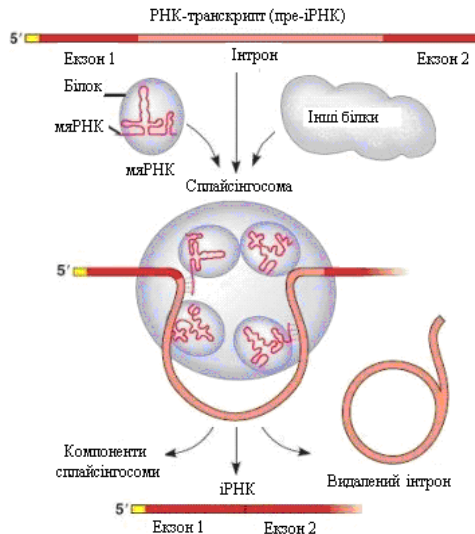
вищих організмів міститься близько 15 видів U-РНК. U-РНК містять від 5 до 1 000 нуклеотидів.

В ядерному апараті клітин еукаріот мяРНК утворюють комплекси із специфічними фібрилярними білками, тобто існують у вигляді рибонуклеопротеїнових комплексів (мяРНП). Ці комплекси дістали назву *сплайсінгосом*. Окремі сплайсінгосоми – це еліпсоїдні часточки, до складу яких входять кілька видів мяРНК. У ссавців до складу сплайсінгосом входять РНК U1, U2, U4, U5, U6.

За участю сплайсінгосом відбувається рестрикція і сплайсінг – вирізання інтронів та зшивання екзонів з первинних транскриптів пре-іРНК. Внаслідок комплементарної взаємодії мяРНК з інтронними ділянками пре-іРНК проходить зближення кінців екзонів та формування петлеподібних структур типу „ласо”, на структурі яких можуть бути присутні неканонічні зв’язки між парами азотистих основ нуклеотидів: двома гуаніловими нуклеотидами, що містяться на 5' і 3' ділянках сплайсінгу.

При зближенні екзонів відбувається розрив фосфодієфірного зв'язку між першим екзоном і 5'-кінцем інтрону, який далі взаємодіє з аденіновим нуклеотидом і утворює на інтроні специфічну петлю. Звільнений за цих умов 3'-ОН кінець першого екзону розрізає 3'-ділянку сплайсінгу, видаляє інтрон і з'єднує екзони. Внаслідок цього утворюється зріла молекула іРНК.

Загальна схема процесінгу пре-іРНК за участю сплайсінгосоми має такий вигляд:



Для пре-іРНК характерний також *альтернативний сплайсінг*, суть якого в утворенні іРНК, різних за первинною структурою, з однієї і тієї ж пре-іРНК, яка є продуктом одного гену, внаслідок комбінування локалізації та кількості екзонів.

За механізмом перебігу альтернативний сплайсінг може бути: касетний, взаємовиключаючий, із внутрішнім акцепторним сайтом та з використанням альтернативних промоуторів.

У клітинах еукаріот альтернативний сплайсінг сприяє ефективній регуляції активності генів та є одним з механізмів синтезу ізоформ ферментів, оскільки дає змогу синтезувати на одному гені різні білки за первинною структурою і властивостями. Такі гени кодують білки із специфічними функціями (імуноглобуліни, пептидні гормони, ряд фібрилярних білків, тощо).

Сплайсінг первинних транскриптів може проходити і без участі сплайсінгосом. Цей вид сплайсінгу дістав назву *аутосплайсінгу*, який відбувається за принципом „сам себе модифікую”, тобто внаслідок власної ферментативної активності молекул РНК (рибозимаз). Суть цього виду сплайсінгу в тому, що інтронні ділянки кодують рибозимази – РНК-ферменти, які проводять сплайсінг і виконують роль сплайсінгосом. Існує три групи інтронів, що кодують рибозимази (I, II і III). Рибозимази II і III групи виконують роль сплайсінгосом без залучення інших білків.

Аутосплайсінг було відкрито Т. Чеком (1982 р.), який досліджував процесінг первинних транскриптів в інфузорії *Tetrachylena thermophyla*.

Описані вище види сплайсінгу, як правило, стосуються процесінгу однієї молекули іРНК. Одночасно з цим, було встановлено наявність у клітинах еукаріот *транс-сплайсінгу*, суть якого в утворенні зрілих молекул іРНК внаслідок з'єднання фрагментів, транскрибованих на різних генах. Ці гени можуть знаходитися поруч, або на різних ділянках ДНК і навіть на різних хромосомах.

Цей вид сплайсінгу було виявлено в одноклітинних еукаріотичних організмів – трипанозом. іРНК трипанозом, які кодують білки цитоскелету (тубуліни), утворюються внаслідок сплайсінгу фрагментів іРНК, транскрибованих з „мініекзонів”, що включають до 35 н.п., з екзонами центральної ділянки іРНК, розміщеними на різних хромосомах.

Наявність різних видів сплайсінгу, характерних для генних продуктів еукаріот, створює можливість утворення різноманітних популяцій клітинних іРНК, які транскрибуються з обмеженої кількості генів.

Після сплайсінгу пре-іРНК проходить модифікація 5' та 3'-кінців зрілих транскриптів: кепування і метилювання 5'-кінця та поліаденілування 3'-кінця.

„Кеп” (*Catabolic gene activite protein* – активатор катаболічного гену) містить три метильованих нуклеотиди, першим з яких є 7-метилгуанозинтрифосфат, з'єднаний з рештою нуклеотидів не 5' → 3', а 5' → 5' фосфодієфірним зв'язком.

Функція „кепу” полягає у захисті іРНК від дії цитоплазматичних ферментів та забезпеченні утворення комплексу з певною ділянкою рибосоми під час трансляції.

Суть поліаденілування в тому, що до 3'-кінця іРНК приєднується поліаденілова послідовність – фрагмент, що містить 150-200 залишків аденілової кислоти внаслідок нематричного синтезу з використанням рибонуклеозиддифосфатів. Цей фрагмент необхідний для зв'язування із специфічним білком, який забезпечує перенесення іРНК в цитоплазму у вигляді інформосоми, а також підвищує стійкість іРНК.

Крім того, поліА-послідовність визначає тривалість функціонування іРНК у цитоплазмі, де вона виконує роль матриці під час трансляції генетичної інформації. Тобто, визначає кількість циклів транслокації іРНК через рибосомний апарат у процесі білкового синтезу. Поліаденілування не характерне для гістонової іРНК.

2.2. Процесінг пре-рРНК

У клітинах прокаріот всі три види рРНК 23S, 16S і 5S утворюються з одного первинного транскрипту – 30S рРНК ($M = 2 \cdot 10^6$ Да). Процесінг пре-рРНК включає секвенування первинного транскрипту та утворення зрілих рРНК, а також метилювання окремих азотистих основ нуклеотидів.

Під час процесінгу рРНК у прокаріот спочатку утворюються два транскрипти - 17S і 25S, від яких, далі, за участю нуклеаз, відщеплюється ще певна кількість нуклеотидів, внаслідок чого формуються зрілі молекули 16S і 23S рРНК. Низькомолекулярна 5S рРНК формується окремо на 3'-кінцевій ділянці пре-рРНК.

У еукаріот пре-рРНК є продуктом транскрипції чисельних генів, що локалізовані в структурі ДНК ядерцевих організаторів у вигляді кластерів (тандемних повторів), які транскрибуються синхронно. Внаслідок транскрипції цих ділянок ДНК, утворюються різні види рРНК, що використовуються для формування рибосом.

Первинний транскрипт рРНК еукаріот являє собою 45S рРНК і містить нуклеотидні послідовності 18S, 28S, 5,8S рРНК, які розділені

спейсерними ділянками. Зрілі рРНК утворюються внаслідок відщеплення фрагментів від 3' і 5'-кінців первинного транскрипту.

У нижчих еукаріот, а також у генах рРНК мітохондрій, хлоропластів, дріжджів, гени рРНК містять специфічні інтрони (інтрони групи 1), які можуть забезпечувати аутокаталітичний сплайсінг, тобто виконують роль РНК-ферментів рибозимаз.

2.3. Процесінг пре-тРНК

Пре-тРНК в еукаріот є продуктом транскрипції генів, локалізованих на помірних повторах нуклеотидів, за участю РНК-полімерази III. Молекула пре-тРНК містить інтронну ділянку поблизу антикодону, яка видаляється за участю специфічного ферменту, для якого характерні кілька видів ферментативної активності: нуклеаза, лігаза та кіназа. Фермент забезпечує вирізання інтрону і з'єднання кінців екзону та формування зрілої молекули тРНК.

Тобто, зріла молекула тРНК утворюється з полінуклеотидних ланцюгів пре-тРНК шляхом ферментативного вирізання та видалення зайвих нуклеотидів з 5'- і 3'-кінців молекули. У багатьох випадках з однієї молекули пре-тРНК утворюється дві і більше молекул тРНК.

Далі проходить модифікація 3'-кінця (акцепторного стебла) молекул тРНК внаслідок приєднання ЦЦА-последовностей нуклеотидів за участю ферменту полінуклеотидилдифосфаттрансферази, або термінальної РНК-синтетази. Цей фермент, який було виділено М. Грюнберг-Манаго і С. Очоа (1955 р.) із азотобактера, забезпечує нематричний синтез полірибонуклеотидів з нуклеозид-5'-дифосфатів.

Фермент не володіє абсолютною субстратною специфічністю, що дає можливість отримати полінуклеотиди будь-якої первинної структури. За участю цього ферменту, до 3'-кінця тРНК (акцепторного стебла) приєднується ЦЦА-последовність, яка присутня на 3'-кінці всіх видів тРНК. До кінцевого аденілового нуклеотиду ЦЦА-последовності приєднуються амінокислоти під час рекогніції.

Процесінг тРНК включає також такий важливий процес як *редакування*, суть якого в модифікації азотистих основ нуклеотидів (метилуванні, дезамінуванні, відновленні, тощо).

Редакування забезпечує модифікацію азотистих основ у складі дигідроуридилової та псевдоуридилової петлі молекул тРНК, яким належить важлива роль у забезпеченні специфічних функцій у процесі трансляції.

3. Регуляція транскрипції генів у клітинах еукаріот

Враховуючи багаторівневу компактизацію молекули ДНК у хроматині еукаріотичних клітин, процес регуляції транскрипції в них може реалізуватися як на рівні хроматину (загальна, або тотальна регуляція транскрипції), так і на рівні окремих сайтів ДНК.

• *Регуляція транскрипції на рівні ДНК*

Важливим фактором регуляції транскрипції у клітинах еукаріот є компактизація ДНК – укладання її у складі хроматину, який може бути: конденсованим (гетерохроматин) і розрихленим (еухроматин). Конденсований хроматин, як правило, не транскрибується, в той час як для еухроматину характерна висока інтенсивність транскрипції. В еухроматині еукаріот гени локалізовані на петлеподібних доменах, довжиною від 20 до 200 тис. н.п., які є самостійними функціонально незалежними ділянками і можуть включати один або декілька генів. Між окремими петлями хроматину розміщені специфічні чергування нуклеотидів, які отримали назву *інсуляторів* (він англ. *insulate* - ізолювати). З інсуляторами можуть зв'язуватися специфічні білки, що зумовлює посилення чи послаблення впливу регуляторних ділянок однієї петлі хроматину на експресію генів іншої.

У регуляції транскрипції важливою є також локальна деконденсація окремих ділянок хроматину під впливом специфічних ферментів (ДНК-аз I), які можуть зв'язуватися з ДНК і сприяти перебігу транскрипції. В окремих генах виявлено декілька сайтів, чутливих до дії ДНК-ази I, які утворюють, так звані, активний еухроматин. При порушенні суперспіральної структури хроматину проходить його декомпактизація та послаблюється зв'язок ДНК з Н1. Звільнені від Н1 ділянки ДНК можуть інтенсивно транскрибуватися, оскільки значно зростає можливість зв'язування їх з ферментом ДНК-залежною РНК-полімеразою.

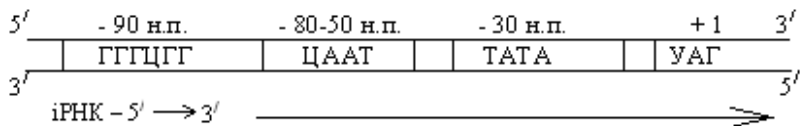
Крім Н1 у регуляції транскрипції задіяні також інші білки, які утворюють гістоновий кор та регулюють ініціацію транскрипції: вибіркоче включення ТАТА-боксів, що блокує функціонування ДНК-залежної РНК-полімерази. Якщо утворення нуклеосом проходить на кодуючих ділянках генів, то транскрипція не блокується, оскільки гістони порушують зв'язування основних білкових факторів транскрипції (базальних факторів) з ДНК.

Білки, які є активаторами транскрипції конкурують з гістонами за зв'язок з ДНК. Послаблення зв'язування гістонів з ДНК відбувається за участю білків активаторів одного із доменів гістону Н4, який має ацетилований N-кінець, що знижує його позитивний заряд та сприяє зміні конформації. Це, у свою чергу, послаблює його зв'язок з Н2А і

H2В та дестабілізує нуклеосому. ДНК за цих умов стає доступною для зв'язування з базальними факторами транскрипції.

- **Регуляція транскрипції на рівні генів.**

Для еукаріотичних генів, що кодують білки, характерна складна структура регуляторних ділянок, які впливають на процес транскрипції. Ці ділянки містять специфічні короткі нуклеотидні послідовності, так звані, *мотиви*. Так, на відстані 27-30 н.п. від старту транскрипції (+1) міститься ТАТА-мотив, який визначає місце початку транскрипції (5'-кінець транскрипту). Крім цього мотиву присутні ще два: ЦЦААТ і ГГГЦГГ. Перший, ЦА-мотив знаходиться на відстані 50-80 н.п. від точки ініціації, а другий, ГЦ-мотив – на відстані 90 н.п. Ці мотиви необхідні для зв'язування ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази та ініціації транскрипції структурних генів:



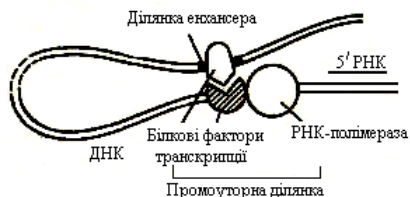
ЦА-мотиви зустрічаються на регуляторних ділянках різних тканинно-специфічних білків (глобінів, актину, тиреоглобуліну), а ГЦ-мотиви – на ділянках генів, що забезпечують синтез специфічних білків-ферментів. Кількість вказаних мотивів у складі регуляторних ділянок різних генів може складати від 2 до 9. У генах, що кодують адаптивні білки, синтез яких посилюється під впливом різних факторів, у складі регуляторних ділянок містяться характерні короткі послідовності, що включають від 4 до 9 нуклеотидів. Так, у гені білків теплового шоку (шаперонів) дрозофіли наявні ЦТЦГ- і ГТТГ-мотиви, а в генах металопротеїнів відповідно ТГЦГЦТЦГГ-мотив. Регуляторні ділянки еукаріотичних генів забезпечують синтез специфічних транскрипційних факторів, які пізнають специфічні сайти зв'язування і взаємодіють як один з одним, так із ДНК-залежною РНК-полімеразою.

Регуляцію транскрипції у клітинах еукаріот на рівні промоторних ділянок генів можуть забезпечувати білки активатори транскрипції, або транскрипційні фактори. До них належать, в першу чергу, загальні фактори транскрипції ІF-I, ІF-II, ІF-III, які необхідні для зв'язування ДНК-залежної РНК-полімерази з сайтом ініціації промоторної ділянки багатої АТ-парами. Ці фактори необхідні для перебігу транскрипції будь-якого функціонуючого гену. Інші транскрипційні фактори підвищують активність лише окремих генів.

У промоторній ділянці генів виявлено специфічні чергування нуклеотидів, які можуть посилювати або послаблювати транскрипцію

незалежно від їх орієнтації по відношенню до сайту ініціації транскрипції та зберігати цей вплив на певній відстані від нього. Ці регуляторні елементи отримали назву *енхансерів* (підсилювачів) та *сейленсерів* (послаблювачів). Тобто, енхансери і сейленсери – це специфічні сайти на структурі геномної ДНК, які являють собою чергування нуклеотидів (модулі), що виявляють дистантну дію на процес транскрипції. Вони можуть бути локалізовані на різних ділянках геному і включають декілька десятків нуклеотидних пар. Особливістю енхансерів і сейленсерів є те, що вони можуть знаходитися на інтронних ділянках окремих генів (імуноглобулінів, колагену) та перед промоуторною ділянкою (алкогольдегідрогеназа дрозофіли).

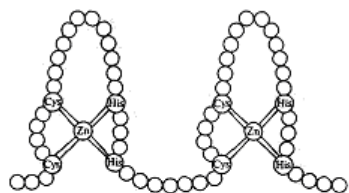
Регуляторний вплив енхансерів і сейленсерів на функціонування генів може реалізовуватися різними шляхами. Найчастіше це відбувається внаслідок зміни конформації суперспіралізованих петель хроматину та порушення локальної структури фрагментів ДНК, на яких локалізовані окремі гени. В цьому випадку енхансери зв'язують специфічні білкові фактори (топоізомерази) та посилюють їх вплив на певні ділянки хроматину. Контакт енхансера з промоуторною ділянкою гену відбувається внаслідок утворення петлеподібних структур:



- **Регуляція транскрипції за участю специфічних ферментів та білкових факторів.** Цей вид регуляції в клітинах еукаріот має важливе значення, оскільки забезпечує безпосередній вплив на ініціацію транскрипції і може як посилювати, так і послаблювати її перебіг. Як правило, це відбувається внаслідок зв'язування енхансерів та сейленсерів з факторами ініціації транскрипції, в першу чергу, ферментом ДНК-залежною-РНК-полімеразою на промоуторній ділянці генів. За участю ДНК-залежних РНК-полімераз у клітинах еукаріот може проходити регуляція трьох груп генів, при транскрипції яких утворюються різні генні продукти – іРНК, рРНК та тРНК. Транскрипція цих генів відбувається різними ДНК-залежними РНК-полімеразами за участю специфічних білкових факторів, які взаємодіють з характерними для кожної групи генів регуляторними

елементами ДНК. Тандемна організація рибосомних генів, які розділені спейсерами, де локалізовані регуляторні сайти транскрипції, забезпечує їх ефективне зчитування, оскільки, всі компоненти системи регуляції зосереджені на одній структурі – ядерцевому організаторі.

Транскрипція генів тРНК і 5S рРНК за участю РНК-полімерази III також регулюється специфічними транскрипційними елементами, локалізованими серед генів. Ці елементи зв'язують білки-регулятори транскрипції. Найкраще вивченим є білковий фактор транскрипції ТФІІІА. Цей фактор зв'язується з внутрішньою ділянкою гену 5S рРНК та приєднує ще два регуляторних білки і ДНК-залежну-РНК-полімеразу.

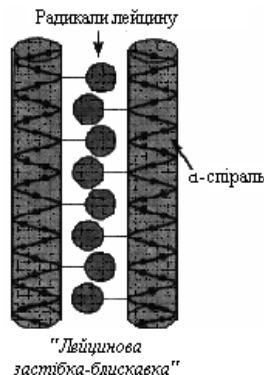


"Цинкові пальці"

Фактор транскрипції ТФІІІА має доменну структуру: молекула містить 9 доменів (пальців), що включають інваріантні послідовності амінокислот, до складу яких входять по два залишки цистеїну і гістидину, зв'язаних з йонами Цинку (*цинкові пальці*).

Кількість цих структур у різних білків може варіювати від 3-4 до кількох десятків. Такі регуляторні структури характерні для великої кількості рецепторних білків, зокрема, рецепторів стероїдних гормонів. Після зв'язування з гормоном рецептор за допомогою цинкових пальців взаємодіє з певними енхансерами на структурі ДНК, внаслідок чого змінюється транскрипційна активність окремих генів.

Подібну функцію виконують також білки, молекули яких містять „лейцинові блискавки”. Молекули цих білків складаються з двох субодиниць, стабілізованих силами Ван-дер-Ваальса (гідрофобною взаємодією між радикалами лейцину). Зв'язування цих білків з окремими ділянками ДНК відбувається внаслідок іонної взаємодії діаміномонокарбонових кислот (лізину і аргініну) з сахарофосфатним остовом ДНК. Локуси ДНК, які розпізнаються регуляторними білками мають специфічну просторову структуру, яка забезпечує утворення комплексів з білками



"Лейцинова застібка-блискавка"

регуляторами транскрипції, що містять *гомеодомени*. Вони є продуктом генів, що відповідають за ембріональний розвиток (гомейотичних генів). Ці білки регулюють розвиток організму внаслідок включення одних і виключення інших генів.

Відомо, що *домени* – це фрагменти структури білкових молекул, для яких характерна певна структурна та функціональна автономія, і, одночасно з цим, вони володіють властивостями всієї молекули. Доменні структури, як правило, сполучені між собою лінкерними зонами.

Окремі домени, що кодуються на структурі ДНК, розділені інтронами. Екзони гомейотичних генів, в яких закодована інформація про гомеодомени, мають назву *гомеобоксів*. До складу гомеодоменів входить 50-60 амінокислотних залишків, які організовані в вигляді мотиву (α -спіраль-поворот- α -спіраль). Саме одна з α -спіралей взаємодіє з певними ділянками ДНК гетерохроматину. Гомеодомени цих білків, як правило, виявляють вплив на активність певної групи генів еукаріотичних клітин: можуть змінювати просторову структуру хроматину хромосом (перехід із стану гетерохроматину в еухроматин).

Ще одна група білків, які регулюють транскрипцію, має назву *коактиваторів CBP і P300*. Комплекс цих білків забезпечує регуляцію транскрипції внаслідок ацетилювання октету гістонів у складі нуклеосом, що зумовлює їх часткову дестабілізацію та формування нативного ініціаторного комплексу.

Вважають, що суттєвіший вплив на регуляцію транскрипції виявляють специфічні коактиватори, дія яких реалізується внаслідок зв'язування з енхансерами. Зміна активності генів за участю енхансерів, сайленсерів, ЦААТ і ТАТА-боксів промоторних ділянок (адапторних елементів) дістала назву *адапторного механізму регуляції*. Адапторні елементи можуть знаходитися на різній відстані від промоторної ділянки генів. Вони чутливі до дії стероїдних гормонів, глюкокортикоїдів, реагують на тепловий шок, дію йонів металів та хімічних сполук (діоксинів).

Таким чином, порівняно з прокаріотами, регуляторні механізми транскрипції в еукаріот значно складніші і різноманітніші, що зумовлено особливостями структурної організації геномної ДНК еукаріотичних клітин.

ТЕМА: РЕАЛІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ. МАТРИЧНИЙ СИНТЕЗ БІЛКА

План

1. Передумови формування поняття про матричний синтез білка.
2. Молекулярні механізми передачі та реалізації генетичної інформації (генетичний код).
3. Характеристика компонентів білоксинтезуючої системи.

Основна література: [1, с. 362-376]; [2, с. 296-297]; [3, с. 91-94; 124-125].

Додаткова література: [1]; [2]; [3]; [5]; [22]; [25].

1. Передумови формування поняття про матричний синтез білка

Трансляція генетичної інформації – це третій вид матричного синтезу, який характеризується напрямком передачі генетичної інформації (іРНК → білок), видом матриці (іРНК) та способом її використання (переведення за принципом комплементарності). Основні етапи та механізми матричного синтезу білка було докладно вивчено у клітинах бактерії *E. coli*.

З'ясування механізмів матричного синтезу білка тривалий час складало одну з найважливіших проблем біохімії, молекулярної біології та біологічної науки взагалі. Ця проблема протягом тривалого часу знаходилася в центрі уваги досліджень багатьох поколінь генетиків та молекулярних біологів. Важливість її зумовлена тим, що білки є основою структури та основою обміну в живих організмах, у зв'язку з чим з'ясування механізмів їх синтезу та послідовності подій, які відбуваються за цих умов в потаємних кампартментах клітини, було рівноцінне розгадці таємниць життя.

Перші спроби з'ясування механізму синтезу білків було зроблено О. Данилевським (1886 р.), який висловив припущення про можливість синтезу білкових молекул внаслідок *зворотного протеолізу* – зворотної дії протеолітичних ферментів (*proteous* - білок, *lisis* - розклад).

О. Данилевський інкубував білки у присутності шлункового соку при рН 1,5-2,0, внаслідок чого, через деякий час в інкубаційному середовищі відбувалося розщеплення їх на фрагменти певної довжини – пептиди або пептони. При підвищенні рН середовища до 5,0 випадав

осад білковоподібних сполук (пластеїнів), які за деякими властивостями і ознаками нагадували досліджувані білки.

Однак, як виявилось пізніше, цей процес не може мати суттєвого значення для синтезу білків у клітинах живих організмів, оскільки анаболічні та катаболічні реакції в них хоч і спряжені, але реалізуються не лише різними шляхами, а й за участю різних ферментів і часто розділені у просторі та часі. Разом з тим, слід підкреслити, що синтез пластеїнів шляхом зворотного протеолізу, інколи, використовують при виділенні білків з нехарчової сировини для промислових та сільськогосподарських потреб.

Значний внесок у з'ясування проблеми білкового синтезу було зроблено Е. Фішером, який провів хімічний синтез олігопептиду, що містив 18 залишків амінокислот, при використанні реакції поліконденсації.

Згодом було синтезовано пептиди значно складнішої будови, однак жоден з них не володів біологічною активністю. Виявилось, що з'єднати хімічним способом амінокислоти, які містять реакційноздатні групи, не складає певних труднощів, однак забезпечити синтез нативних молекул білка, з властивою для них біологічною активністю, справа значно складніша. Крім того, щоб змодельювати цей процес поза організмом, необхідно, перш за все, з'ясувати особливості його перебігу в живих організмах, на що було витрачено зусилля кількох поколінь вчених біохіміків і молекулярних біологів.

У 50-х роках ХХ ст. В. Орехович запропонував гіпотезу синтезу білків внаслідок реакції транспептидування, суть якої в перенесенні олігопептидів із специфічних субстратів на реакційноздатні функціональні групи амінокислот з наступним об'єднанням їх у поліпептидному ланцюгу. Незважаючи на те, що ця гіпотеза не отримала експериментального підтвердження, вона дала підстави зробити важливий висновок щодо можливості транслокації на NH_2 -групу амінокислот аміноацильних і пептидильних угруповань. Саме такий механізм лежить в основі реакцій транспептидування, характерних для одного з етапів білкового синтезу в живих організмах.

Близькою до істини була також гіпотеза, сформульована О. Браунштейном, в якій висловлювалося припущення про необхідність для забезпечення синтезу білка наявності джерела енергії у вигляді АТФ, а також активованих амінокислот та кількох видів нуклеїнових кислот.

Одночасно з цим, дослідження механізмів білкового синтезу на науковому рівні стало можливим лише після того, коли було нарешті

вирішено проблему, яка стосувалася шляхів і напрямків передачі генетичної інформації у клітині.

Для її вирішення необхідно було, перш за все, дати відповідь на ряд запитань:

- де закодована генетична інформація та які напрямки її передачі?
- за участю яких структур у живих клітинах відбувається запрограмований синтез білкових молекул?
- яким чином реалізується передача генетичної інформації у клітині?
- які механізми забезпечують точне відтворення первинної структури білків?

На основі досліджень, перш за все, було з'ясовано, що генетична інформація зберігається на певних ділянках ДНК – генах, які включають специфічні чергування нуклеотидів і знаходяться під впливом різних регуляторних систем, однак виникло інше важливе запитання: яким чином ген „породжує” білок? Тобто, за участю яких молекулярних механізмів нуклеотиди ДНК, якщо вони навіть розміщені не хаотично, а в певному порядку, визначають чергування амінокислотних залишків у поліпептидних ланцюгах та детермінують первинну структуру білків. Враховуючи це, було висловлено припущення, що між генами ДНК і їх продуктом – білком існує певний посередник (месенджер), який за принципом комплементарності синтезується на одному з ланцюгів ДНК. Згодом виявилось, що таким месенджером є іРНК, яка виконує роль матриці під час синтезу білка на рибосомах (А. Білозерський, О. Спін, 1965 р.). Це стало передумовою для розкриття суті передачі генетичної інформації внаслідок реалізації синтезу видоспецифічних білків.

Тобто, з'явилася необхідність з'ясувати: яким чином передається генетична інформація в напрямку іРНК → білок.

Відповідь на це запитання було отримано внаслідок узагальнення всіх попередніх наукових досліджень вчених різних країн світу, що і дало змогу розкрити молекулярні механізми реалізації генетичної інформації внаслідок матричного синтезу білків.

2. Молекулярні механізми передачі та реалізації генетичної інформації (генетичний код)

Оскільки було відомо, що у клітинах прокаріот первинна структура ДНК колійно відповідає первинній структурі білків, то виникло питання, яким чином проходить переведення чотирилітерної абетки нуклеїнових кислот у двадцятилітерну абетку білків. Тобто,

з'явилася нагальна потреба у розкритті молекулярних механізмів переведення генетичної інформації, закодованої в структурі ДНК у первинну структуру видоспецифічних білків.

На основі наступних досліджень було висловлено припущення, що клітина повинна мати словник, подібний до азбуки Морзе, в якій три знаки-символи (крапка, тире і проміжок між ними) кодують всі букви абетки і дають змогу записати чи передати зміст будь-якого тексту. Так зародилася ідея генетичного коду, яка, однак, зумовила появу цілої низки інших проблем. Зокрема, необхідно було з'ясувати:

- що являє собою кодове слово;
- з яких кодових знаків воно складається;
- яка кількість кодових знаків забезпечує включення однієї амінокислоти до складу білкових молекул;
- які саме знаки входять до складу кодових слів.

Щоб отримати відповідь на ці запитання було проведено експериментальні дослідження, які давали уяву про загальний характер коду та значення його окремих символів.

Так, відомий американський фізик-теоретик Г. Гамов (1954 р.) висловив припущення, що для переведення генетичної інформації, закодованої в первинній структурі ДНК у чергування амінокислотних залишків на первинній структурі білків, слід застосувати правило чергування основ, суть якого в тому що, можливими є кілька варіантів кодування амінокислот нуклеотидами ДНК, які містять азотисті основи аденін, гуанін, цитозин і тимін:

- одна основа кодує одну амінокислоту (синглетний код)
 - дві основи кодують одну амінокислоту (дублетний код);
 - три основи кодують одну амінокислоту (триплетний код);
 - чотири основи кодують одну амінокислоту (тетраплетний код)
- і т. д.

Оскільки, ні синглетний, ні дублетний код не могли забезпечити кодування 20 амінокислот, так як в першому випадку може бути закодовано лише 4 амінокислоти, а в другому $4^2 = 16$, то було запропоновано зупинитися на третьому варіанті (3 основи – 1 амінокислота). Тобто, припустили, що кодове слово, очевидно, включає три нуклеотиди. Одночасно з цим, оскільки до складу білків входить 20 протейногенних амінокислот, то залишаються зайві комбінації нуклеотидів. На думку вчених, ці нуклеотиди, очевидно, є своєрідними розділовими знаками, або одній амінокислоті відповідає не одне, а кілька різних співчитань нуклеотидів, подібно до того, як одні і ті ж ліки можуть надходити в торгіву мережу під різними назвами.

Таким чином, було висловлено припущення, що генетичний код, ймовірно є триплетним, а кодове слово містить три символи (чергування трьох мононуклеотидів). Однак, це припущення необхідно було підтвердити експериментально та з'ясувати чергування яких саме нуклеотидів забезпечує включення до складу білкових молекул певних амінокислот.

На думку вчених, проблему можна було вирішити, якщо б вдалося „прочитати” одночасно ДНК-овий та РНК-овий тексти, а також чергування амінокислот, які ними визначаються, а потім порівняти їх. Оскільки чергування нуклеотидів на структурі ДНК і РНК в ті часи „прочитати” не було змоги, вчені пішли іншим шляхом. Керуючись припущенням, що природа „знає” як вирішити цю проблему, тобто в неї є власний „словник” переведення нуклеотидної послідовності ДНК у чергування амінокислот на структурі білка, вирішили просто „запитати” у природи.

З цією метою М. Ніренберг створив безклітинну систему синтезу білка (*in vitro*), яка являла собою гомогенізовані клітинні екстракти бактерії *E. coli*. Ця система могла забезпечити синтез білка, оскільки містила всі необхідні компоненти – рибосоми, іРНК, тРНК, ферменти та білкові фактори. Безклітинну систему було використано у зв'язку з тим, що в нативній клітині всі внесені в неї компоненти були б зруйновані ферментними системами. У створену безклітинну систему вносили штучно синтезовані полінуклеотиди різного складу з відомою первинною структурою – гомополімери, до складу яких входили однакові мономерні ланки, наприклад, поліуридин. За цих умов, комплексом рибосом з поліуридиловою матрицею для синтезу поліпептиду було відібрано лише амінокислоту фенілаланін. Інші амінокислоти, присутні в середовищі, не використовувалися. Тобто, кодове слово з чергувань трьох уридилітичних нуклеотидів (УУУ) кодує амінокислоту фенілаланін.

Роботи М. Ніренберга, незважаючи на всю їх геніальність, не давали відповіді на основне питання: яка ж кількість уридилітичних нуклеотидів в структурі ДНК: 2,3,4,5 і т.д. забезпечує включення до складу білка амінокислоти фенілаланіну. Тобто, треба було довести триплетність коду. З цією метою у безклітинну систему білкового синтезу вносили полінуклеотиди різної довжини. Виявилось, що найефективніше включення амінокислот до складу поліпептидних ланцюгів проходить в тому випадку, коли їх кількість була кратна трьом. Збільшення кількості нуклеотидів не підвищувало ефективності цього процесу. З цього дослідження було зроблено важливий висновок – код триплетний. Згодом, триплетність коду було експериментально

підтверджено дослідженнями Ф.Кріка на мутантах бактеріофага Т-4, які паразитують у клітині бактерії *E. coli*. Під впливом мутагенів (фенантрен, акридин) на структурі ДНК бактеріофага проходили точкові мутації, що призводило до синтезу дефектних молекул іРНК і, як наслідок, порушення синтезу білків капсиду бактеріофагу. Тобто, за цих умов, змінювався зміст тексту, закодованого на первинній структурі матриці.

Оскільки, на геномній ДНК інформація закодована у вигляді чергувань нуклеотидів, то її первинну структуру можна розглядати як зашифрований текст, а мутації, свого роду, „помилки”, внаслідок яких записаний текст змінюється або зовсім втрачає зміст. Наступними дослідженнями було встановлено, що в результаті точкових мутацій проходить „зсув рамки зчитування” на три нуклеотиди, тобто нуклеотиди зчитуються по три і саме така їх кількість кодує одну амінокислоту. Після того, як було доведено триплетність коду, залишалось з’ясувати які ж конкретно комбінації мононуклеотидів у складі триплетів кодують кожен окрему амінокислоту. Тобто, необхідно було розшифрувати чергування окремих літер в кодовому слові.

Це було успішно вирішено Г. Корана, який в безклітинну систему синтезу білка додавав гетерополірибонуклеотиди різного складу і довжини (гетерогенні матриці), які включали чергування двох мононуклеотидів, наприклад, УГ УГ УГ УГ УГ УГ (полі-(УГ)). При використанні такої матриці до складу поліпептиду включалося дві амінокислоти – цистеїн і валін. Тобто, проходив синтез полі-цис-вал. Якщо припустити, що зчитування матриці проходить по три нуклеотиди: УГУ ГУГ УГУ ГУГ, то триплет УГУ може кодувати цистеїн, а ГУГ – валін. Якщо б код був дублетний, то синтезувався б поліпептид з однієї амінокислоти, що кодувалася б дублетом УГ.

До середини 70-х років ХХ ст. С. Очоа і Г. Корана розшифрували кодові слова, які забезпечували включення всіх 20 протеїногенних амінокислот до складу білкових молекул та створили генетичний словник кодових слів – *таблицю генетичного коду*.

Генетичний код – це молекулярний механізм, властива для всіх живих організмів єдина система запису спадкової інформації у вигляді чергування нуклеотидів на первинній структурі нуклеїнових кислот. Цей молекулярний механізм забезпечує переведення генетичної інформації у процесі експресії генів. Одиницею генетичного коду є триплет на структурі ДНК та *кодон* – чергування трьох нуклеотидів на структурі іРНК. Ці кодони є комплементарними до триплетів, які

локалізовані на матричному (+) ланцюгу ДНК і точною копією триплетів кодуючого (-) ланцюга ДНК (Табл. 9).

Таблиця 9

Код білкового синтезу

Перший нуклеотид	Другий нуклеотид				Третій нуклеотид
	У	Ц	А	Г	
У	УУУ фен	УЦУ сер	УАУ тир	УГУ цис	У
	УУЦ фен	УЦЦ сер	УАЦ тир	УГЦ цис	Ц
	УУА лей	УЦА сер	УАА*	УГА*	А
	УУГ лей	УЦГ сер	УАГ*	УГГ три	Г
Ц	ЦУУ лей	ЦЦУ про	ЦАУ гис	ЦГУ арг	У
	ЦУЦ лей	ЦЦЦ про	ЦАЦ гис	ЦГЦ арг	Ц
	ЦУА лей	ЦЦА про	ЦАА глн	ЦГА арг	А
	ЦУГ лей	ЦЦГ про	ЦАГ глн	ЦГГ арг	Г
А	АУУ іле	АЦУ тре	ААУ асн	АГУ сер	У
	АУЦ іле	АЦЦ тре	ААЦ асн	АГЦ сер	Ц
	АУА іле	АЦА тре	ААА ліз	АГА арг	А
	АУГ мет	АЦГ тре	ААГ ліз	АГГ арг	Г
Г	ГУУ вал	ГЦУ ала	ГАУ асп	ГГУ глі	У
	ГУЦ вал	ГЦЦ ала	ГАЦ асп	ГГЦ глі	Ц
	ГУА вал	ГЦА ала	ГАА глу	ГГА глі	А
	ГУГ вал	ГЦГ ала	ГАГ глу	ГГГ глі	Г

* - кодони, які не кодують жодної амінокислоти (термінуючі або нонсенс кодони)

Враховуючи те, що код триплетний, при різному поєднанні чотирьох нуклеотидів можна отримати $4^3 = 64$ варіанти чергувань, яких достатньо для кодування 20 амінокислот, то було висловлено припущення, що більшість амінокислот на структурі іРНК кодується не одним, а кількома кодонами, за виключенням триптофану і метіоніну. Три кодони **УГА**, **УАА** і **УАГ** дістали назву беззмистовних (нонсенс-кодонів), оскільки вони не кодують жодної амінокислоти, і є сигналами, які визначають початок і закінчення синтезу білка. Два кодони **АУГ** і **ГУГ** одночасно забезпечують включення до складу поліпептидного ланцюга таких амінокислот як метіонін і валін, а також виконують роль сигналів початку трансляції іРНК. Ці кодони одержали назву **ініціюючих**, а кодони, що визначають закінчення трансляції – відповідно – **термінуючих**.

Таким чином, було з'ясовано молекулярні механізми матричного синтезу білка та встановлено, що генетична інформація закодована на структурі ДНК у вигляді чергування триплетів, передається на іРНК у процесі транскрипції за принципом комплементарності. Безпосередньою матрицею, яка забезпечує синтез видоспецифічних білків, є іРНК.

Генетичний код має певні специфічні особливості:

- **Універсальність**, суть якої в тому, що кодони, які кодують амінокислотний склад білків та визначають певні фенотипові ознаки, ідентичні в різних видів організмів: від одноклітинних до багатоклітинних, а також для безклітинних вірусних часточок. Одночасно з тим, в деяких випадках окремі організми можуть надавати перевагу певним чергуванням нуклеотидів, тобто використовуються різні „діалекти”.

- **Надлишковість коду:** *одна амінокислота може бути закодована кількома кодонами, але жодний з кодонів не кодує більше, ніж одну амінокислоту.* Для однієї амінокислоти існує кілька специфічних тРНК, які мають назву *ізоакцепторних*. Разом з тим, одна молекула тРНК, що переносить певну амінокислоту, може взаємодіяти більше, ніж з одним кодоном на структурі іРНК.

- **Виродженість (двозмістовність) коду** зумовлена тим, що в реалізації кодон-антикодонової взаємодії при утворенні комплементарних пар між кодонами іРНК і антикодонами тРНК суттєве значення мають два перші нуклеотиди кодону. Тобто, ці нуклеотиди несуть основне змістове навантаження, тоді як третій має менше значення. Враховуючи це, генетичний код, по суті, є квазидублетним. Однак, оскільки дублетами не можна закодувати 20 амінокислот, то третій нуклеотид також необхідний для їх кодування. Ця особливість коду була сформульована Ф. Кріком і одержала назву *теорії неоднозначної відповідності або виродженості коду*. Суть виродженості в тому, що *якщо кодони містять два однакові перші нуклеотиди, а третій належить до одного з їх видів (пуринів чи піримідинів), то вони кодують одну амінокислоту.*

- **Консервативність коду.** Генетичний код майже не змінювався протягом тривалої еволюції живих організмів і використовується для кодування амінокислот у складі білкових молекул більше 3 млрд. років. Якщо в ході еволюції один з кодонів змінить зміст, то до складу білків будуть включені інші амінокислоти, що зумовить порушення їх структури і функцій.

- **Безперервність коду:** між окремими кодонами немає розділових знаків, як у звичайному тексті. Роль таких знаків

виконують певні чергування нуклеотидів, які є специфічними сигналами початку і закінчення синтезу поліпептидного ланцюга.

Код не перекривається. Нуклеотиди одного кодону не можуть входити до складу іншого і транслюються в напрямку $5' \rightarrow 3'$. Якщо б код перекривався, то внаслідок накладання сусідніх нуклеотидів, змінювався б зміст кодонів та первинна структура генних продуктів. Крім того, у випадку перекривання кодонів, якщо певна амінокислота кодується кодоном ААА, то наступна, згідно з вродженістю коду, буде визначатися двома аденіновими і третім нуклеотидом пуринового чи піримідинового ряду. Тобто, такі кодони будуть кодувати одну амінокислоту, що може змінити інформацію про первинну структуру білка.

- **Код несе одновимірну інформацію** – забезпечує переведення лінійної послідовності триплетів ДНК в лінійну послідовність амінокислотних залишків в структурі білка.

Розшифрування генетичного коду було важливим досягненням біологічної науки, оскільки дало можливість з'ясувати шляхи, напрямки та механізми реалізації генетичної інформації у клітині.

Таким чином, до середини 70-х років минулого століття, практично, було з'ясовано всі ці питання і склалося враження, що не вирішених проблем вже не існує. Однак, починаючи з другої половини 70-х років ХХ століття, в молекулярній біології почали з'являтися факти, які не можна було пояснити з точки зору усталених, на той час, істин:

- було виявлено порушення деяких особливостей генетичного коду;
- поставлено під сумнів поняття про стабільність геномів (виявлено мобільно дисперговані “стрибаючі гени”, які можуть бути перенесені з однієї ділянки геному на іншу);
- встановлено можливість передачі генетичної інформації в напрямку РНК \rightarrow ДНК;
- виявлено відхилення від універсальності генетичного коду: структурі іРНК мітохондрій людини і дріжджових клітин у процесі еволюції деякі кодони змінили зміст. Так, кодон УГА кодує триптофан, АУА – метіонін, а АГА і АГГ є термінуючими. Крім того, у клітинах дріжджів всі чотири кодони лейцину, що містять нуклеотиди ЦУ, кодуєть тріонін, тому для кодування лейцину використовується 2 кодони, а тріоніну – 8. Це вказує на певну еволюцію не лише живих організмів, але і механізмів передачі і реалізації генетичної інформації;
- виявлено явище переривання коду у вірусів і прокаріот. Тобто, одна і та ж ділянка ДНК може кодувати різні білки внаслідок „зсуву

рамки зчитування”. Таке явище „гени в генах” характерне для деяких вірусів, бактерій і бактеріофагів;

Одночасно з цим, всі вищевказані відхилення і не спростовують загальних закономірностей реалізації генетичної інформації та важливого значення генетичного коду як механізму забезпечення матричного синтезу білків.

3. Характеристика компонентів білоксинтезуючої системи

Встановлено, що для перебігу процесу трансляції необхідна наявність певних факторів, які складають білоксинтезуючу систему, яка вмістить:

- рибосомний апарат клітини, або вільні рибосоми;
- 20 протеїногенних активованих амінокислот;
- тРНК, що володіють специфічністю до певного ферменту і кожної окремої амінокислоти;
- ферменти аміноацил-тРНК-синтетази, які забезпечують активування амінокислот та утворення аміноациладенілатів;
- формілметіонін-тРНК (тРНК_ф^{мет});
- іРНК, які використовуються у вигляді матриці;
- ГТФ – джерело енергії для забезпечення певних етапів білкового синтезу;
- йони Mg²⁺ в концентрації 0,005 до 0,008 М;
- фактори ініціації, елонгації та термінації.

Всього у процесі синтезу білка задіяно більше 50 факторів, кожен з яких виконує специфічні функції на окремих етапах білкового синтезу. Синтез білкових молекул відбувається в цитоплазмі клітини за участю цитоплазматичних органел – рибосом.

Рибосоми – це рибонуклеопротеїнові комплекси, до складу яких входять рРНК (50-60%) і білки (35-50%). Рибосоми займають значну частину об’єму клітин. Так у клітинах бактерії *E. coli* на рибосоми припадає до 25% загальної маси клітини, де їх налічується близько 15 тис.

Величина рибосом характеризується константами седиментації (швидкістю осадження їх при центрифугуванні) і виражається в одиницях Сведберга, або коефіцієнтах седиментації. Цей коефіцієнт позначається буквою S і має часове вираження (1×10^{-13} с).

Для прокаріот характерні 70S рибосоми, які складаються з двох субчастинок – малої 30S і великої 50S, а для еукаріот – 80S рибосоми, що містять відповідно 40S і 60S субчасточки. До складу 80S рибосоми

входять білки та РНК у співвідношенні 1:1, а у складі 70S рибосоми це співвідношення складає 1: 2.

Функції малої і великої субчасточок рибосом різні. Малі субчасточки забезпечують процес ініціації та відповідають за розшифрування генетичної інформації (генетична функція), а великі – забезпечують утворення пептидних зв'язків під час елонгації (ензиматична функція).

У цитоплазмі рибосоми знаходяться у дисоційованому стані в вигляді окремих субчасточок, асоціація їх відбувається після зв'язування з іРНК або з мембранами гранулярного ендоплазматичного ретикулулу. 70S і 80S рибосоми різняться за окремими параметрами та молекулярною масою.

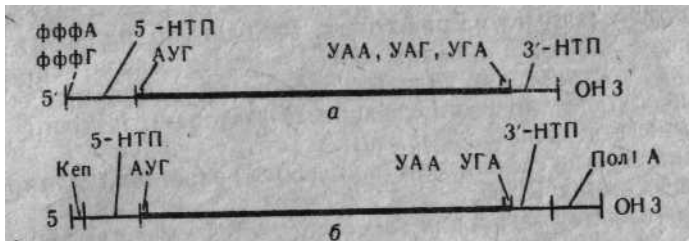
Молекулярна маса 70S рибосоми 2,8 млн. Да, а розміри 29 x 21 нм, молекулярна маса 50S субчасточки 1,8 млн. Да, а 30S відповідно 1 млн. Да. 50S субчасточки містять 5S РНК довжиною 120 нуклеотидів і 23S РНК довжиною 3 тис. нуклеотидів та 34 молекули різних білків. 30S субчасточка відповідно: 16 РНК, довжиною 1500 нуклеотидів, і 21 молекулу різних білків.

80S рибосома еукаріот має близькі параметри 32 x 22 нм, однак значно вищу молекулярну масу 4,5 млн. Да. Молекулярна маса 40S субчасточки складає 1,5 млн. Да. Вона містить 18S РНК, довжиною 2 тис. нуклеотидів, та 33 молекули різних білків. 60S субчасточка має молекулярну масу 3 млн. Да і містить 28S РНК, довжиною 5 тис. нуклеотидів, 5S РНК, довжиною 120 нуклеотидів, та 5,8S РНК, довжиною 160 нуклеотидів та 43 молекули різних білків. Рибосоми про- і еукаріот мають подібний компонентний склад, що є підтвердженням закону біохімічної єдності живих організмів.

• **Інформаційні РНК (іРНК)** – другий важливий компонент білоксинтезуючої системи Вони виконують роль безпосередньої матриці для синтезу видоспецифічних білків: містять генетично запрограмовану інформацію про їх первинну структуру – якісний склад, кількісний вміст та порядок чергування амінокислотних залишків у поліпептидних ланцюгах.

Генетична інформація закодована на структурі ДНК у вигляді чергування трьох мононуклеотидів – триплетів. Чергування нуклеотидів на структурі іРНК має назву кодонів і визначається триплетами ДНК на структурі кодуючого ланцюга. Триплети згруповані в функціонально активні, регульовані ділянки – оперони (у прокаріот).

іРНК прокаріот, як правило, поліцистронні і містять на 5' та 3' кінці, а також в міжцистронних ділянках нетранслюючі послідовності нуклеотидів (спейси), яким належить регуляторна функція (а):



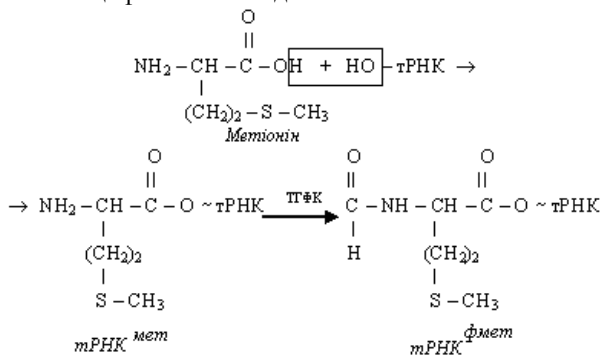
Дж. Шайно і Л. Дальгарно (1974 р.) було висловлено припущення, згідно з яким на рибосомах прокаріот знаходяться ділянки, де проходить фіксування іРНК: комплекс іРНК з 16S РНК рибосоми утворюється внаслідок приєднання до рибосоми послідовності нуклеотидів на структурі іРНК, яка локалізована на 5'-кінці молекули перед ініціюючим кодоном (точкою +1 оперону прокаріот). Ця ділянка іРНК дістала назву *послідовності Шайно-Дальгарно (SD)* і є комплементарною до 3'-кінця 16S РНК. На 5'-кінці іРНК еукаріот локалізовані кеп-структури та ініціюючий кодон АУГ, а на 3'-кінці – термінуючі кодони УАА, УГА та поліаденілова послідовність нуклеотидів (б). Кеп-структури разом з δ -фактором стимулюють ініціацію в межах промоуторної ділянки: 40S субчасточка рибосоми зв'язується з 5'-кінцем іРНК та рухається в напрямку 3'-кінця доки не „зустріне” сигнал ініціації. Далі приєднується 60S субчасточка і розпочинається трансляція іРНК. Цей механізм дістав назву *кеп-залежної скануючої моделі ініціації трансляції*.

• **Транспортні РНК (тРНК)** – важливі складові білоксинтезуючої системи, які є продуктами генів, що локалізовані на помірних повторах нуклеотидів. Встановлено, що у клітині існує в середньому більше 70 різних видів тРНК. Вони забезпечують транспорт активованих амінокислот до місця біосинтезу білка та переведення генетичного коду під час трансляції внаслідок кодон-антикодонової взаємодії. Тобто, вони виконують роль адапторів, безпосередніх перекладачів чотирилітерної абетки нуклеїнових кислот у двадцятилітерну абетку білків. Кожна протеїногенна амінокислота переноситься відповідною тРНК та позначається: тРНК^{ала}, тРНК^{гли} і т.д. Якщо амінокислота кодується не одним, а кількома кодонами, то транспорт її до місця синтезу білка проходить за участю кількох тРНК,

що мають назву *ізоацетторних*. Перенесення такої амінокислоти може забезпечуватися також однією тРНК, яка розрізняє третій нуклеотид кодону враховуючи те, що у процесі молекулярного пізнання та реалізації кодон-антикодонової взаємодії вирішальне значення мають перші два нуклеотиди кодону.

- **формілметіонін-тРНК (тРНК_{ф^{мет}})**. Дослідженнями було виявлено, що білкові молекули, синтезовані на рибосомах прокариот, на N-кінці містять формульовані залишки метіоніну. Тобто, крім звичайних тРНК, які забезпечують транспорт протеїногенних амінокислот, в клітинах прокариот присутня тРНК, що переносить формілметіонін і пізнає на структурі іРНК кодон АУГ в тому випадку, коли він знаходиться на 5'-кінці молекули іРНК (ініціюючий кодон). Якщо кодон АУГ знаходиться на інших ділянках іРНК, він кодує звичайну тРНК^{мет}.

Кодон, що кодує формілметіонін, на структурі деяких іРНК прокариот може бути розміщений після лідерної послідовності Шайно-Дальгарно. Враховуючи це, цей кодон дістав назву *сигналу ініціації*, а комплекс, що утворюється при цьому, ініціюючого. Формілювання метіоніну проходить після приєднання його до відповідної тРНК, за участю специфічного ферменту – трансформілази, який переносить формільну групу від 10-формілтетрагідрофолієвої кислоти на метіонін. Цей фермент специфічний лише для тРНК^{фмет}:



Внаслідок формілювання NH₂-групи метіоніну проходить її блокування і вона втрачає здатність до утворення пептидного зв'язку, що забезпечує нарощування поліпептидного ланцюга в напрямку від N- до С-кінця. Тобто, перший пептидний зв'язок буде утворюватись внаслідок конденсації карбоксильної групи N-кінцевої амінокислоти з аміногрупою наступної.

У клітинах еукаріот процес формілювання відсутній, оскільки ініціація синтезу білка відбувається внаслідок приєднання тРНК до кеп-структури, локалізованої на 5'-кінці іРНК.

Ферменти та білкові фактори

Важливим компонентом білок-синтезуючої системи є фермент **аміноацил-тРНК-синтетаза**, для якого характерні два види специфічності: по відношенню до субстратів (протеїногенних амінокислот) і відповідних тРНК. У зв'язку з цим він містить два активних центри, які зв'язують вказані субстрати одночасно. Процес є енергозалежним і вимагає присутності АТФ. Молекули тРНК, які переносять різні протеїногенні амінокислоти, відрізняються елементами первинної структури, тому відповідні аміноацил-тРНК-синтетази легко розпізнають їх. Якщо амінокислоти мають подібні радикали, наприклад, Вал і Іле, що різняться наявністю в радикалі Іле ще однієї метиленової групи (CH_2), то додаткова стерична взаємодія, яку вносить ця група, сприяє інтенсивнішій активації Іле порівняно з Вал. Одночасно з цим, оскільки концентрація Вал у клітині в 5 разів вища, ніж Іле, то по суті, він повинен би значно частіше включатись до складу білків, але цього не відбувається, оскільки існує специфічна система репарації: Вал помилково активований ферментом замість Іле, не переноситься на відповідну тРНК: проходить гідроліз зв'язку валін~АМФ на стадії утворення аміноациладенілату. Ферменти аміноацил-тРНК-синтетази можна легко виділити при підкисленні середовища до значення рН ... 5,4, тому вони дістали назву 5,4 рН-ферментів.

- **Білкові фактори.** На рибосомному апараті клітини ці фактори забезпечують окремі етапи трансляції: її початок (ініціацію), подовження ланцюга (елонгацію) та закінчення синтезу (термінацію). У прокаріот є кілька ініціюючих факторів **IF₁**, **IF₂**, **IF₃**, кожен з яких виконує певну роль у забезпеченні цього процесу. За участю факторів елонгації **EF-Tu**, **EF-G**, **EF-Ts** відбувається нарощування поліпептидного ланцюга під час елонгації. Термінацію трансляції забезпечують специфічні фактори: у прокаріот **RF₁** і **RF₂**, в еукаріот відповідно фактор **R**.

Для матричного синтезу білка необхідні також **йони Mg²⁺** та енергія **ГТФ**.

ТЕМА: ОСНОВНІ ЕТАПИ БІЛКОВОГО СИНТЕЗУ (РЕКОГНІЦІЯ І ТРАНСЛЯЦІЯ)

План

1. Рекогніція (пізнання).
2. Трансляція: ініціація, елонгація, термінація.
3. Регуляція інтенсивності трансляції у клітинах про- і еукаріот.
4. Посттрансляційна модифікація білків та їх транспорт.

Основна література: [1, с. 376-395]; [2, с. 298-328]; [3, с. 149-185; 201-214].

Додаткова література: [1]; [2]; [3]; [4]; [19]; [21]; [25]

Безпосередній синтез поліпептидних ланцюгів білкових молекул проходить в цитоплазмі і включає 2 етапи: *рекогніцію та трансляцію*. Трансляцію, в свою чергу, поділяють на *ініціацію, елонгацію та термінацію*.

Рекогніція відбувається в розчинній частині цитоплазми, а трансляція на вільних рибосомах, полісомах, або рибосомному апараті, який формується при зв'язуванні субчасточок рибосом з мембранами гранулярного ендоплазматичного ретикулулу.

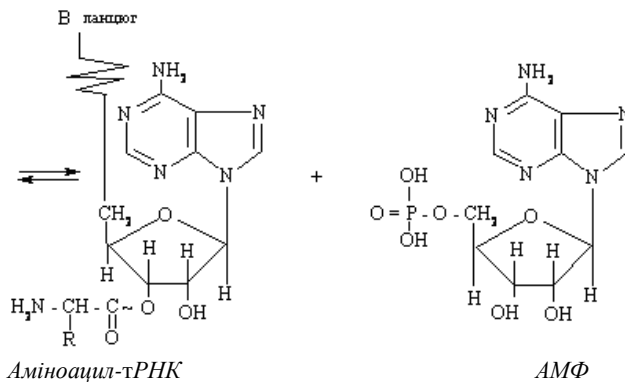
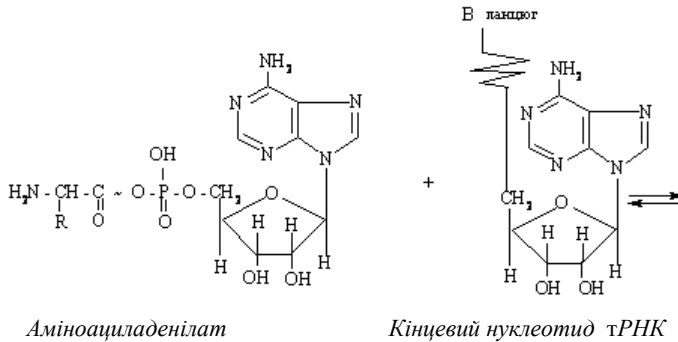
На вільних рибосомах синтезуються прості білки, необхідні для забезпечення метаболізму клітини, а на рибосомах, зв'язаних з ЕПР (полісомах), так звані „експортні” білки, які входять до складу мембранних структур клітини та виконують різні специфічні функції в позаклітинному просторі.

1. Рекогніція (пізнання)

Рекогніція (recognice - пізнання) – це перший етап білкового синтезу, який відбувається в цитоплазмі. Суть цього процесу в пізнанні протеїногенних амінокислот відповідними тРНК, їх АТФ-залежній активації, забезпеченні певним запасом енергії, необхідної для перебігу наступних етапів синтезу – утворення пептидних зв'язків.

При рекогніції амінокислоти сполучаються з відповідними тРНК, внаслідок чого проходить їх відбір і перетворення в „керовані”, інформативні молекули, які надходять до місця синтезу білка в певний час та у чітко визначеному порядку згідно з генетичною інформацією, закодованою на структурі іРНК.

У процесі рекогніції задіяний важливий *принцип молекулярного пізнання* (кодон-антикодонова взаємодія).



Утворена сполука є складним етером, в якому зберігається макроергічний карбоніл-фосфатний тип зв'язку між С- і О-атомами, що надає їй підвищеної реакційної здатності та можливості молекулярного пізнавання внаслідок кодон-антикодонової взаємодії.

2. Трансляція: ініціація, елонгація, термінація

Трансляція – другий етап синтезу білка, який відбувається в цитоплазмі клітин на рибосомах і забезпечує переведення лінійної послідовності нуклеотидів іРНК в чергування амінокислотних залишків в поліпептидному ланцюгу.

Дослідженнями було встановлено, що генетичний код „переводиться” під час трансляції іРНК та внаслідок комплементарної взаємодії кодону іРНК з антикодоном тРНК.

Тобто, триплет матричного (+) ланцюга ДНК і кодон іРНК комплементарні, а антикодон тРНК комплементарний до кодону іРНК

та є точною копією триплету (+) ланцюга ДНК, в якому тимін замінено на урацил:

ДНК (-)	5'	АГЦ ТАТ АЦГ 3'
(+)	3'	ТЦГ АТА ТГЦ 5'
іРНК (кодон)	5'	АГЦ УАУ АЦГ 3'
тРНК (антикодон)	3'	УЦГ АУА УГЦ 5'

Такий механізм забезпечує точне відтворення структури матричного ланцюга ДНК в чергуванні кодонів на іРНК та антикодонів тРНК.

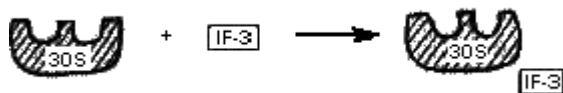
Кодон-антикодонова взаємодія реалізується внаслідок сил слабкої взаємодії – сил ван-дер-ваальса та водневих зв'язків, що утворюються між комплементарними парами азотистих основ відповідних мононуклеотидів, локалізованих в структурі іРНК (кодони) та тРНК (антикодони).

Трансляція включає три процеси – ініціацію, елонгацію і термінацію.

Ініціація трансляції. Суть ініціації трансляції в утворенні ініціюючого комплексу і формуванні 70S рибосоми, що містить функціонально активний центр (ФАЦ).

Ініціацію трансляції у прокаріот забезпечують три білкові фактори: IF₁, IF₂ та IF₃ (від англ. *Initiation factors*).

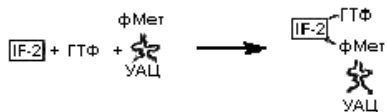
Цей процес включає кілька етапів. Спочатку IF₃ взаємодіє з 30S субчасточкою рибосоми внаслідок чого утворюється двохкомпонентний комплекс (IF₃ · 30 S):



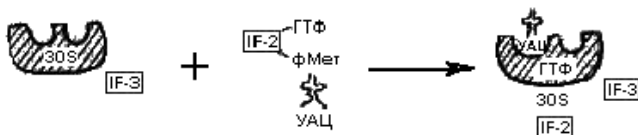
IF₃ забезпечує пізнавання на іРНК кодону, до якого приєднується антикодон тРНК_{мет}.

Комплекс 30S з IF₃ запобігає приєднанню до нього 50S субчасточки до того часу, доки за участю IF₁ не приєднається іРНК. Крім того, цей комплекс розпізнає на іРНК певні чергування нуклеотидів (RBS-послідовності), що містять ініціюючий кодон та SD-послідовності (Шайна-Дальгарно) на лідерній зоні іРНК, за допомогою яких іРНК приєднується до 16S РНК рибосоми. Наявність ініціюючого кодону, який визначає початок переведення інформації закодованої на структурі іРНК, є важливим, оскільки для ініціації трансляції необхідне точне фіксування рибосоми на стартовому кодоні.

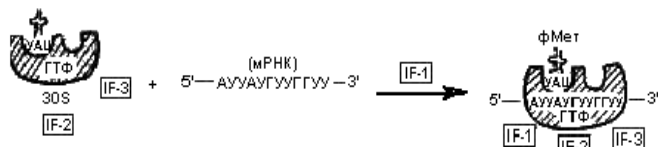
На наступному етапі ініціації IF₂ взаємодіє з ГТФ та тРНК_{ф^{мет}}, внаслідок чого утворюється трьохкомпонентний комплекс (IF₂ · ГТФ · тРНК_{ф^{мет}}):



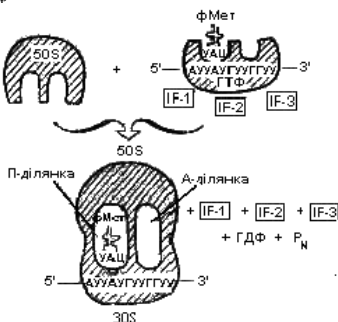
Цей комплекс взаємодіє з попереднім:



До утвореного п'ятикомпонентного комплексу за участю IF₁ приєднується іРНК і формується ініціюючий комплекс, який включає фактори ініціації, 30S субчасточки рибосоми, іРНК та тРНК_{ф^{мет}}:



Далі, ініціюючий комплекс взаємодіє з 50S субчасточкою рибосоми за допомогою дигідроуридилової петлі тРНК. За цих умов проходить видалення факторів ініціації, гідроліз ГТФ до ГДФ та формування функціонально активної рибосоми, яка містить комплекс 70 S · іРНК · тРНК_{ф^{мет}}:



Функціонально-активна рибосома має ФАЦ, де проходить синтез поліпептидного ланцюга. Розмір ФАЦ дорівнює довжині двох кодонів на структурі іРНК, оскільки в ньому постійно знаходяться дві

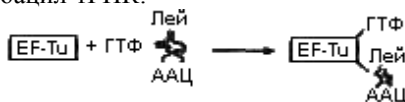
аміноацил-тРНК. На структурі ФАЦ локалізовані дві ділянки: аміноацильна (А) і пептидильна (Р). У момент закінчення ініціації у Р-ділянці рибосоми знаходиться антикодон тРНК_{ф^{мет}} зв'язаний за участю водневих зв'язків з ініціюючим кодоном іРНК, А-ділянка містить наступний кодон іРНК, який знаходиться після ініціюючого.

Елонгація (від англ. *elongatio* – подовження). Суть елонгації в поступовому нарощуванні поліпептидного ланцюга від N до С-кінця.

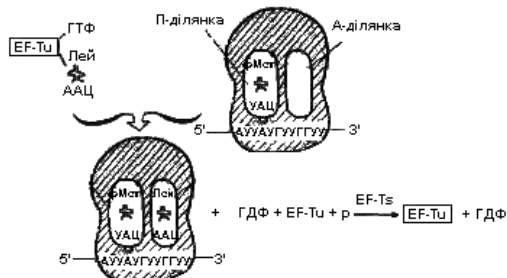
Цей процес включає:

- перенесення до рибосоми наступної аміноацил-тРНК, яка визначається кодоном іРНК, розміщеним після ініціюючого, та зв'язування її в А-ділянці рибосоми;
- транслокацію тРНК_{ф^{мет}} з Р-ділянки рибосоми в А-ділянку;
- утворення пептидного зв'язку (ГТФ-залежна реакція);
- перенесення утвореного дипептиду в Р-ділянку рибосоми за участю білкового фактору 50S субодиниці рибосоми – транслокази та видалення вільної тРНК.

Для перебігу елонгації необхідна наявність білкових факторів (EF_{Ts}, EF_{Tu}, EF_G), ГТФ у вигляді джерела енергії та відповідних аміноацил-тРНК. Розпочинається елонгація з утворення комплексу EF_{Tu} · ГТФ · аміноацил-тРНК:

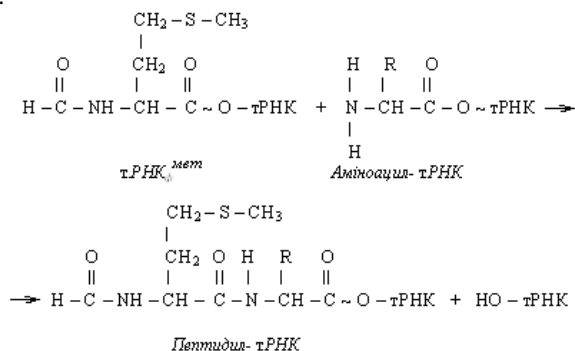


Утворений комплекс надходить до А-ділянки ФАЦ рибосоми, де відбувається його зв'язування з кодоном іРНК. ГТФ, за цих умов, гідролізує до ГДФ і в комплексі з EF_{Tu} видаляється з рибосоми. Під впливом EF_{Ts} комплекс руйнується з утворенням ГДФ і EF_{Tu}:



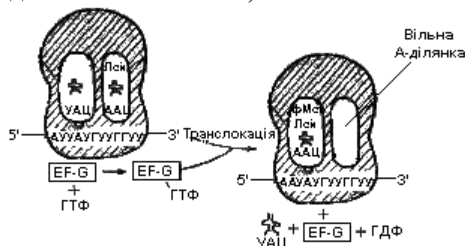
Далі, за участю фактору транслокації (EF_G), з Р до А-ділянки рибосоми переноситься тРНК_{ф^{мет}} та утворюється перший пептидний зв'язок (пептидил-тРНК), внаслідок взаємодії карбоксильної групи

тРНК_{ф^{мет}} і аміногрупи наступної аміноацил-тРНК, принесеної до рибосоми:



В утворенні пептидного зв'язку задіяний фермент пептидилтрансфераза, рибозимазна активність якого характерна для 23S рРНК, що входить до складу великої (50S) субчасточки рибосоми.

Після утворення зв'язку, вільна ОН-тРНК видаляється з рибосоми за участю ферменту пептидил-трансферази. На цьому етапі елонгації пептидил тРНК знаходиться в А-ділянці рибосоми, а в Р-ділянці, після видалення вільної РНК, залишиться антикодон тРНК_{ф^{мет}}:



Наступний етап елонгації – транслокація пептидил-тРНК з А- в Р-ділянку рибосом, після чого цикл повторюється. У забезпеченні перебігу елонгації важлива роль належить ферменту гуанозинтрифосфатазі, який звільняє енергію внаслідок гідролізу ГТФ.

Швидкість нарощування поліпептидного ланцюга, в середньому, складає 10 амінокислотних залишків за секунду. Тобто, молекула білка, яка містить 200 амінокислотних залишків, синтезується на рибосомі за 1-3 хв. Процес елонгації поліпептидного ланцюга повторюється багато разів, залежно від кількості кодонів на структурі іРНК (інформації, яка закована на матриці). Завершальним етапом трансляції є **термінація** або закінчення синтезу поліпептидного ланцюга. Як вказувалося раніше, кодони УАА, УАГ, УГА на структурі іРНК є сигналами закінчення синтезу білка, або сигналами термінації. В пізнаванні цих

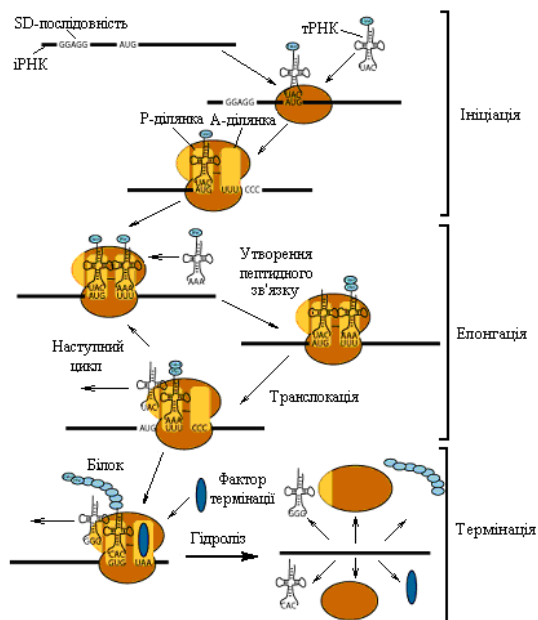
кодонів на структурі іРНК у прокаріот задіяні фактори термінації RF₁, RF₂, RF₃. Фактор RF₁ реагує на появу кодону УАГ і УАА, а RF₂ – на УАА і УГА. Після того, як термінуючий кодон потрапляє в А-ділянку ФАЦ рибосоми, до нього приєднується один з факторів термінації.

Термінація включає такі процеси:

- транслокацію синтезованого поліпептиду з А-ділянки в Р-ділянку рибосоми;
- розрив зв'язку між С-кінцевою амінокислотою та її тРНК;
- вихід білка з рибосоми;
- дисоціацію рибосоми на субчасточки.

У прокаріот іРНК поліцистронна, тому зчитування інформації відбувається за участю комплексу рибосом, тобто, на полісомі. Це забезпечує більшу ефективність трансляції, оскільки кожна рибосома проводить всі етапи – ініціацію, елонгацію і термінацію, тобто синтез окремого поліпептидного ланцюга. Розміри полісомних комплексів залежать від параметрів іРНК. Якщо іРНК містить кілька тисяч нуклеотидів, то вона може транлюватися комплексом з 50-100 рибосом. Як правило, найчастіше утворюються комплекси з 10-20 рибосом.

Нижче наведено загальну схему трансляції іРНК на одній рибосомі:



Таким чином, для трансляції в клітинах прокаріот характерне:

- поєднання трансляції з транскрипцією, тобто ці процеси не розділені у просторі і часі та відбуваються одночасно (*скануюча модель трансляції*);
- одночасний синтез кількох поліпептидних ланцюгів на структурі іРНК, яка є поліцистронною;
- кожен окремих цистрон іРНК містить ініціюючий і термінуючий кодон;
- перед ініціюючим кодоном розміщена специфічна SD-послідовність нуклеотидів, що є аналогом 5'-нетрансляючої послідовності нуклеотидів на структурі іРНК еукаріот;
- всі цистрони поліцистронної іРНК прокаріот транслуються одночасно і незалежно один від одного. Тобто, окрема рибосома у складі полісоми зв'язується з SD-послідовністю одного із цистронів та звільняється після його зчитування. Інші рибосоми можуть зв'язуватися з наступними цистронами цієї ж іРНК, що значно підвищує ефективність трансляції;
- кеп-незалежний механізм ініціації трансляції;
- наявність ініціюючого кодону, який визначає початок синтезу поліпептидного ланцюга;
- ініціюючий кодон кодує тРНК^{фмет}. Після закінчення трансляції формільований залишок метіоніну може залишатися на структурі генних продуктів, або видаляється.

Особливості трансляції в клітинах еукаріот. Цей процес в еукаріотичних клітинах практично не відрізняється від трансляції у клітинах прокаріот. Виключенням є лише окремі деталі, які пов'язані з посттрансляційною модифікацією молекули білка та структурою зрілої іРНК, яка містить модифіковані 5' і 3'-кінці („кеп” і поліаденілову послідовність).

У першу чергу, для трансляції в еукаріот характерна *кеп-залежна ініціація*, суть якої в тому, що приєднання іРНК до рибосоми відбувається за участю специфічного еукаріотичного фактора ініціації (eIF4E), з яким зв'язується кеп-структура, що міститься на 5'-кінці іРНК (7-метилгуанозинтрифосфат).

У цьому процесі задіяний білковий фактор eIF₃. Інші еукаріотичні фактори ініціації eIF4B і eIF4A, для яких характерна АТФ-азна активність, забезпечують рух іРНК в напрямку від 5' до 3'-кінця. Цей процес є енергозалежним, тому відбувається за участю ГТФ.

В ініціації трансляції задіяний також фактор eIF4G, необхідний для формування ініціюючого комплексу та функціонально активного центру рибосоми (ФАЦ).

Під час ініціації за участю eIF4A 40S субчасточка звільняється від eIF4G і eIF4E і в комплексі з 60S субчасточкою зв'язує ініціюючий кодон АУГ. Після цього відбувається звільнення решти факторів ініціації та завершується формування функціонально активного центру 80S рибосоми.

У деяких еукаріотичних клітинах може мати місце і кеп-незалежна ініціація трансляції, за участю специфічних внутрішніх ділянок рибосоми – IRES (від англ. *Internal Ribosome Entry Site*). Ці ділянки пізнають специфічні чергування нуклеотидів на структурі іРНК.

Такий механізм, на відміну від кеп-залежного, не вимагає пізнання рибосомою 5'-кінця іРНК та транслокації рибосоми до стартового кодону, а забезпечується специфічним фактором IEAF. Кеп-незалежний механізм ініціації трансляції було виявлено у клітинах еукаріот за умов негативного впливу різних факторів, які знижують ефективність трансляції.

Елонгація трансляції в еукаріот подібна до цього процесу у прокаріотичних клітинах. Однак, її перебіг забезпечують два фактори: еукаріотичний фактор елонгації 1 (eEF₁), до складу якого входять α , β і γ -субодиниці, та eEF₂. Субодиниці eEF₁ виконують функції EF-Tu та EF-Ts прокаріотичних клітин, а eEF₂ – прокаріотичного фактора EF-G.

Термінація трансляції у клітинах еукаріот, на відміну від прокаріот, відбувається за участю єдиного фактора RF.

Якщо синтез білків в клітинах еукаріот відбувається на рибосомах, зв'язаних з мембранами ЕПР, він має певні особливості.

Кожен з видів експортних білків синтезується на певних ділянках ЕПР. Перед початком трансляції експортних білків у цитоплазмі формується ініціюючий комплекс, до складу якого входять іРНК певного білка, що транслюється, субчасточки рибосом, а також аміноацил-тРНК.

Комплекс забезпечує трансляцію *сигнального пептиду* (чергування амінокислот, які містяться на N-кінці молекул багатьох білків). Ці чергування, необхідні для зв'язування рибосом з мембранами ЕПР та проникнення білка в його внутрішній простір.

Сигнальні пептиди включають до 35 залишків амінокислот з полярними і неполярними радикалами, що є необхідним для

зв'язування їх з гідрофобними та гідрофільними ділянками мембран ЕПР.

Сигнальні чергування амінокислот можуть розпізнаватися специфічними рибонуклеопротейновими комплексами, які сприяють фіксації іРНК на поверхні мембран за участю специфічних докінг-білків. Результатом цього є зв'язування рибосоми з певним локусом на структурі мембрани ЕПР, а також визначення ділянки іРНК, яка буде зазнавати трансляції. Після закінчення трансляції і проникнення білків у внутрішній простір ЕПР, сигнальні пептиди видаляються за участю специфічних пептидаз і не входять до складу синтезованих білків.

Синтезовані на рибосомах, зв'язаних з ЕПР, поліпептидні ланцюги, завдяки наявності на N-кінцях специфічних сигнальних чергувань амінокислот, легко проникають всередину мембран ендоплазматичного ретикулу.

У мембранах ЕПР формуються поліпептидтрансформуючі пори або *транслокони*, які полегшують проникнення білків у внутрішній простір ЕПР, де можуть проходити процеси їх посттранскрипційної модифікації.

Таким чином, при спільних загальних рисах перебігу процесу трансляції у клітинах про- і еукаріот існують певні відмінності, зумовлені молекулярними механізмами організації їх геномів та специфікою процесів передачі спадкової інформації.

Біосинтез білка у клітинах еукаріот відбувається не лише в цитоплазмі, але і в окремих органелах, які містять власний апарат білкового синтезу. Це характерне, зокрема, для хлоропластів рослин та мітохондрій тваринних клітин. Схема білкового синтезу в цих органелах має багато спільних рис з прокаріотичними клітинами, що зумовлене організацією їх генів та структурою рибосом. Зокрема, ДНК мітохондріального геному має кільцеву форму як і більшість прокаріотичних клітин. Розміри рибосом мітохондрій за параметрами близькі до цитоплазматичних рибосом прокаріот. Для ініціації трансляції використовується тРНК_ф^{мет}.

Мітохондріальні ДНК мають не високий ступінь поліконденсації, містять 15 тис. н.п. та значно меншу молекулярну масу, ніж ДНК хромосом. Мітохондріальна ДНК, як правило, кодує лише 10-20 іРНК, які виконують роль матриць для синтезу специфічних мітохондріальних білків. Це складає близько 1% всіх білків мітохондрій, решта мітохондріальних білків синтезується на рибосомах у цитоплазмі клітини. На структурі мітохондріальної ДНК закодовані також рРНК мітохондріальних рибосом та кількох видів

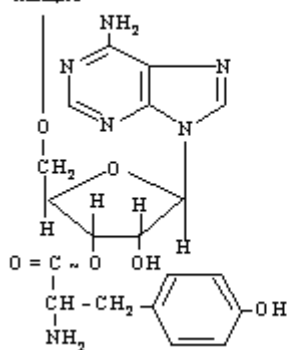
tРНК. У трансляції білків на мітохондріальних рибосомах задіяно лише 22 види tРНК, тоді як у цитоплазмі більше 60. Наявність у мітохондріях автономного апарату білкового синтезу, а також специфічні особливості його функціонування зумовлені симбіотичним походженням мітохондрій, які є нащадками примітивних прокариотичних клітин, що проникли у клітини еукаріот на ранніх етапах еволюції.

3. Регуляція інтенсивності трансляції у клітинах про- і еукаріот

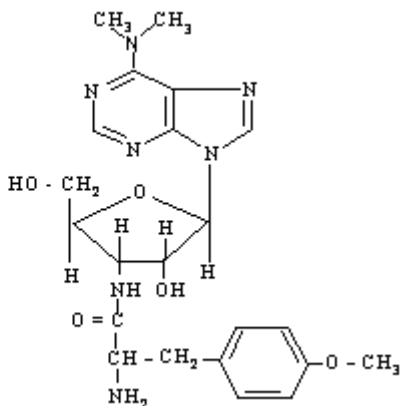
Інтенсивність трансляції у клітинах живих організмів залежить від чисельних регуляторних механізмів, що можуть виявляти безпосередній чи опосередкований вплив на її перебіг. Це стосується, зокрема, індукції та репресії генів у прокариот, процесів, які регулюються за принципом прямого і зворотного зв'язку та можуть суттєво впливати на синтез іРНК, що виконують роль матриць під час трансляції генетичної інформації. Регуляція трансляції може відбуватися також на рівні антиметаболітів, які впливають на рекогноцію в цитоплазмі клітин (утворення аміноацил-tРНК).

Прикладом може бути антиметаболіт пуроміцин, який є структурним аналогом аміноацил-tРНК, задіяних у процесі трансляції.

Полінуклеотидний ланцюг



Аміноацил-tРНК^{asp}



Пуроміцин

У зв'язку з структурною подібністю до tРНК, пуроміцин може зв'язуватися з А-центром як бактеріальної, так і еукаріотичної рибосоми. Це гальмує наступну пептидилтрансферазну реакцію (перенесення пептидилпуроміцину в Р-ділянку рибосоми) і пригнічує

один з етапів трансляції – елонгацію (подовження) поліпептидного ланцюга.

Структурні аналоги нуклеотидів, а також різні метаболіти можуть замінювати природні субстрати та витіснити їх з певних ланок окремих ланцюгів ферментативних перетворень, однак повноцінно замінити їх при виконанні специфічних функцій не можуть. Це зумовлює гальмування метаболічних перетворень різних сполук: синтез, розклад, транспорт метаболітів і, як наслідок, порушення процесів обміну.

Негативний вплив на трансляцію генетичної інформації у клітинах еукаріот виявляють токсини хвороботворних мікроорганізмів. Зокрема, дифтерійний токсин блокує один з факторів елонгації EF-Tu (транслоказу), який забезпечує енергозалежний процес формування комплексу EF-Tu · ГТФ · тРНК та перенесення активованих залишків амінокислот до рибосоми (елонгацію трансляції).

Регуляція інтенсивності трансляції у клітинах про- і еукаріот має певні особливості, зумовлені будовою клітин, специфічними рисами реалізації генетичної інформації та життєвого циклу, який у прокариот, у значній мірі, залежить від клітини-хазяїна.

Враховуючи це, важливими чинниками, які впливають на *перебіг трансляції у клітинах прокариот* є, в першу чергу, антибіотики, речовини, що продукуються нижчими організмами, грибами, деякими бактеріальними клітинами, які містять специфічні плазміди. Характерним є те, що вони суттєво не впливають на трансляцію у клітинах еукаріот, що створює можливість боротьби вищих організмів із збудниками інфекційних захворювань.

Найчастіше інгібіторами трансляції у клітинах прокариот, які діють на рівні рибосомного апарату клітини, є такі антибіотики, як еритроміцин, стрептоміцин, левоміцетин. Механізм їх гальмівної дії ґрунтується на блокуванні зв'язування аміноациладенілатів в А-центрі 30S субчасточки рибосоми (під час ініціації трансляції) або блокуванні окремих ділянок 50S субчасточки (під час елонгації трансляції). Так, стрептоміцин блокує зв'язування формілметіонін-тРНК з ініціюючим кодоном іРНК, а тетрациклін з Р-центром 70S рибосоми, що значно пригнічує синтез поліпептидних ланцюгів. Антибіотик хлорамфенікол (левоміцетин) гальмує пептидилтрансферазний цикл, а еритроміцин – 50S субчасточки рибосоми, в якій відбувається зв'язування специфічних факторів елонгації трансляції. Внаслідок цього утворена пептидил-тРНК не транслокується з А-ділянки рибосоми в Р-ділянку, що негативно впливає на функціонування рибосомного апарату та перебіг трансляції. Тобто, механізм дії інгібіторів трансляції у клітинах

прокаріот реалізується переважно на рівні її окремих етапів – ініціації та елонгації, що негативно впливає на процес вцілому.

Слід підкреслити, що шкідливий вплив надмірного, неконтрольованого застосування антибіотиків при лікуванні захворювань, як правило, реалізується не внаслідок пригнічення трансляції, оскільки ці антибіотики, в меншій мірі, впливають на клітини вищих організмів, а за рахунок інших механізмів. В першу чергу, це стосується пригнічення мікрофлори шлунково-кишкового тракту та розвитку дисбактеріозів, а також впливу на гемопоез.

На трансляцію у прокаріот негативно впливають також тваринні і рослинні токсини та інтерферони – білки глікопротеїнової природи, синтез яких індукується у клітинах тварин, інфікованих реовірусами, геном яких представлений дволанцюговими РНК. Інтерферони являють собою специфічні позаклітинні регулятори метаболізму. Вони не проникають до клітини, а зв'язуються із специфічними рецепторами цитоплазматичної мембрани, внаслідок чого у клітині індукується ряд ефектів: пригнічення трансляції, посилюється фрагментація та руйнування іРНК за участю ендонуклеаз та 3'-РНКаз. За цих умов порушується синтез білків як інфікованого вірусами організму, так і вірусних білків, оскільки вони для власних потреб використовують рибосомний апарат клітини-хазяїна. Тобто інтерферони гальмують метаболічну активність клітини і запобігають надмірному розмноженню вірусних часточок та захищають від поширення інфекції на інші клітини.

Гальмування трансляції у клітинах про- та еукаріот за участю інтерферонів може відбуватися також внаслідок підвищення активності протеїнази, які задіяні в посттрансляційній модифікації певних факторів, необхідних для забезпечення трансляції, зокрема IF₂, внаслідок чого він втрачає здатність виконувати специфічні функції – ініціацію цього процесу.

Регуляція трансляції в еукаріот може відбуватися також на рівні макромолекул (при синтезі ДНК і різних видів РНК) формуванні рибосом та інших субклітинних структур клітини. Це стосується, зокрема, ядерно-цитоплазматичних відносин, специфічних функцій гормонів, які є універсальними регуляторами метаболічних процесів в організмі і діють узгоджено з нервовою системою.

Тобто, трансляція генетичної інформації регулюється за участю різних специфічних механізмів, що можуть включатися залежно від потреб організму і забезпечують оптимальні умови для реалізації життєвоважливих функцій видоспецифічних білків.

4. Посттрансляційна модифікація білків та їх транспорт

Більшість простих білків, які синтезуються при трансляції генетичної інформації на рибосомному апараті клітини, функціонує в такому вигляді як вони були синтезовані. Одночасно з цим, частина білків зазнає певних змін внаслідок *посттрансляційної модифікації*. Результатом цього є те, що до певної міри змінюється структура білків, а отже і їх біологічна активність та функції. Зокрема, в бактерій синтезовані на рибосомах білки містять на N-кінці формілметіонін, який не завжди присутній в нативних білках, тому внаслідок посттрансляційної модифікації проходить їх деформілювання. Різні види посттрансляційної модифікації переважно стосуються експортних, а також складних білків, молекули яких містять простетичні групи. Синтез таких білків контролюється кількома генами: структурні гени кодуєть поліпептидні ланцюги, а наступну модифікацію забезпечують специфічні генні продукти, так звані, *модифікуючі білки*.

Особливо важливе значення *посттрансляційна модифікація білків* має у *клітинах еукаріот*. Цей процес:

- приєднання простетичних груп до синтезованих поліпептидних ланцюгів (фосфорилування, глікозилювання), внаслідок чого утворюються складні білки;
- формування вищих рівнів структурної організації внаслідок утворення внутрішньоланцюгових і міжланцюгових дисульфідних зв'язків;
- гідроксилювання функціональних груп у молекулах білків (залишків лізину та проліну в колагені);
- модифікація N- і C-кінців молекул (амідування, ацетилювання і формілювання);
- метилювання залишків окремих амінокислот;
- взаємна заміна окремих амінокислотних залишків: пролін → оксипролін, цистеїн → цистин, лізин → метиллізин, серин → фосфосерин;
- приєднання кофакторів до ферментів;
- частковий протеоліз білкових молекул і утворення біологічно активних форм ферментів;
- асоціація мономерів в олігомери.

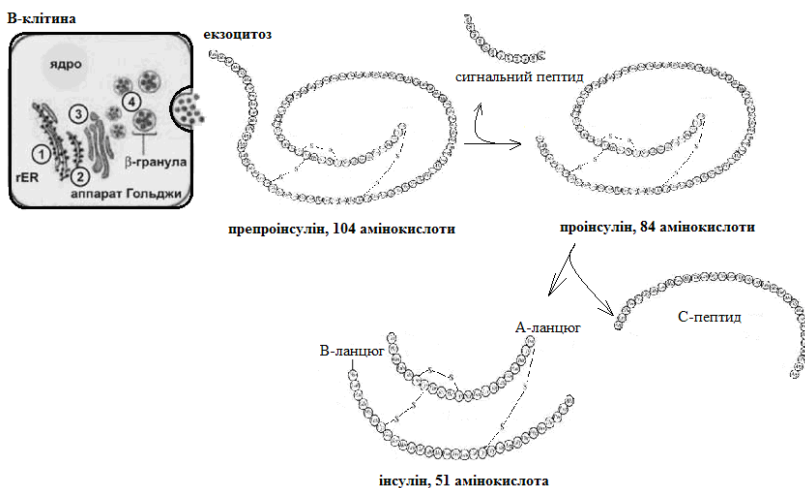
Ці процеси відбуваються в різних кампартментах клітини – на мембранах ЕПР та апараті Гольджі. Зокрема, на мембранах ендоплазматичного ретикулуму проходить ферментативне глікозилювання білків – синтез складних білків глікопротеїнів,

внаслідок приєднання до білкових молекул олігоцукридних фрагментів – гліюканів. Серед глікопротеїнів, утворення яких відбувається в ЕПР, найпоширенішими є α_1 -кислі глікопротеїни, антигенні детермінанти, глікофорин мембран еритроцитів, рецепторні білки клітинних мембран, які забезпечують передачу специфічних сигналів. У синтезі глікопротеїнів задіяний доліхолфосфат, який переносить олігоцукридний фрагмент, до складу якого входить 10-12 дицукридних ланок, із гіалоплазми в мембрани ендоплазматичного ретикулу та приєднує їх до синтезованого поліпептидного ланцюга. За цих умов можливе утворення N- або O-гліюканів. В ЕПР модифікуються також лізосомні білки-ферменти, які мають глікопротеїнову природу. Суть модифікації цих білків у фосфорилуванні олігоцукридного фрагменту по залишках манози, що сприяє зв'язуванню їх з рецепторами манозофосфату та формуванню специфічних міхурців, у складі яких проходить перенесення цих ферментів до лізосом. В ендоплазматичному ретикулумі проходить також модифікація окремих амінокислотних залишків поліпептидного ланцюга, зокрема, гідроксилювання проліну та лізину за участю специфічних гідроксилаз, роль кофактора яких виконує аскорбінова кислота. Мембранам ендоплазматичного ретикулу належить важлива роль у посттрансляційній модифікації експортних білків, які функціонують у позаклітинному просторі. На цих мембранних структурах клітини, крім трансляції та фолдингу, проходить і специфічне сортування білкових молекул залежно від їх будови і функцій, а також цілеспрямований транспорт до різних кампартментів клітини чи назовні. Модифіковані білки в мембранах ЕПР упаковуються у специфічні транспортні міхурці, які відокремлюються від них і дифундують до цистерн апарату Гольджі, де проходить перебудова поліпептидних ланцюгів та включення до складу білкових молекул різних функціональних груп.

Внутрішньоклітинні білки, які синтезуються на вільних рибосомах або полісомах не зв'язаних з мембранами ендоплазматичного ретикулу, зокрема, мітохондріальні та ядерні білки, переносяться до відповідних органел, де відбувається формування їх вищих рівнів структури – фолдинг. Ці білки на N-кінцевих ділянках також містять сигнальні послідовності амінокислотних залишків, які сприяють проникненню їх через білково-ліпідний шар мембранних структур ядерного апарату та мітохондрій. Сигнальних послідовностей не містять лише гістонові білки, які мають невеликі розміри та значні гідрофобні ділянки, що полегшує їх трансмембранне перенесення. Всі наведені види посттрансляційної модифікації білків відбуваються всередині клітини. Одночасно з цим,

частина білків зазнає модифікації після секреції в позаклітинному просторі. Це стосується протеолітичних ферментів (пепсину, трипсину, хімотрисину), а також деяких гормонів білкової природи, які виділяються в вигляді неактивних попередників (проферментів і прогормонів). Утворення активних форм відбувається внаслідок протеолізу частини молекул за участю специфічних ферментів, або аутокаталітично. Зокрема, утворення активної форми пепсину відбувається внаслідок відщеплення від N-кінця преінуліну 42 амінокислотних залишків діаміномонокарбонових кислот.

Іншим прикладом є утворення активної форми інсуліну, що відбувається в кілька етапів. Спочатку преінулін, внаслідок часткового протеолізу (відщеплення від N-кінця молекули сигнального пептиду, що включає 23 а.з.), перетворюється на інулін. Утворений інулін, який містить 76-86 а.з. (залежно від виду організму), за участю ферменту трипсиноподібної тілової протеїнази втрачає фрагмент молекули з середини ланцюга (С-пептид), наслідком чого є утворення активної форми інсуліну:



Подібним чином проходить утворення активних форм ряду нейротоксинів, які вражають центральну нервову систему. Зокрема, збудник ботулізму *Clostridium botulinum* продукує неактивну форму токсину – протоксин, який у шлунково-кишковому тракті зазнає трипсиноподібної модифікації за участю протеаз. Суть модифікації в гідролітичному відщепленні невеликого фрагменту від молекули токсину.

ТЕМА: МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ СТРУКТУР

План

1. Самовільна організація біологічних структур.
2. Опосередковане формування біологічних структур.
3. Спрямована або вимушена організація біологічних структур.

Основна література: [1, с. 395-409]; [3, с. 185-200].

Особливістю матричного синтезу біополімерів є те, що він забезпечує формування їх первинної структури на основі відтворення структури специфічних матриць. Наступні процеси формування вищих рівнів структури біополімерів та надмолекулярних комплексів і систем відбувається за участю специфічних механізмів. Це, в першу чергу, формування вищих рівнів структурної організації білків, зокрема їх нативної конформації з якою пов'язана біологічна активність.

Тобто, для біополімерів клітини, таких як білки і нуклеїнові кислоти, які виконують специфічні життєвоважливі функції, а також надмолекулярних комплексів, характерними є різні рівні структурної організації, що визначають участь їх у процесах життєдіяльності. У формуванні цих структур лежать різні механізми, які склалися у процесі тривалої еволюції. Ці механізми забезпечуються як термодинамічною доцільністю: формуванням нативної структури, яка вимагає мінімуму енергії, так і особливістю проявів біологічної активності біополімерів та функцій надмолекулярних структур.

Найчастіше зустрічаються такі варіанти організації структури білків та надмолекулярних комплексів і систем:

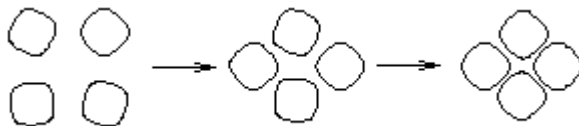
- самовільна,
- опосередкована,
- вимушена
- спрямована.

1. Самовільна організація біологічних структур

Він реалізується без будь-якого зовнішнього впливу. Особливістю цього процесу є те, що самовільна організація структури характерна як для більшості білків клітини, так і для надмолекулярних комплексів і систем та реалізується внаслідок взаємного молекулярного пізнання на основі принципу комплементарності.

Зокрема, при формуванні вищих рівнів структурної організації білків, укладання субодиниць в складі протомерів олігомерних молекул відбувається внаслідок наявності комплементарних ділянок, на поверхні яких локалізовані гідрофобні кластери, що зумовлює їх максимальне зближення. Формування структури, за цих умов, відбувається внаслідок ізо- та гетерологічної взаємодії. Одним із прикладів самовільної організації біологічних структур є формування четвертинної структури білків, зокрема, структури гемоглобіну, молекула якого складається з чотирьох субодиниць: двох α - та двох β -типу. Внаслідок цього формується нативна структура в вигляді тетраедра, яка стабілізується силами слабкої взаємодії між окремими субодиницями.

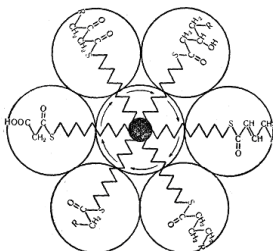
Характерною є також формування структури фібрилярного білка сполучної тканини – колагену, внаслідок спіралізації прототібрил. У слабкокислому середовищі волокна колагену диспергують на окремі ланцюги, тобто проходить руйнування прототібрил. Якщо в середовище додати натрій хлорид, проходить поновлення структури колагену, „самоорганізація” його молекул. Цей процес можна простежити і на прикладі іншого білка-ферменту ацетилтрансферази, який забезпечує перенесення ацетильного залишку від ацетилліпоату до КоА-SH під час аеробного окислення глюкози. У кислому середовищі, цей фермент, молекула якого складається з 4 субодиниць, дисоціює на димери, які не володіють біологічною активністю, а в нейтральному – проходить реасоціація димерів та поновлення біологічної активності:



Процес самоорганізації характерний і для поліферментних комплексів, до складу яких входять кілька різних ферментів. Всі компоненти таких комплексів спонтанно збираються, внаслідок чого формується нативна структура з характерною біологічною активністю. Прикладом може бути піруватдегідрогеназний комплекс, що забезпечує окиснювальне декарбоксилювання пірувату.

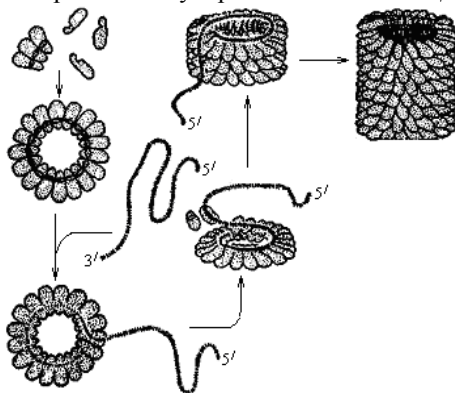
До складу комплексу входить кілька ферментів, які каталізують окремі етапи цього процесу. Формування комплексу проходить внаслідок самоорганізації ідентичних субодиниць, що входять до його складу та забезпечують поетапне перетворення субстрату.

Іншим прикладом самоорганізації поліферментного комплексу може бути синтетаза жирних кислот, молекула якої включає 7 ферментів, що забезпечують перебіг окремих етапів нарощування їх ланцюгів у процесі синтезу:



Надзвичайно складним процесом є самоорганізація та формування структури олігомерних білків, які складаються з великої кількості субодиниць або протомерів. Зокрема, купрумвмісний білок гемоціанін, який необхідний для транспорту кисню в молюсків і членистоногих, містить близько 10 тис. субодиниць. Під впливом детергентів проходить дезінтеграція структури, а при видаленні детергентів відбувається самовільна організація та утворюється біологічно активний комплекс. При змішуванні субодиниць гемоціаніну, виділених з різних організмів, спостерігається селективна самоорганізація нативної структури.

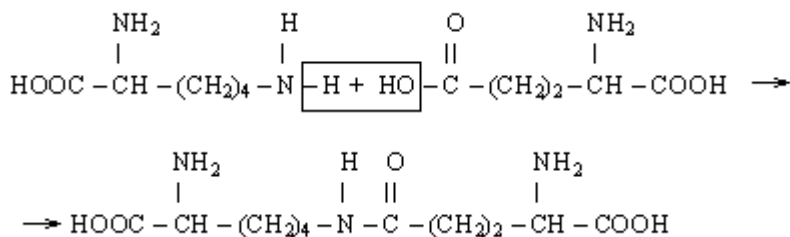
Самоорганізація структури характерна і для вірусів, після проникнення яких в клітину проходить дезінтеграція їх на складові компоненти з наступною самоорганізацією та утворенням зрілих вірусних часточок. Прикладом може бути самоорганізація нуклеопротеїну вірусу тютюнової мозаїки, який містить 2130 ідентичних протомерів з молекулярною масою 17500 Да.:



2. Опосередковане формування біологічних структур

Опосередкована організація структури білкових молекул та надмолекулярних комплексів реалізується за участю додаткових факторів, які задіяні в цьому процесі, однак безпосередньо не входять до їх складу. Це можуть бути носії енергії, ферменти та інші чинники.

Тобто, особливістю цього процесу є те, що, на відміну від попереднього, він проходить лише за присутності та під контролем певних зовнішніх чинників. Прикладом опосередкованої самоорганізації може бути формування структури білка фібрину, який має молекулярну масу 330 тис. Да і складається з 6 субодиниць типу А, В і С. До складу молекули входить по дві субодиниці кожного типу. Фібрин утворюється з попередника фібриногену, внаслідок часткового протеолізу молекули за участю тромбіну. Суть цього процесу в відщепленні 4 пептидів: двох від субодиниць типу А і двох від субодиниць типу В, що зумовлює зміну властивостей фібриногену та сприяє агрегації мономерів з утворенням полімерної форми – фібрину. Полімерна форма фібрину формується за участю сил слабкої взаємодії та водневих зв'язків, які легко руйнуються. Ця форма фібрину міститься у плазмі крові в розчиненому стані. Перетворення розчинного фібрину в нерозчинний відбувається за участю ферменту трансглютамінази (фактор коагуляції VIII), який активується йонами Ca^{2+} . Фермент сприяє утворенню поперечних квазидопептидних зв'язків, які мають цис-конфігурацію, між мономерними формами фібрину внаслідок конденсації ϵ -аміногрупи лізину і γ -карбоксильної групи глютамінової кислоти:



У цьому випадку організація нативної структури фібрину проходить за участю двох додаткових факторів – ферментів тромбіну і трансамінази, які не входять до складу його молекули, а лише сприяють формуванню нативної конформації.

Подібний принцип організації структури характерний для багатьох білків-ферментів (пепсину, трипсину, хімотрипсину тощо), біологічно активні форми яких утворюються внаслідок часткового протеолізу з біологічно неактивних попередників. Частковий протеоліз

відбувається внаслідок відщеплення фрагментів від кінців молекул, за участю специфічних протеаз. Це зумовлює зміну конформації поліпептидних ланцюгів та сприяє формуванню активних центрів ферментів.

3. Спрямована або вимушена організація біологічних структур

Спрямована (вимушена) організація біологічних структур відбувається лише за присутності специфічних ініціаторів цього процесу. Прикладом спрямованої самоорганізації може бути формування вищих рівнів структурної організації білкових молекул (фолдинг). У першу чергу, певні особливості характерні для формування нативної структури білків у клітині.

Загальновідомим є постулат стосовно значення первинної структури білків у формуванні вищих рівнів їх структурної організації та забезпеченні специфічних функцій. Його було висловлено на основі вивчення особливостей формування структури простих білків, що мали невисокі значення молекулярної маси.

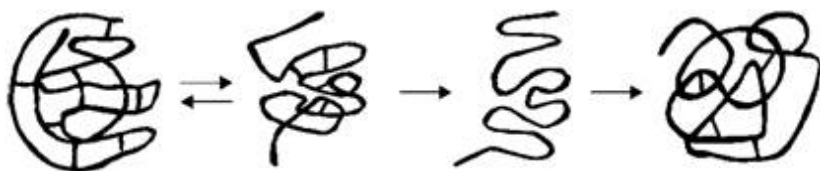
Зокрема, було встановлено, що фермент рибонуклеаза, молекула якого містить 124 амінокислотних залишки, після часткової денатурації (при збереженні первинної структури) може спонтанно формувати вищі рівні структурної організації.

За цих умов, поновлюються як біологічні властивості, так і функції ферменту. Тобто, просторова структура, в цьому випадку, формується внаслідок самовільного процесу: у водному середовищі за участю гідрофобної взаємодії поліпептидний ланцюг набуває нативної конформації, для підтримання якої необхідний мінімум енергії.

Це було підтверджено дослідженням К. Анфінсена (1973 р.), який встановив, що вісім залишків цистеїну, які входять до складу молекули рибонуклеази, стабілізують третинну структуру поліпептидних ланцюгів, внаслідок утворення чотирьох дисульфідних зв'язків на певних ділянках, хоч варіантів їх утворення при такій кількості залишків цистеїну може бути значно більше.

При руйнуванні третинної структури білків за участю різних детергентів (сечовини, меркаптоетанолу), в результаті розриву дисульфідних зв'язків, молекула рибонуклеази набувала форми хаотичного клубка, що супроводжувалося втратою біологічних функцій.

Після припинення дії детергенту (видалення внаслідок діалізу), поновлювалася як третинна структура ферменту, так і його біологічна активність, тобто, проходила ренатурація молекули:



Характерним було те, що цей процес відбувався внаслідок поновлення всіх чотирьох дисульфідних зв'язків між радикалами цистеїну в тому ж положенні поліпептидного ланцюга, як і до денатурації (28-84, 40-95, 58-110, 65-72), хоч ці радикали на первинній структурі знаходилися на значній відстані один від одного.

Це дало підстави для висновку: первинна структура білків містить інформацію про їх нативну конформацію (третинну структуру). Тобто, третинна структура формується внаслідок специфічної взаємодії між окремими радикалами амінокислот, які входять до складу їх молекул, без будь-яких специфічних „інструкцій”, оскільки білок „знає”, яку третинну структуру він повинен сформувати і утворює її цілком самовільно на основі генетичної інформації.

Наступними дослідженнями було встановлено, що така особливість формування просторової структури характерна не для всіх білків. Зокрема, цьому твердженню, до певної міри, суперечили дані стосовно того, що на формування нативної структури та утворення активних центрів ферментів можуть впливати субстрати, які індукують транслокацію окремих їх функціональних груп (теорія вимушеної відповідності).

Тобто, припущення К. Анфінсена, справедливі лише для невеликої кількості простих білків, молекули яких складаються з одного поліпептидного ланцюга. Для формування нативної конформації та структури олігомерних білків необхідна присутність додаткових специфічних чинників – *молекулярних шаперонів і ферментів фолдингу*, функцією яких є створення сприятливих умов для формування структурної організації білків, особливо їх четвертинної структури. Крім того, було встановлено, що частина білків, за певних умов, може денатурувати у клітині, оскільки вищі рівні їх структурної організації стабілізують сили слабкої взаємодії. Самовільна ренатурація білків у клітині ускладнена, оскільки через їх високу концентрацію існує загроза часткової агрегації денатурованих молекул.

Враховуючи це, у клітинах повинні були сформуватися молекулярні механізми, які б забезпечували не лише формування структури олігомерних білків але і ренатурацію білкових молекул, що

втратили нативну конформацію внаслідок дії ушкоджуючих чинників. Ці механізми реалізуються за участю специфічних білків – *молекулярних шаперонів*, які можуть зв'язуватися з частково денатурованими білками, що знаходяться в нестабільному, схильному до агрегації стані і сприяють поновленню їх структури. Молекулярні шаперони отримали назву *білків теплового шоку*, оскільки вперше були виявлені у клітинах, ушкоджених температурними чинниками.

На основі цього було сформульовано поняття про допоміжні фактори формування структури біополімерів (фолдінгу) та виділено дві їх групи:

1. Ферменти фолдінгу (фолдази).
2. Молекулярні шаперони (білки теплового шоку).

На сьогодні відомо два ферменти, які забезпечують фолдінг:

1. *Протеїндисульфідізомераза*, яка забезпечує передислокацію дисульфідних зв'язків у молекулі білків при формуванні нативної конформації. Під впливом цього ферменту руйнуються одні та утворюються інші дисульфідні зв'язки, які можуть забезпечити формування „правильної” нативної структури. Тобто, фермент протеїндисульфідізомераза є каталізатором перерозподілу та переміщення дисульфідних зв'язків. Лабілізація дисульфідних зв'язків забезпечує можливість їх довільного комбінування, що сприяє формуванню нативної структури, підтримання якої вимагає мінімуму енергії. Ефективність дії ферменту залежить від кількості залишків цистеїну в молекулі білка, які можуть бути задіяні в формуванні третинної структури. Якщо білок містить 8-10 залишків цистеїну, можлива велика кількість варіантів утворення дисульфідних зв'язків, однак не всі вони будуть рівнозначні в забезпеченні біологічної активності. Якщо б формування їх відбувалося випадково, без участі ферменту, і було строго детерміноване, то при руйнуванні цих зв'язків, під впливом денатуруючих факторів, білок втрачав би нативні властивості незворотно, тобто була б виключена можливість ренатурації внаслідок рефолдінгу.

Фермент протеїн-дисульфідізомераза забезпечує також неспецифічне зв'язування пептидів у стехіометричних кількостях, тобто, виявляє дію подібну до типових шаперонів. У клітині протеїндисульфідізомеразна активність зосереджена в ендоплазматичному ретикулумі, у зв'язку з чим можна припустити, що саме ця структура задіяна в фолдінгу білків, які синтезуються на рибосомах, зв'язаних з мембранами ГЕР.

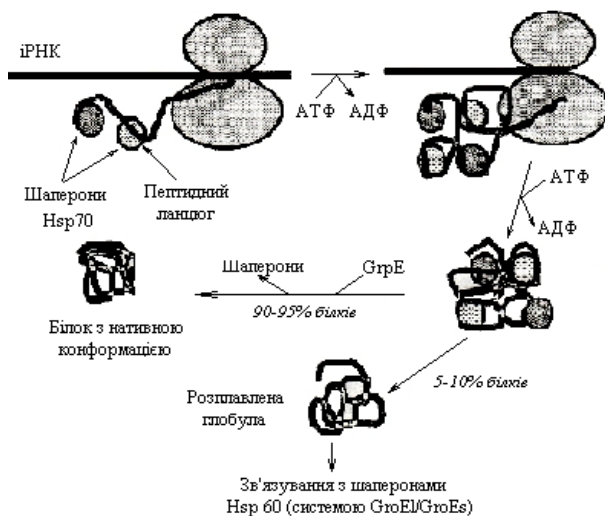
2. *Пептидилпроліл-цис-ізомераза* – другий фермент, який проводить фолдінг білків. Він каталізує перехід радикалів сусідніх

амінокислотних залишків, локалізованих поблизу пептидних зв'язків, утворених проліном, із цис- у транс-конфігурацію і у зворотному напрямку. Це важливо з огляду на те, що транс-конфігурація сусідніх амінокислотних залишків, які приймають участь у формуванні пептидних зв'язків, є стабільнішою (не створює стеричних обмежень при утворенні вищих рівнів структурної організації). Крім того, пролін не містить вільної NH_2 -групи, вона є заміщеною і присутня в вигляді імінної групи (NH), що сприяє легкому руйнуванню пептидного зв'язку, вільному обертанню навколо його площини та зміні конфігурації поліпептидного ланцюга. У місцях локалізації залишків проліну, поліпептидний ланцюг утворює вигини, які порушують регулярну структуру поліпептиду, перешкоджають формуванню α -спіральної ділянок та сприяють утворенню β -структур. Молекулярні шаперони класифікують за молекулярною масою і позначають Hsp-60, Hsp-70 (від англ. *heat shock proteins* – білки теплового шоку). Шаперони Hsp-60 інколи називають *шаперонінами*. Шапероніни містяться в бактеріальних клітинах та мітохондріях і хлоропластах еукаріот.

Молекулярні шаперони Hsp-70 містяться у всіх кампартментах клітини – цитоплазмі, ядрі, мітохондріях, цитоплазматичному ретикулумі. На С-кінці поліпептидного ланцюга цих білків локалізовані фрагменти, які можуть взаємодіяти з олігопептидами (7-8 а.з.), що містять гідрофобні радикали. Hsp-70 запобігають температурній денатурації білків і відновлюють структуру частково денатурованих. У кожного виду шаперонів є „помічники” – *ко-шаперони*, які мають нижчі значення молекулярної маси. Зокрема, DnaJ є ко-шапероном одного з представників Hsp-70 шаперону DnaK. Ця шаперон/ко-шаперонова система забезпечує ко-трансляційний фолдінг білків.

Шаперони зв'язуються з поліпептидними ланцюгами ще до завершення трансляції на рибосомах. Процес є енергозалежним і вимагає присутності АТФ та ще одного додаткового фактора GrpE. Формування структури більшості білків *E. coli* відбувається внаслідок кількох циклів взаємодії з системою DnaK/DnaJ. Після завершення процесу білки знаходяться у стані розплавленої глобули (незавершеного фолдінгу). Закінчення фолдінгу проходить за участю іншої системи шаперонів GroEl/GroEs (Рис. 23). Тобто, система GroEl/GroEs, по суті, є шапероніною і належить до родини Hsp-60. Функції шаперонів у клітині різноманітні: в першу чергу, це *забезпечення формування нативної структури синтезованих білків* внаслідок запобігання їх агрегації та виключення

внутрішньомолекулярної взаємодії між окремими ділянками поліпептидного ланцюга.



23. Ко-трансляційний фолдінг шаперонами Hsp 70.

Згідно з сучасними уявленнями, фолдінг білків може бути як ко-трансляційним (проходить одночасно з трансляцією), так і посттрансляційним, який відбувається після її завершення. Зокрема, ко-трансляційний фолдінг характерний для субодниць гемоглобіну, які зв'язуються з гемом ще до закінчення трансляції, а також ряду інших білків – ферменту люциферази, ланцюгів імуноглобулінів та ін. Важливою функцією шаперонів є також *лабілізація нетипових зв'язків*, утворених радикалами амінокислот, які не відіграють суттєвої ролі у стабілізації нативної конформації, та *контроль за рефолдінгом білків*, що втратили структуру внаслідок дії різних ушкоджуючих чинників (температури, зміни рН середовища, опромінення). За участю шаперонів може відбуватися транслокація окремих білків, що втратили специфічні біологічні функції в межах кампартментів клітини, в першу чергу, до лізосом та мітохондрій. До лізосом транслокуються білки, які зазнали значних ушкоджень і не здатні відновити нативну структуру внаслідок рефолдінгу. В мітохондрії надходять білки, які синтезуються на вільних рибосомах цитоплазми і необхідні для забезпечення метаболізму цих клітинних органел. В цьому випадку шаперони запобігають передчасному фолдінгу мітохондріальних білків до контакту їх з мембранними структурами та проникненню в

мітохондріальний простір, де проходить формування їх нативної конформації.

Для функціонування деяких білків клітини важливим є підтримання їх молекул у стані незавершеного фолдингу, що теж відбувається за участю шаперонів. Це, зокрема, характерне для рецепторних білків, які забезпечують реалізацію регуляторних функцій глюкокортикоїдів та інших стероїдних гормонів. Для цих гормонів характерний цитозольний або прямий механізм дії, який реалізується через вплив на ядерний апарат клітини. Рецептори цих гормонів локалізовані в цитоплазмі, де утворюється гормон-рецепторний комплекс, далі він зв'язується з певними ділянками ДНК хроматину. Функції шаперонів, у цьому випадку, реалізуються при зв'язуванні з окремими ділянками поліпептидного ланцюга рецепторних білків, що забезпечує проникнення їх в ядро клітини (створюється специфічна ядерна мітка). Фолдінг за участю шаперонів системи розпочинається із формування специфічного комплексу, який включає 14 білкових субодиниць. Вони утворюють структуру, подібну до двох порожнистих ємкостей, повернених дном одна до одної. До однієї з цих ємкостей прикріплена „кришка” (Рис. 24).

Стінки кожної ємкості утворюють 7 субодиниць білка GroE1, розміщених по колу. Кожна із субодиниць включає три домени: верхівковий, або апікальний (міститься біля отвору ємкості), проміжний (утворює стінки) і екваторіальний (формує дно з доменами, що до нього прилягають) (Рис. 25). „Кришку” однієї з ємкостей формують 7 субодиниць другого ко-шаперону GroEs.

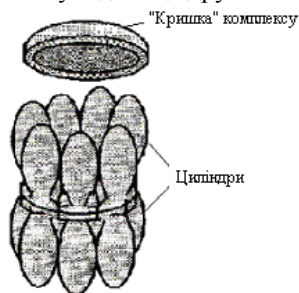


Рис. 24. Будова комплексу GroE1/GroEs

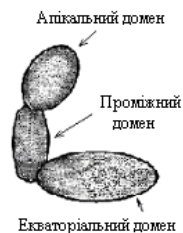


Рис. 25. Структура субодиниць білка GroE1

Приєднання „кришки” до однієї з ємкостей змінює конфігурацію білка GroE1: при відкритій кришці конфігурація білка змінюється таким чином, що внутрішня поверхня ємкості стає гідрофобною, а після закриття кришки – гідрофільною. Ці процеси є енергозалежними і забезпечуються гідролізом 7 молекул АТФ.

Функціонування системи GroEl/GroEs у бактерій включає кілька етапів (Рис. 26).

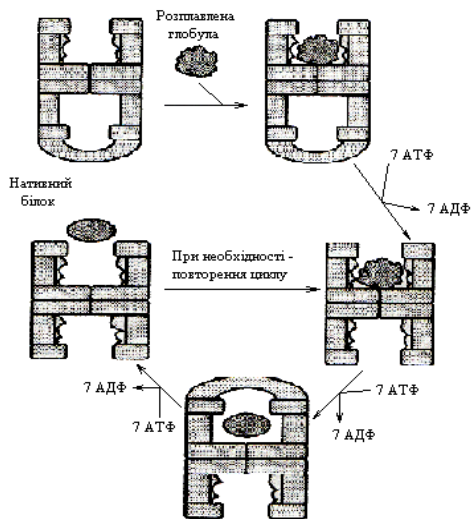


Рис. 26. Механізм фолдінгу за участю системи GroEl/GroEs

Спочатку у відкриту ємкість надходить білок, який зазнає часткового фолдінгу під впливом системи DnaK/DnaJ і знаходиться в вигляді розплавленої глобули. Цей білок на поверхні містить радикали гідрофобних залишків амінокислот, що забезпечує його взаємодію із стінками ємкості. Після цього відкривається „кришка” другої ємкості, внаслідок чого її внутрішня поверхня теж стає гідрофобною, а „кришка” приєднується до ємкості, в якій знаходиться білок, що зазнає фолдінгу, та закриває його. В цьому випадку, стінки ємкостей стають гідрофільними, білок втрачає з ними зв'язок і стає ізольованим у замкненому просторі. Це створює умови для фолдінгу білка, оскільки виключається можливість стороннього впливу, який може перешкоджати формуванню структури і молекула білка самовільно набуває оптимальної конфорації.

Отже, функція системи GroEl/GroEs при фолдінгу білків полягає в тому, що вона ізолює білок та усуває можливість будь-якого зовнішнього впливу і створює умови для формування нативної структури білка.

Фолдінг білків в системі GroEl/GroEs завершується через кілька секунд. Після цього проходить енергозалежна дисоціація «кришки» ємкості і внутрішня поверхня ємкості знову стає гідрофобною. За цих умов білок, який набув нативної конфорації, дифундує в цитоплазму

чи певні кампартменти клітини. Якщо білок складається з кількох субодиниць, тобто є олігомерним, під час фолдінгу, за участю системи GroEl/GroEs, відбувається формування структури окремих субодиниць, а утворення олігомерного комплексу проходить в цитоплазмі клітин поза межами шаперонової системи, внаслідок гідрофобної взаємодії між комплементарними ділянками окремих субодиниць (ізологічна і гетерологічна взаємодія).

Характерним є те, що порушення фолдінгу білкових молекул може зумовити розвиток специфічних захворювань людини і тварин. Це стосується, зокрема, *пріонових білків* (PrP^c – prion protein constitutive), які присутні в мозку. При порушенні фолдінгу цих білків змінюється конфігурація окремих ділянок, на яких проходить формування β-структур, відсутніх у нативній формі. Білки, за цих умов, набувають підвищеної здатності до агрегації і стають патогенними – утворюються інфекційні фактори білкової природи PrP^{sc} – пріони (від *protein ous infection particle*). Ці фактори, у свою чергу, ініціюють перехід у патогенну форму і решти нативних молекул пріонних білків, які, за цих умов, виконують роль антишаперонів та здійснюють антифолдінг – перехід нативної структури в „неправильну” форму.

Антифолдінг відбувається спонтанно, аутокаталітичним шляхом: утворені патогенні молекули ініціюють перехід у такий стан решти нативних молекул білка. Цей процес довготривалий, тому захворювання, спричинені пріонами, дістали назву *повільних інфекцій*, які невідворотно викликають загибель інфікованих організмів. Причиною появи пріонів є помилки фолдінгу або мутації гену PrP^c (в цьому випадку захворювання є спадковим). Крім того пріони, як інфекційні фактори, можуть потрапляти до організму при вживанні в їжу тканин тварин, інфікованих пріонами, оскільки вони стійкі до дії протеолітичних ферментів шлунково-кишкового тракту.

Після надходження до організму пріони локалізуються в центральній нервовій системі, де запускають описаний вище аутокаталітичний процес та розвиток таких захворювань як куру, губчаста енцефалопатія великої рогатої худоби (коров'ячий сказ), хвороба Крейнцифелда-Якоба та інші. Таким чином, як видно з наведених вище прикладів, способи формування біологічних структур є різноманітними і можуть реалізуватися у клітині внаслідок залучення різних механізмів, що сприяє оптимальному забезпеченню виконання ними специфічних біологічних функцій.

ТЕМА: ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ

План

1. Предмет та завдання генної інженерії.
2. Основні етапи створення генетично модифікованих організмів.
 - 2.1. Отримання індивідуальних генів або їх фрагментів.

Основна література: [1, с. 410-457]; [2, с. 351-392].

Додаткова література: [5]; [7]; [10]; [13]; [23]; [24]; [25].

1. Предмет та завдання генної інженерії

Генна інженерія – це науково-прикладний напрям сучасної біологічної науки, галузь молекулярної біології і генетики, суть якого в конструюванні *in vitro* функціонально-активних генетично модифікованих структур (рекомбінантних ДНК), сформованих з фрагментів геномних ДНК різних організмів, що зумовлює зміну їх генотипу та появу нових фенотипових ознак. Оскільки в конструюванні цих структур можуть бути задіяні не лише окремі гени, але і фрагменти геномної ДНК та частина хромосом, вживаним є також термін „генетична інженерія”. З огляду на те, що генно-інженерні дослідження, незалежно від рівня їх проведення (молекулярного, клітинного, організмового), пов’язані з хромосомним апаратом клітини, ці терміни часто вживають як синоніми.

Тобто, генна інженерія – це, по суті, одна із складових сучасних інноваційних біотехнологій, метою яких створення модифікованих генетичних структур із специфічними властивостями і функціями.

Методи генної інженерії дають змогу створювати генетичні структури із заздалегідь передбачуваними властивостями та функціями, внаслідок включення генів одних організмів до геному інших, що дає змогу отримати генні продукти з цінними якостями.

Ці методи суттєво різняться від загальнобіологічних та біохімічних таких як, штучний мутагенез та гібридизація, які проводять в межах одного виду організмів, оскільки ґрунтуються на експериментальному втручанні та цілеспрямованій зміні структури і функцій геному внаслідок поєднання генетичних структур організмів, часто розділених міжвидовими бар’єрами. Тобто, в цьому випадку можливими є маніпуляції з генетичним матеріалом таксономічно віддалених груп організмів. Ці методи базуються на специфічних особливостях геномів – здатності їх до взаємної інтеграції і

трансформації, а також на універсальності генетичного коду, що забезпечує можливість експресії генів у реципієнтних клітинах.

Предметом генно-інженерних досліджень є молекулярні та субмолекулярні структури, з якими пов'язані процеси експресії генів та передача генетичної інформації.

Об'єктом вивчення генної інженерії є структурно-функціональні особливості представників різних таксономічних груп живих організмів, а також вірусів і бактеріофагів.

За висловлюванням О. Баєва, завданням генної інженерії є цілеспрямоване створення штучних генетичних програм внаслідок зміни кількості і якості спадкової інформації у клітині.

Витоки генної інженерії пов'язані з роботами П. Берг (1972 р.), який вперше отримав рекомбінантну ДНК *in vitro*, що включала фрагменти геному трьох організмів: вірусу SV-40, бактерії *E.coli* та бактеріофагу λ . Цьому передували тривалі дослідження по з'ясуванню структурної організації і специфічних функцій генів, а також механізмів їх регуляції.

Наступний розвиток та становлення генної інженерії, у значній мірі, був зумовлений досягненнями молекулярної біології і генетики, мікробіології, прикладної ензимології та інших наук. Важливими були також успіхи в пізнанні молекулярних основ процесів життєдіяльності, механізмів експресії та регуляції генів, що створило можливість цілеспрямованого впливу на генетичний апарат клітини.

Цьому сприяло також застосування новітніх методів дослідження, які давали змогу вивчати молекулярні механізми складних метаболічних процесів у різних компартментах клітини на молекулярному рівні. Важливим було також відкриття великої кількості ферментів, які знайшли широке застосування при проведенні різних маніпуляцій з генами. Зокрема, з'явилася можливість фрагментації генетичного матеріалу та вивчення особливостей функціонування окремих генів у складі геному. Серед цих ферментів слід виокремити, в першу чергу, такі як: рестриктази, ДНК-ліази, ДНК-лігази, специфічні полімерази, дезоксинуклеотидил-трансферази, полінуклеотидил-кінази та інші. Так, застосування для вивчення генетичних структур ферментів рестриктаз, які володіють високою субстратною специфічністю до первинної структури певних сайтів ДНК, дало змогу проводити секвенування „розрізання” молекул на окремі фрагменти. За участю високоспецифічних лігаз ці фрагменти можна було об'єднувати, „зшивати” та отримувати рекомбінантні молекули, які включали окремі ділянки ДНК різних організмів, або „штучні” гени, здатні продукувати генні продукти із специфічними

властивостями і функціями. Ферменти лігази, які забезпечували енергозалежне утворення міжнуклеотидних фосфодієфірних зв'язків між окремими фрагментами ДНК, було виділено з бактеріофага T4 та вивчено їх властивості.

У генно-інженерних дослідженнях широкого застосування набули також ферменти *ДНК-полімерази*, відкриті наприкінці 50-х років ХХ ст. А. Коренбергом. Зокрема, було докладно вивчено фермент ДНК-полімерази I, молекула якої містить три доменних структури з характерною субстратною специфічністю: для N-кінцевого домену характерна 5'→3'-екзонуклеазна активність, а для C-кінцевого, відповідно, 5'→3'-полімеразна, або нуклеотидилтрансферазна. Решта молекули (середній домен) володіє 3'→5'-екзонуклеазною активністю.

Важливе значення мало також застосування ферментів *термінальних нуклеотидилтрансфераз*, необхідних для нематричного механізму нарощування 3'-кінців ланцюгів ДНК певною кількістю дезоксирибонуклеотидів. Ці ферменти можуть подовжувати 3'-кінці ДНК одним з видів дезоксирибонуклеотидів (гуанілових чи цитидилових), внаслідок чого на 3'-кінці одного з ланцюгів утворюються „полігуанілові хвости” (Г-ланцюги), а на 3'-кінці іншого – поліцитидилові (Ц-ланцюги). Такі „липкі кінці” комплементарно з'єднуються за участю ДНК-лігаз, що забезпечує формування кільцевих структур.

Для реалізації генно-інженерних програм необхідним є проведення цілого ряду складних маніпуляцій з генетичним матеріалом, який включає: виділення фрагментів ДНК (генів), створення специфічних молекулярних векторів (провідників), здатних переносити гени в реципієнтні клітини та експресію перенесених генів. Це стало можливим завдяки впровадженню у практику результатів досліджень вчених різних країн світу, серед яких важливим було:

- розробка методів виділення і синтезу генів,
- формування штучних векторних молекул,
- отримання рекомбінантних ДНК та їх клонування,
- відбір клонів, які несуть рекомбінантні ДНК, та створення генотек;
- включення рекомбінантних ДНК в реципієнтні клітини та створення умов для їх ефективного функціонування.

Слід підкреслити, що становлення і розвиток генної інженерії пов'язане із значними труднощами, зумовленими тим, що штучне втручання в генетичний апарат клітини суттєво впливає на його структуру і функції та знижує ефективність функціонування генів і життєздатність організмів. Крім того, чужорідний ген, інтегрований у

геном, може не виявляти функціональної активності без специфічних генно-інженерних маніпуляцій, суть яких у приєднанні до нього регуляторних ділянок. У зв'язку з цим, не завжди шляхом штучного включення такого гену до складу геному іншого організму можна отримати новий штам мікроорганізмів, сорт рослин чи породу тварин.

Тобто, генна інженерія є, свого роду, ефективним способом створення принципово нового вихідного матеріалу для наступного вдосконалення.

За останні роки в галузі генної інженерії сформувалися кілька основних напрямків, завданням яких є:

- створення рекомбінантних ДНК та їх клонування у клітинах бактерій з метою отримання цінних генних продуктів;
- конструювання трансгенних організмів з цілеспрямовано зміненими геномами;
- генна терапія спадкових захворювань;
- запобігання передчасному старінню організму.

Розвиток цих напрямків створює можливість реалізації прикладних завдань генної інженерії, суть яких в:

- генетичній модифікації організмів з метою збільшення кількості та покращення якості природних генних продуктів, а також отримання цінних для людини сполук (амінокислот, ферментів, біологічно активних речовин);
- інтеграції відповідних генів вищих організмів у геном бактеріальних і дріжджових клітин та синтез на основі цього специфічних генних продуктів з цінними властивостями;
- генетичній модифікації вищих рослин з метою підвищення їх врожайності та стійкості до хвороб, шкідників і несприятливих умов вирощування;
- трансформації та генетичній модифікації *in vivo* чи *in vitro* ДНК соматичних клітин, які містять неушкоджені гени, що створює можливість генної терапії спадкових захворювань.

2. Основні етапи створення генетично модифікованих організмів

Створення генетично модифікованих організмів, що поєднують сукупність специфічних ознак, відсутніх у вихідних форм, які було використано для їх конструювання, включає кілька етапів:

- отримання індивідуальних генів, або їх фрагментів, які несуть специфічну генетичну інформацію, що кодує необхідну ознаку. Ці гени повинні містити регуляторні ділянки щоб забезпечити їх експресію у реципієнтній клітині. Особливо важливим є перенесення та інтеграція

генів між геномами таксономічно віддалених груп організмів, зокрема, при передачі їх з клітин ссавців у клітини бактерій. В цьому випадку необхідним є штучне приєднання регуляторних ділянок до виділених генів;

- підбір специфічних молекулярних векторів, здатних до самостійної реплікації у клітині-реципієнті;
- конструювання рекомбінантних ДНК внаслідок ковалентного з'єднання виділеного гену з молекулярним вектором;
- інтеграція рекомбінантних ДНК у реципієнтну клітину;
- ампліфікація та клонування клітин, які включають специфічні рекомбінантні ДНК, що несуть інформацію про синтез певних цінних генних продуктів;
- культивування клітин, що містять рекомбінантні ДНК, на культуральних середовищах з метою отримання необхідних генних продуктів, або включення цих ДНК до складу геномів інших організмів.

Кожен з вказаних етапів має певні специфічні особливості.

2.1. Отримання індивідуальних генів або їх фрагментів

Перший етап при створенні генетично модифікованих організмів – отримання генів, або їх фрагментів, є одним з найважливіших. З цією метою застосовують декілька специфічних методів:

- хіміко-ензиматичний синтез генів;
- синтез ДНК-копій, комплементарних до іРНК певних генів, за участю ферменту ревертази;
- фрагментація геному та виділення *in vitro* очищених фрагментів ДНК.

Ці методи дають змогу отримати оліго- і полінуклеотиди із специфічним чергуванням мононуклеотидних ланок, які відповідають структурі певних генів.

Хіміко-ензиматичний метод синтезу генів

Гени являють собою, в переважній більшості (за виключенням РНК-вмісних вірусів), певні ділянки (сайти) дволанцюгової молекули ДНК, до складу яких входять два взаємокомплементарні протилежно орієнтовані полінуклеотидні ланцюги із строго визначеним лінійним чергуванням мононуклеотидів, сполучених міжнуклеотидними фосфодієфірними зв'язками. Утворення цих зв'язків між нуклеотидними ланками шляхом хімічного синтезу не складає значних труднощів. Головна складність при синтезі штучних генів в отриманні полінуклеотидів із специфічною первинною структурою.

Вперше стратегію хімічного синтезу гену було розроблено Х. Корана (1970 р.). Цей процес включав два етапи: синтез олігонуклеотидних фрагментів з певним чергуванням мононуклеотидів та сполучення їх за участю ферменту ДНК-лігази бактеріофага T-4 з утворенням дволанцюгової молекули. Одночасно з цим, отриманий ген був функціонально неактивним, оскільки не містив регуляторних ділянок.

Пізніше, було синтезовано відрізок ДНК бактерії *E. coli*, який являв собою ген $tRNA^{trp}$, що включав 126 н.п., та регуляторні ділянки (промоуторну і термінуючу), до складу яких входило відповідно 52 та 21 н.п. Цей ген, на відміну від попереднього, володів біологічною активністю: після інтегрування його в мутантний за цим геном штам бактеріофага T-4, поновлювався синтез відповідного генного продукту (Х. Корана, 1976 р.).

Перед проведенням хімічного синтезу генів вивчали їх первинну структуру. Зокрема, Х. Корана для хімічного синтезу гену орієнтувався на відому послідовність нуклеотидів у попереднику $tRNA^{trp}$. З цією метою часто застосовують також метод „читання з листа”. Суть його в тому, що на основі чергування амінокислотних залишків у білковій молекулі, за таблицю генетичного коду, з'ясовується первинна структура відповідних іРНК та чергування комплементарних нуклеотидів на структурі гену. Чергування олігонуклеотидних ланок підбирають таким чином, щоб вони частково перекривалися. Синтезовані олігонуклеотидні фрагменти повинні включати не більше 10-15 нуклеотидів, що є оптимальним для їх хімічного синтезу.

На завершальному етапі хіміко-ензиматичного синтезу генів проводять зшивання отриманих олігонуклеотидів за допомогою ферментів ДНК-лігаз. З цією метою в середовище, з певною йонною силою і температурою, додають синтезовані олігонуклеотиди та бактеріальні ДНК-лігази, внаслідок чого проходить їх „зшивання”. Цей метод використовують для синтезу як структурних генів, так і для приєднання до них регуляторних ділянок, а також чергувань нуклеотидів, які необхідні для з'єднання отриманих генів з вектором.

Синтез олігонуклеотидів із мономерних ланок найчастіше проводять в однофазній системі з використанням у вигляді розчинника зневодненого піридину.

Значного поширення набув також метод синтезу олігонуклеотидів на твердих полімерних носіях з використанням двофазних систем. Суть методу в тому, що 5'-кінцевий мононуклеотид іммобілізують (ковалентно приєднують) до носіїв, зафіксованих на полімерних носіях, якими заповнюють хроматографічну колонку.

Приєднання наступного нуклеотиду, внаслідок утворення міжнуклеотидного зв'язку, відбувалося при багаторазовому пропусканні його розчину мономерів через колонку. Після цього надлишок не зв'язаних мономерів видаляють і повторюють цикл нарощування. По завершенню синтезу олігомерні фрагменти “знімають” з колонки методом елюції за участю специфічних розчинників.

У наступні роки двофазний метод синтезу було вдосконалено і створено автоматичні синтезатори олігонуклеотидів.

Хіміко-ензиматичним методом отримано велику кількість генів для потреб генної інженерії. Зокрема, Г. Бойер отримав рилізінг-фактор гормону росту – соматостатин. З цією метою було використано інформацію про його первинну структуру (чергування амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюгу) на основі генетичного коду.

Далі, за первинною структурою соматостатину, було з'ясовано чергування нуклеотидів на іРНК та відповідному гені і проведено його хіміко-ензиматичний синтез. Отриманий ген інтегрували в геном бактерії *E. coli* поруч з геном ферменту β -галактозидази, в якому були наявні регуляторні ділянки, що забезпечило продукування бактеріальними клітинами соматостатину.

Хіміко-ензиматичний метод отримання генів є досить складним і довготривалим, тому перспективнішими є синтез їх за участю ферменту зворотної транскриптази, або виділення генів внаслідок фрагментації геному.

Синтез генів за участю зворотної транскриптази

Цей метод ґрунтується на універсальній здатності ферментів ревертаз забезпечувати синтез дволанцюгових молекул ДНК на одноланцюговій РНК-овій матриці. Для синтезу ДНК необхідна присутність праймера – затравного олігонуклеотидного фрагменту, комплементарного до РНК-матриці, та наявність на його 3'-кінці вільної ОН-групи для нарощування полінуклеотидного ланцюга.

Синтез генів за участю ферменту ревертази включає такі етапи:

- виділення високоочищених іРНК, які кодують специфічні білки;
- синтез дволанцюгових гібридних ДНК/РНК молекул;
- звільнення з ДНК/РНК-дуплексу кДНК;
- синтез на структурі кДНК комплементарного ланцюга (отримання генів);
- ампліфікація генів та їх клонування.

Отримання генів внаслідок синтезу кДНК є основним для більшості ДНК-геномних вірусів та єдиним для вірусів, геном яких локалізований на молекулі РНК.

іРНК, виділена з клітин еукаріот, чи геномна РНКових вірусів, на 3'-кінці полінуклеотидного ланцюга містить специфічну затравку – поліаденілову послідовність нуклеотидів, побудовану внаслідок посттранскрипційної модифікації. У ДНК, виділених з бактеріальних клітин, така послідовність відсутня, тому її отримують *in vitro* за участю ферменту поліА-нуклеотидилтрансферази. Для отримання ДНК-копій застосовують, як правило, фермент зворотню транскриптазу, виділену з вірусу пташиного мієлобластозу. У ролі затравки використовують короткі тимідинові олігонуклеотиди, комплементарні до поліаденілової послідовності нуклеотидів, локалізованої на 3'-кінці іРНК. Після синтезу ДНК-копії її видаляють. На наступному етапі утворений РНК/ДНК-дуплекс руйнують лужним гідролізом, видаляють ланцюг РНК і формують гомогенні ДНК-копії. До синтезованих таким чином ДНК-копій, приєднують регуляторні ділянки, що забезпечує функціонування гену у клітині-реципієнті. Цим методом було синтезовано глобінові гени, які кодують α - та β -ланцюги гемоглобіну людини і багатьох тварин, ДНК окремих вірусів та бактеріофагів.

Застосування вказаних методів отримання генів мало важливе значення в розвитку молекулярної біології і генної інженерії, оскільки стимулювало технологію створення рекомбінантних ДНК. Вдосконаленню методів сприяло також застосування автоматизованих синтезаторів, що дало змогу отримувати фрагменти генів, які містять сотні тисяч нуклеотидних пар. Часто цими методами отримують лише фрагменти генів (15-20 н.п.), які використовують в вигляді праймерів, або лінкерних ділянок, що містять сайти пізнавання молекул ДНК специфічними рестриктазами. Можливе також використання цих фрагментів в ролі специфічних маркерів для гібридизації при отриманні рекомбінантних молекул. За допомогою ферменту зворотньої транскриптази на матриці іРНК, виділеної з β -клітин підшлункової залози, було синтезовано ген інсуліну та вивчено його тонку структурно-функціональну організацію. В людини, шурів і курей структура інсулінового гену подібна. Після синтезу гену інсуліну стало можливим отримання його методами генної інженерії.

Отримання генів шляхом фрагментації геному

Цей процес включає кілька етапів:

- отримання клонотеки фрагментів геномів;

- ідентифікація фрагментів геному, який містить необхідний ген;
- вирізання гену із фрагментів за допомогою специфічних ферментів рестриктаз;
- ампліфікацію генів у складі векторної молекули в бактеріальних реципієнтних клітинах;
- перенесення ампліфікованих генів у реципієнтні клітини.

Фрагментацію геному для формування необхідних генів проводять гідродинамічними або ензиматичними методами.

У першому випадку препарати очищеної хромосомної ДНК піддають механічній обробці, внаслідок чого проходить руйнування міжнуклеотидних фосфодієфірних зв'язків та утворення великої кількості фрагментів. Утворені фрагменти далі не розділяють на окремі гени, а вводять у реципієнтні клітини, внаслідок чого отримують набір клітинних клонів, з яких лише частина несе необхідну інформацію. Сукупність клонів, що несуть фрагменти чужорідних ДНК, являє собою банк генів, з якого виділяють певні клони клітин.

Цей метод має обмежене застосування, тому в переважній більшості для потреб генної інженерії виділення генів з геномів різних організмів проводять за допомогою високоспецифічних методів, які ґрунтуються на використанні ферментів. Це, в першу чергу, ферменти *рестриктази*, або рестрикційні ендонуклеази, виділені з клітин бактерій *E. coli*, інфікованих бактеріофагом λ (Д. Натансон, Т. Сміт 1962 р.). Ферменти руйнують фосфодієфірні міжнуклеотидні зв'язки на специфічних сайтах ДНК між певними залишками нуклеотидів. Сайти, як правило, являють собою блоки нуклеотидів пуринового і піримідинового ряду, які включають 4-6 нуклеотидних пар. Зазвичай, рестриктази захищають бактеріальні клітини від чужорідної вірусної ДНК: діють лише на ДНК бактеріофага і не руйнують власну ДНК, оскільки вона модифікована внаслідок метилювання окремих азотистих основ нуклеотидів за участю специфічних метилаз.

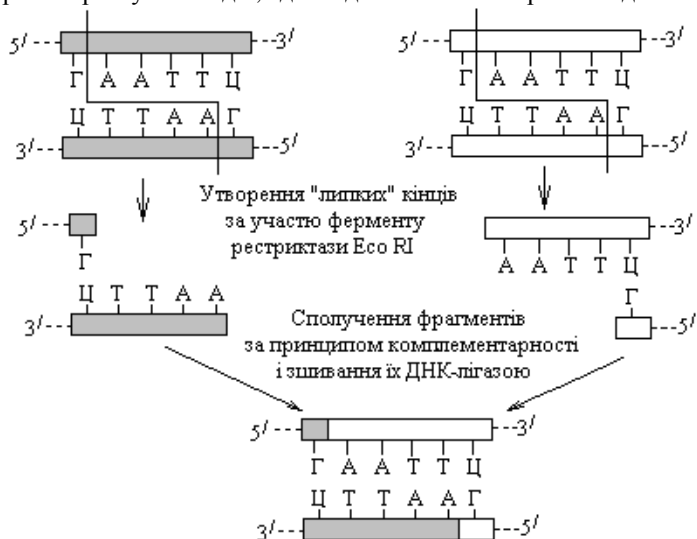
У 70-х роках ХХ ст. було вивчено велику кількість бактеріальних рестриктаз та розроблено їх *номенклатуру і класифікацію*.

На основі субстратної специфічності та цілого ряду інших ознак було виділено 3 основних класи бактеріальних рестриктаз.

- До *першого класу* віднесено ферменти із субстратною специфічністю до неметилюваних дволанцюгових ДНК. Ці ферменти у вигляді кофакторів містять S-аденозилметіонін. Для перебігу реакції необхідна присутність АТФ та йонів Mg^{2+} . Молекули ферментів включають три неідентичні субодиниці типу α , β та λ і мають

молекулярну масу близько 500 кДа. Кожна із вказаних субодиниць виконує специфічні функції: для α -субодиниць характерна рестриктазна активність, β -субодиниці забезпечують метилювання азотистих основ, а λ -субодиниці – пізнають сайти ДНК, які містять специфічні чергування нуклеотидів (сайти рестрикції). Рестриктази цього класу мають відносну субстратну специфічність, у зв'язку з чим продукти рестрикції, які утворюються за їх участю, є гетерогенними, що обмежує використання їх у генній інженерії.

- *Другий клас рестриктаз* позначають II S (від англ. *shift* – зсув, перестановка). Молекули рестриктаз II S складаються з двох ідентичних субодиниць і мають значення молекулярної маси близько 100 кДа. Для підвищення їх каталітичної активності необхідна присутність йонів Магнію. Рестриктази цього класу пізнають на структурі ДНК інвертовані (паліндромні) чергування нуклеотидів і гідролізують фосфодиефірні зв'язки у двох ланцюгах ДНК, внаслідок чого в них утворюються симетричні чи асиметричні розриви. У випадку симетричних розривів на структурі ДНК формуються „сліпі кінці”, а при асиметричних – „липкі кінці”. Зокрема, рестриктаза EcoRI пізнає на структурі ДНК сайти ГАА ТТЦ / ЦТТ ААТ і гідролізує міжнуклеотидні фосфодиефірні зв'язки між гуаніловими та аденіловими нуклеотидами в паліндромних послідовностях, що зумовлює утворення фрагментів ДНК з „липкими кінцями”, які містять неспарені пари нуклеотидів, здатні до комплементарного зеднання:



Для цього класу рестриктаз характерна абсолютна субстратна специфічність, тому за їх участю утворюються специфічні сайти рестрикції, що дає можливість проведення рекомбінації фрагментів ДНК різних за первинною структурою.

У 70-х роках минулого століття було вивчено близько 80 рестриктаз цього класу.

- *Третій клас рестриктаз* за багатьма ознаками подібний до першого. Ці ферменти у вигляді кофактора також містять S-аденозил-метіонін і для підвищення каталітичної активності вимагають присутності АТФ та йонів Mg^{2+} . Субстратами цього класу рестриктаз є короткі не паліндромні чергування нуклеотидів, які включають до 6 н.п., та розміщені на відстані 20-25 н.п. від сайту пізнавання.

Крім бактерій, рестриктази виявлено також у клітинах дріжджів та одноклітинних водоростей.

За участю рестриктаз, залежно від їх субстратної специфічності, можна отримати велику кількість фрагментів ДНК, чергування нуклеотидів на структурі яких відповідає окремим генам. Перед секвенуванням ДНК визначають локалізацію генів та їх первинну структуру, далі, враховуючи субстратну специфічність, застосовують певний клас рестриктаз, що дає можливість отримати гени, необхідні для синтезу специфічних генних продуктів.

Для отримання генів за участю ферментів рестриктаз найчастіше застосовують *рестрикційно-лігазний та коннекторний методи*.

Ці методи дають змогу не лише отримати відповідні гени, але і з'єднати їх з ДНК реципієнтних клітин при формуванні рекомбінантних молекул ДНК.

Перед проведенням рестрикції, за допомогою специфічних ДНК-зондів, які містять ізотопну мітку, виявляють локалізацію генів у геномі. Роль зондів виконують фрагменти ДНК з відомою первинною структурою.

Для виявлення специфічних чергувань нуклеотидів, що містяться на генах, які підлягають виділенню, проводять гібридизацію ДНК-зондів з фрагментами ДНК, первинна структура яких відповідає цим генам. З цією метою застосовують коннекторний метод, який дає змогу проводити гібридизацію продуктів рестрикції різних геномів, внаслідок нарощування на їх кінцях комплементарних олігонуклеотидних фрагментів.

Процес гібридизації забезпечують ферменти 5'-екзонуклеази, ДНК-лігази і термінальні нуклеотидилтрансферази. Внаслідок „віджигу” та наступної гібридизації цих фрагментів утворюються гібридні молекули (Рис. 27).

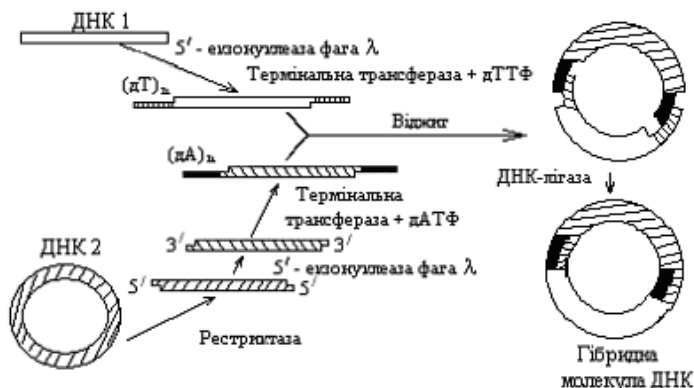


Рис. 27. Отримання гібридних молекул ДНК

Для отримання гібридних молекул ДНК застосовують також рестриктазно-лігазний метод, розроблений С. Коеном (1973 р.). Суть методу у вирізанні, за участю специфічних рестриктаз, певних фрагментів на структурі ДНК, внаслідок чого утворюються „липкі“ кінці. Далі проводять гібридизацію ділянок хромосомної ДНК і ДНК плазмід та зшивають полінуклеотидні фрагменти за участю ферменту ДНК-лігази (Рис. 28).

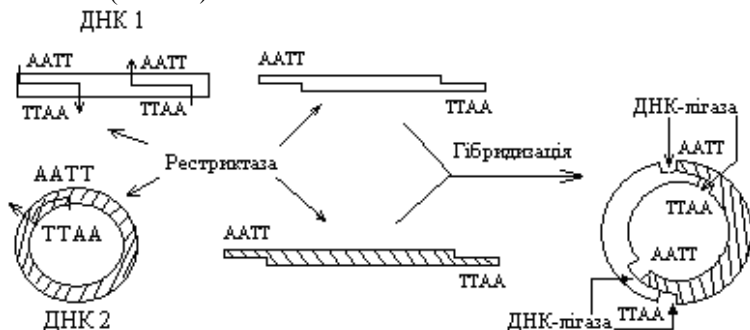
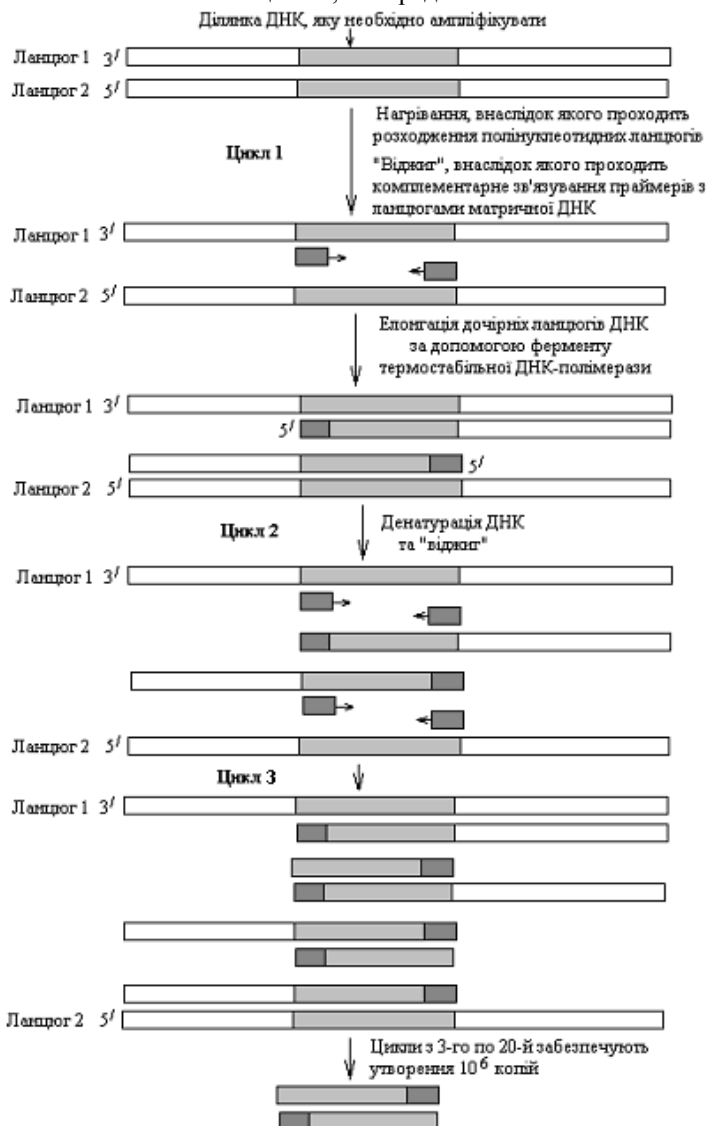


Рис. 28. Рестриктазно-лігазний метод отримання гібридних молекул ДНК

У 80-х роках ХХ ст. К. Ньюлісом було розроблено метод, який давав змогу отримати велику кількість копій фрагментів ДНК, нуклеотидні послідовності яких відповідають певним генам (метод ампліфікації генів). Цей метод ґрунтується на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) – ферментативному синтезі *in vitro* ланцюгів ДНК на основі первинної структури матриці.

ПЛР включає кілька циклів, які представлено на схемі:



Застосування ПЛР значно прискорило роботи по завершенню програми „Геном людини” та сприяло впровадженню у практику високоєфективних тестів для діагностики чисельних захворювань. Середовище для проведення ПЛР містить велику кількість

компонентів. Перш за все, буферну систему з відповідним значенням рН, йони магнію, два олігонуклеотидні праймери, що гібридизуються з двома антипаралельними ланцюгами ДНК і з двох боків фланкують ділянку ДНК, на якій локалізовані відповідні гени. Крім того, необхідна присутність чотирьох видів дезоксинуклеозидтрифосфатів, праймерів та ферменту специфічної термостабільної ДНК-полімерази (Tag-полімерази), виділеної з термофільних еубактерій.

Полімеразна ланцюгова реакція включає:

- денатурацію ДНК при температурі 90°C, внаслідок чого проходить розходження полінуклеотидних ланцюгів (плавлення);
- зниження температури вихідної суміші до 60°C, „віджиг”, результатом чого є комплементарне з'єднання праймерів з ланцюгами матричної ДНК;
- подовження праймерів і синтез дочірніх ланцюгів ДНК (елонгація) за участю ферменту Tag-полімерази, що призводить до експоненційного накопичення специфічних фрагментів ДНК.

ПЛР, як правило, проводять в автоматичному режимі на спеціальному обладнанні (циклізаторах). Багаторазове повторення циклів ПЛР дає змогу отримати велику кількість копій відповідних генів або їх фрагментів. Продукти синтезу кожного з циклів, можуть повторно використовуватися в наступних. Тобто, кількість синтезованих ДНК-копій подвоюються в кожному циклі. При проведенні 20 циклів ПЛР може утворитися близько 1 млн. копій фрагментів ДНК. Як правило, цикли ампліфікації протягом 1,5-3 год. повторюються близько 40 разів.

В останні роки для ампліфікації генів застосовують також метод, який дістав назву NASBA-методу (від англ. *Nucleic Acid Sequence – Base Amplification*). Цей метод дає змогу проводити ампліфікацію фрагментів як ДНК-ової, так і РНК-ової структури. На відміну від попереднього, його проводять при температурі 40°C. Середовище для ампліфікації включає: РНК-полімеразу бактеріофага Т-7, РНК-азу Н і зворотню транскриптазу, виділену з вірусу пташиного мієлобластозу. Субстратами реакції є нуклеозидтрифосфати та 2 специфічних праймери, один з яких виконує роль промоутора для функціонування РНК-полімерази. Роль матриць виконують одно- та дволанцюгові фрагменти ДНК чи РНК.

Як і попередній, цей метод можна застосовувати для діагностики інфекційних та генетичних захворювань, лікування онкохворих та ВІЛ-інфікованих.

ТЕМА: МЕТОДИ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

План

1. Підбір специфічних молекулярних векторів.
2. Одержання рекомбінантних ДНК.
3. Інтегрування рекомбінантних ДНК у клітини-реципієнти.
4. Відбір та клонування клітин, які включають рекомбінантні ДНК.

Основна література: [1, с. 410-457]; [2, с. 351-392].

Додаткова література: [5]; [7]; [13]; [23]; [24]; [25].

1. Підбір специфічних молекулярних векторів

Важливим етапом при формуванні генетично модифікованих структур є включення отриманих генів до складу геному реципієнтних клітин. Одночасно з цим, чужорідна ДНК, введена в реципієнтну клітину, може стабільно функціонувати протягом тривалого часу лише при дотриманні певних умов. У першу чергу, необхідним є збереження здатності ДНК до реплікації в реципієнтній клітині, що не завжди можливе для штучно синтезованих генів, оскільки в них, як правило, відсутні регуляторні ділянки. Для того, щоб ген набув функцій реплікону, до нього слід приєднати специфічні фрагменти – регуляторні ділянки.

Крім того, важливим є проникнення отриманих генів у реципієнтні клітини та інтегрування їх до складу геному. З цією метою використовують специфічні молекулярні вектори, або „провідники”

Вектор – це структурний компонент рекомбінантних ДНК, який забезпечує проникнення і реплікацію їх у реципієнтних клітинах та експресію генів внаслідок транскрипції і трансляції. Реципієнтні клітини та організми, які містять чужорідну ДНК, мають назву **трансформованих**.

Важливими складовими векторів є ділянки полінуклеотидних ланцюгів, на яких присутні сигнали початку і закінчення реплікації (точки *ori* і *ter*), а також кодуєчі чергування нуклеотидів, які несуть певну генетичну інформацію. Кожен вектор повинен володіти здатністю до автономної реплікації, містити субстратні ділянки для приєднання специфічних рестриктаз та кодувати одну чи кілька специфічних ознак, що дають змогу відбирати клітини, які несуть рекомбінантні ДНК. У ролі векторів найчастіше використовують плазмиди, бактеріофаги, а також деякі віруси тварин.

• **Плазмідні вектори.** Для створення цих векторів використовують переважно некон'югативні плазмідні, не здатні до перенесення в інші бактеріальні клітини при кон'югації, що запобігає поширенню потенційно небезпечних рекомбінантних ДНК. Крім того, плазмідні вектори мають ослаблений контроль реплікації (здатність до реплікації, незалежно від геномної ДНК реципієнтних клітин), що забезпечує існування у клітині великої кількості копій плазмід. Важливою характеристикою плазмідних векторів є наявність специфічних маркерних генів, необхідних для їх ідентифікації (гени стійкості до певних антибіотиків), та субстратної ділянки – сайту зв'язування специфічних рестриктаз. При конструюванні плазмідних векторів спочатку проводять маніпуляції, внаслідок яких з їх геному видаляють зайві ділянки ДНК, що не впливають на його функціонування, і включають фрагменти, необхідні для з'єднання вектора з синтезованим геном („липкі кінці“) та посилення експресії. Тривалий час у вигляді векторів використовували природні плазмідні Col E1 і pSC 101. Однак, у зв'язку з цілою низкою недоліків цих векторів, Г. Бойером було створено штучні рекомбінантні плазмідні вектори pBR 322, pBR 324, pBR 325. Перевагою цих векторів є те, що вони містять кілька маркерних ділянок, які визначають резистентність до окремих антибіотиків, та субстратні ділянки для кількох рестриктаз (сайти пізнавання). Ці сайти, як правило, розміщені серед генів резистентності. Важливим є те, що за участю таких векторів можна контролювати трансформацію рекомбінантної ДНК (Рис. 29).

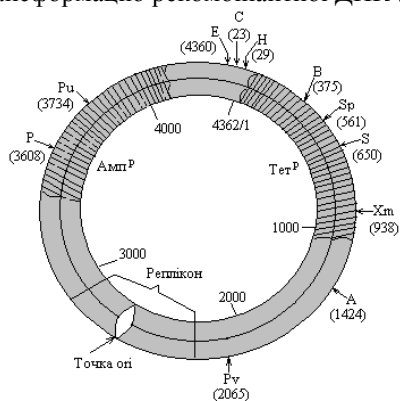


Рис. 29. Будова плазміді pBR 322.

Амп^Р та Тет^Р – гени резистентності до ампіциліну і тетрацикліну; показано сайти рестрикції для різних рестриктаз (цифрами позначено кількість н.п.).

Як видно з рис. 29, на структурі геному плазмиди рВR 322 містяться: точка початку реплікації (ori), ділянка, що кодує ферменти реплікації та гени, які визначають стійкість до антибіотиків ампіциліну і тетрацикліну. Крім того, на одному з кінців тетрациклінового сайту знаходиться сайт пізнавання рестриктазою *RecO*R1 та по одному сайту рестрикції для групи рестриктаз – *RecO*R1, *Bam* H1, *Pst*I, *Sal* I, *Hind* III. Це забезпечує включення у генوم плазмиди чужорідної ДНК без його руйнування.

У клітині бактерії *E. coli* може знаходитися до 50 копій плазмиди рВR 322. Бактерії *E. coli*, які містять ці плазмиди, культивують в селективному середовищі у присутності вказаних антибіотиків. Оскільки в цьому випадку пригнічується ріст клітин, в яких відсутні плазмиди, що містять гени резистентності до антибіотиків, в культуральному середовищі будуть нагромаджуватися лише клітини, в які включено рекомбінантну ДНК (Рис. 30).

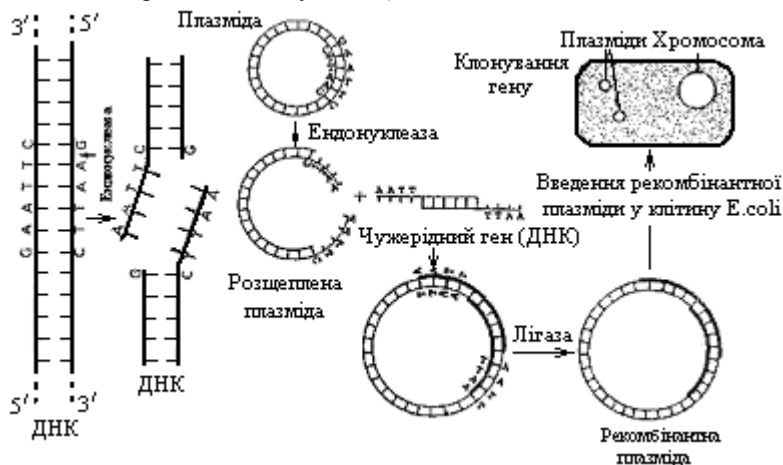


Рис. 30. Включення чужорідного гену в геном плазмиди рВR 322 та клонування генів у клітинах бактерії *E. coli*.

Подібним чином проходить також включення гену β-ланцюга гемоглобіну у бактеріальні клітини за допомогою вектора – плазмиди рМВ-9. Щоб отримати ділянку ДНК, яка відповідає цьому гену, спочатку виділяють іРНК, що кодує його первинну структуру. Далі, за участю ферменту зворотної транскриптази, отримують кДНК, яку використовують у ролі матриці для отримання гену. За участю термінальної транскриптази до цього гену приєднують фрагмент, що

включає дезокситимідинмонофосфат, необхідний для створення „липких кінців” та утворення кільцевої форми. При обробці кільцевої ДНК рестриктазою *ResoR1* формується лінійна форма ДНК, до якої приєднують залишки дезоксиаденозинмонофосфату і ДНК β-ланцюга гемоглобіну “змішують” з ДНК плазміди. Внаслідок наявності комплементарних „липких кінців”, ген β-ланцюга з’єднується з ДНК плазміди та утворюється рекомбінантна структура (Рис. 31).

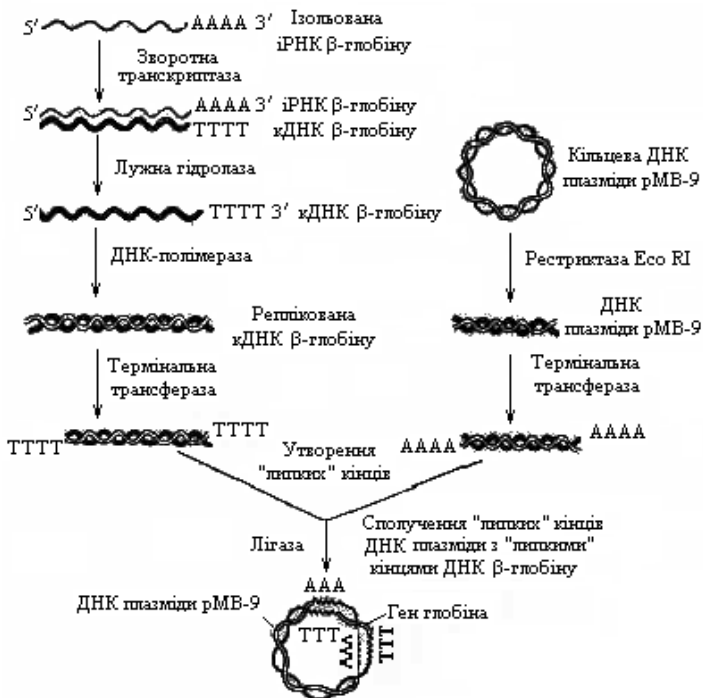


Рис. 31. Включення гену β-ланцюга гемоглобіну кроликів у бактеріальну клітину за допомогою вектора – плазмиди рМВ-9.

Плазміди з інтегрованим геном вводять у бактеріальні клітини, де вони можуть функціонувати протягом багатьох поколінь.

В останні роки створено плазмідні вектори, кількість яких у клітині можна регулювати температурним режимом, присутністю певних метаболітів, інгібіторів, тощо. Зокрема, один з векторів, що функціонує у клітині *E. coli* при температурі 30°C міститься в кількості 4 копій, при 37°C – 78 копій, при 43°C – більше 100 копій.

Для створення рекомбінантних ДНК використовують також плазмідні вектори рUC, сконструйовані на основі плазміди рBR 322 внаслідок вилучення близько 40% її ДНК разом з геном стійкості до тетрацикліну. Замість вилученої ділянки геному в рUC-вектор включають кілька сайтів рестрикції, чутливих до дії різних рестриктаз, та фрагмент гену β-галактозидази (ген Lac Z'). Ця ділянка геному плазміди отримала назву *множинного сайту клонування MCS (multiple cloning site)*. Вказаний сайт дає можливість провести секвенування плазміди Bam HI та інтегрувати і клонувати фрагмент чужорідної ДНК з двома різними кінцями. Тобто, проходить, так зване, *спрямоване або примусове клонування*, коли чужорідна ДНК вбудовується у строго визначену ділянку геному.

Перевагою цього методу формування рекомбінантних ДНК є те, що процес відбувається без утворення „липких” кінців та забезпечує утворення кільцевих форм при формуванні рекомбінантної структури.

Крім того, наявність у складі плазміди С-кінцевого фрагменту гена β-галактозидази забезпечує отримання ферменту, який включає два неактивні протомери. При додаванні в середовище, де містяться трансформовані бактерії синтетичного галактозиду Xgal, він розщеплюється, внаслідок чого специфічний барвник забарвлює продукти розщеплення в синій колір, що дає змогу їх ідентифікації.

Перенесення чужорідної ДНК у реципієнтні клітини за участю плазмід має назву *плазмідної трансформації*.

Враховуючи невеликі розміри плазмід, можливості використання їх у ролі молекулярних векторів обмежені, особливо при необхідності клонування великих фрагментів ДНК. Тому доцільнішим є використання в ролі векторів вірусів бактерій (бактеріофагів), геном яких є більший за розміром, а також має блочну оперонну організацію.

- **Вектори на основі фагових ДНК.** Перші штучні фагові вектори було сконструйовано Ф. Блетнером на основі геному бактеріофага λ, внаслідок вилучення генів лізогенії із збереженням сайтів геному, необхідних для реалізації літичного шляху інфікування. Замість вилученого сайту, до складу геному бактеріофага включали фрагмент чужорідної ДНК. Фагові вектори використовують для включення генів у геном бактерії *E. coli*.

Геном бактеріофага λ, містить близько 45 тис. нуклеотидних пар на яких локалізовано 33 гени, що кодують структурні білки головки і хвостового відростка, а також гени ферментів реплікації ДНК, лізису інфікованих клітин, гени резистентності до ампіциліну, регуляторні ділянки і сайти початку та завершення реплікації (*ori* і *ter*).

Для видалення частини генів з центральної ділянки фагового геному, які не обов'язкові для забезпечення літичного шляху інфікування, застосовують специфічні рестриктази (EcoR I). У видалену ділянку вбудовують фрагмент чужорідної ДНК, внаслідок чого утворюється *конкамер* – попередник для інтегрування фагової ДНК у зрілі фагові часточки. Перевагою використання Бактеріофага λ в якості вектора є те, що до складу геному можна включати більше 6% чужорідної ДНК без порушення його функціонування. Так, один з векторів на основі геному бактеріофага λ (Chagon-4), може акцептувати до 20 Кб ДНК. Тобто, майже вся головка фага може бути заміщена чужорідним генетичним матеріалом.

Вектори на основі Бактеріофага λ мають ряд переваг порівняно з плазмідними. В першу чергу, при їх використанні значно полегшується очищення клонованих рекомбінантних ДНК від інших молекул – залишків хромосомної ДНК клітини-хазяїна. Крім того, при збереженні ділянки фагового геному, яка відповідає за інтеграцію, забезпечується стабільне включення чужорідного геному в геном бактерії *E. coli*, що є важливим для практичного використання генетично модифікованих організмів.

Важливим для генно-інженерних досліджень було створення гібридних векторів (химер), у складі яких присутні плазмідні вектори, що несуть окремі фрагменти ДНК бактеріофага λ , а також штучно синтезовані векторні ділянки чужорідної ДНК, які можуть включати до 50 тис. н.п. За участю цих векторів можна досягти надійної інтеграції фрагментів чужорідної ДНК у бактеріальний геном. Такі вектори дістали назву *фазмід*. Вони поєднують в собі властивості плазмід та бактеріофагів, зокрема, можуть функціонувати в широких температурних інтервалах (від +45 до -30°C). Найчастіше застосовують різновид фазмід pBs, в які вбудовано оріджіни реплікації одноланцюгового бактеріофага f1.

У вигляді векторів часто використовують також *косміди* – гібридні молекули, до складу яких входить 5-8 тис. н.п. Їх отримують вбудовуванням у плазмідний вектор *cos*-сайтів бактеріофага λ . Косміди містять маркерний ген (стійкості до антибіотиків), реплікон плазмід та *cos*-сайт ДНК фага (фрагмент молекули одноланцюгової ДНК). Присутність у косміді фрагменту фагового геному надає рекомбінантній ДНК здатності *in vitro* інтегруватися в головку фага замість його власної ДНК. Значення молекулярної маси фрагментів чужорідної ДНК у такій штучній фаговій часточці може сягати 40-50 Кб, що є важливим для клонування еукаріотичних генів у бактеріальних клітинах.

Значного поширення набули вектори на основі бактеріофагів M13 та fd, геном яких зосереджений на кільцевій одноланцюговій молекулі ДНК. Їх застосовують у випадку проведення маніпуляцій з одним ланцюгом ДНК. При розмноженні такі фаги утворюють дволанцюгову реплікативну форму, до складу якої, за участю специфічних рестриктаз та лігаз, легко можна вбудувати фрагмент чужорідної ДНК, який далі буде ампліфікуватися в одноланцюговій формі (Рис. 32).

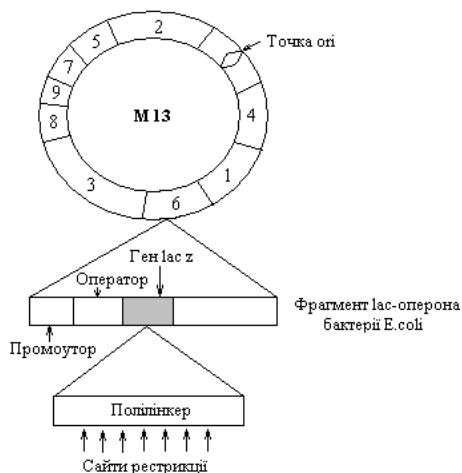


Рис. 32. Вектор на основі бактеріофагу M13.

Оскільки плазмідні вектори не можуть забезпечити трансформацію еукаріотичних клітин, значного поширення набули спеціально сконструйовані вектори, здатні реплікуватися у клітинах про- і еукаріот. Це, зокрема, „човникові” або „гібридні вектори”, які містять два реплікатори: бактеріальний (*E. coli*) і еукаріотичний (у складі дріжджової плазміди).

Перспективним для проведення генетичних досліджень є використання у вигляді векторів найпростіших еукаріотичних клітин – дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*), гаплоїдний геном яких має значно більші розміри, ніж геном бактеріальних клітин. Клітини дріжджів не інфікуються вірусами, однак вони містять плазмиду, яку використовують для створення човникових векторів, що включають фрагменти ДНК дріжджової плазміди з плазмідною pBR 322, яка містить дріжджовий ген. Ці вектори містять гени, які кодують ферменти синтезу амінокислоти гістидину, завдяки чому можна проводити відбір клітин, здатних до функціонування за відсутності цієї

амінокислоти. Перед введенням вектора до клітин дріжджів, за допомогою специфічних ферментів руйнують жорстку клітинну стінку, до складу якої входять поліцукри.

Перевагою молекулярних векторів на основі дріжджових клітин є те, що за їх участю можна клонувати фрагменти ДНК, які включають до 1 млн. н.п. Крім того, клоновані фрагменти мають здатність до рекомбінації з гомологічними ділянками дріжджового геному, що зумовлює його стабільну сайт-специфічну трансформацію незалежно від збереження чи втрати вектора. Для клонування генів у дріжджових клітинах створено вектори на основі кількох репліконів, які містяться в ДНК їх хромосом і мітохондрій. На основі цих векторів отримують трансгенні форми цих найпростіших еукаріотичних організмів. РНК-полімераза дріжджових клітин здатна розпізнавати промотори генів вищих еукаріотичних клітин та синтезувати функціонально активні білки.

На сьогодні, отримано штами дріжджових клітин, які є продуцентами інтерферону людини, антигенних детермінант вірусу гепатиту В та багатьох біологічно активних сполук. Сконструйовано також вектори для перенесення (трансгенозу) чужорідних генів у клітини вищих рослин і тварин. У клітинах рослин, в яких відсутні плазмиди, використовують специфічні вектори, серед яких виділяють кілька груп:

- вектори, на основі бактеріальних плазмід, зокрема, Ti-плазмиди агробактерій (*Agrobacterium tumefaciens*) та Ri-плазмиди (*Agrobacterium rhizogenes*);
- вектори, на основі вірусів рослин;
- вектори, на основі мітохондріальної і пластидної ДНК;
- вектори, на основі транспозибельних елементів геному.

Вектори на основі Ti- та Ri-плазмід

Найважливіше значення для отримання трансгенних рослин мають природні вектори на основі Ti- та Ri-плазмід. Ці плазмиди здатні викликати онкотрансформацію дводольних рослин у природних умовах. Використання їх у вигляді векторів зумовлене будовою геному. На структурі плазмідної ДНК містяться фрагменти, так званої, тДНК (від англ. *transferrea* – перенесення), на яких локалізовані гени фітогормонів та опінінів. Продукти експресії генів фітогормонів стимулюють у рослин неконтрольований ріст недодиференційованих клітин та утворення пухлинних новоутворень (корончастих галлів), а гени опінінів необхідні для синтезу специфічних пептидних сполук, які клітини бактерій використовують в вигляді джерела азотистого живлення. тДНК плазмід фланкована ділянками, між якими інтегровані

гени, які разом з плазмідною можуть транслокуватися до клітин рослин (Рис. 33).

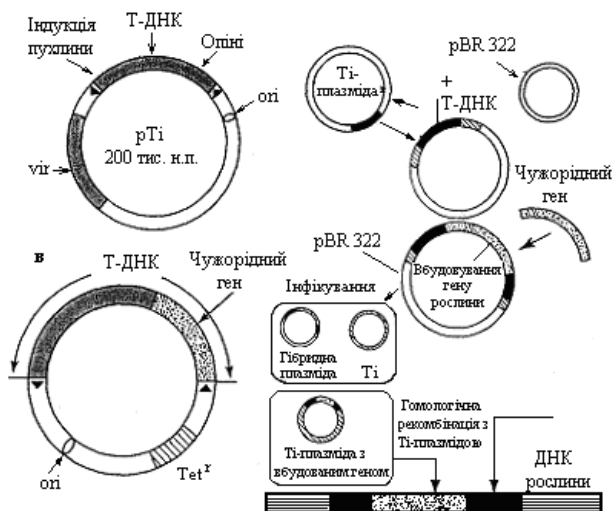


Рис. 33. Ti-плазмідні вектори для транслокації генів у рослинні клітини.

Ti-плазмідні використовують також для формування, так званих, *бінарних систем* на основі рекомбінації ділянок тДНК з геномами інших дрібних плазмід (типу rRB 322). Перевагою цих систем є те, що вони здатні реплікуватися не лише в агробактеріях, але і в клітинах бактерії *E. coli*. На основі Ti-плазмід створено також штучні космідні вектори, які поєднують властивості човникових плазмід і природної системи трансформації у *A. tumefaciens*. Одночасно з цим, чужорідні гени, перенесені за допомогою Ti-плазмід, стабільно зберігаються в геномі рослин і успадковуються, хоч їх експресія, до певної міри, загальмована, оскільки сигнали розпізнавання у складі чужорідної ДНК не сприймаються ферментами клітини-хазяїна. Щоб запобігти цьому в Ti-плазмідні вектори включають ефективні промоутори і термінатори.

Крім плазмідних векторів для трансгенезу застосовують також вектори, сконструйовані на основі вірусів рослин, зокрема, ДНК-геномного вірусу мозаїки цвітної капусти (Сам V), а також РНК-вмісних фітовірусів та віроїдів.

Вектори на основі вірусів тварин. Вказані вище вектори, які використовують для трансгенезу рослин, як правило, непридатні для функціонування у клітинах тваринних організмів, геном яких має

специфічні особливості, тому з цією метою застосовують вектори на основі вірусів тварин і людини. Так, на основі вірусу SV 40 створено кілька видів векторів: трансдукуючі (реплікуються у клітинах нирок приматів та включаються в віріони), трансформуючі, або пасивні, вектори, які не реплікуються і не утворюють віріонів, хоч містять ділянки геному вірусів, що можуть змінювати експресію інших генів. Одночасно з цим, використання векторів на основі вірусу SV-40 є не завжди доцільним, оскільки вірус є онкогенним, а його геном має незначну інформативність. У вигляді потенційних векторів для трансгенезу генів у клітини ссавців використовують адено- та герпесвіруси і вірус віспи.

Для створення векторів при трансформації тваринних клітин використовують папіловіруси, які викликають доброякісні новоутворення. Зокрема, геном папіловірусу великої рогатої худоби (BPV), здатний реплікуватися без утворення віріонів у реципієнтних клітинах і функціонує в вигляді плазміди. Перспективним є також створення універсальних плазмідних векторів, здатних відтворюватися у клітинах нижчих та вищих організмів.

2. Одержання рекомбінантних ДНК

Формування рекомбінантних ДНК при отриманні трансгенних організмів є одним з важливих етапів роботи. З цією метою до середовища, що містить ДНК донора, яка є предметом вивчення, додають реципієнтну ДНК та відповідну рестриктазу. У вигляді реципієнтної ДНК спочатку використовували виключно плазмідні ДНК, здатні переносити певну ознаку на всю популяцію бактеріальних клітин, без одночасної реплікації їх власного генетичного матеріалу.

Рекомбінантні ДНК отримують внаслідок з'єднання вектора з виділеним геном. З цією метою найчастіше застосовують гібридизацію *in vitro* та з'єднання „липких” кінців ДНК, що утворюються за участю рестриктаз класу *II*S. Структура „липких” кінців визначається чергуванням нуклеотидів на сайті пізнавання рестриктазою: всі одноланцюгові фрагменти, які формуються при Z-подібному розриві ДНК, за участю специфічних рестриктаз, мають ідентичну первинну структуру і містять комплементарні пари азотистих основ нуклеотидів.

Включення чужорідних фрагментів ДНК у плазміди проводять у кілька етапів. Спочатку ДНК плазміди переводять у лінійну форму, а ДНК вищих організмів розрізають за участю ферментів рестриктаз на фрагменти, з утворенням „липких” кінців. Це дає змогу об'єднувати будь-які фрагменти ДНК, отримані за участю однієї рестриктази, та створює можливість включення їх до складу вектора. Вектор

розрізають тією ж рестриктазою та об'єднують з ДНК реципієнтної клітини за допомогою „липких кінців”. У деяких випадках, коли з'єднують фрагменти ДНК, „липкі” кінці яких гетерогенні за нуклеотидним складом, для конструювання рекомбінантних ДНК використовують специфічні адаптори („лінкери”). З цією метою між двома сусідніми сайтами ДНК інтегрують третій невеликий фрагмент (адаптор), який після замикання в кільце містить два сайти, чутливі до дії різних рестриктаз. Одна з них активує вектор, а інша забезпечує клонування гену. За участю „липких” кінців адаптора можна з'єднувати різні фрагменти ДНК. Це дає змогу створювати рекомбінантні ДНК, що містять повний набір плазмідних генів, необхідних для автономної реплікації, та інтегровану чужорідну ДНК.

Отримання рекомбінантних молекул ДНК включає два етапи:

- комплементарне з'єднання вектора і клонованого гену внаслідок утворення водневих зв'язків між комплементарними парами азотистих основ нуклеотидів „липких” кінців. Цей процес відбувається спонтанно, без участі ферментів.
- формування рекомбінантних молекул ДНК внаслідок ковалентного зєднання фрагментів гібридних молекул за участю ферментів ДНК-лігаз. Утворення фосфодієфірних зв'язків між сусідніми нуклеотидами каталізують специфічні ДНК-лігази. За цих умов, формуються кільцеві молекули рекомбінантних ДНК, які на певних ділянках плазмідної ДНК містять інтегровані гени. Рекомбінантна ДНК, що несе гени двох видів організмів, має назву *химерної*.

Після створення рекомбінантних ДНК проводять їх клонування, суть якого в отриманні великої кількості копій. Внаслідок клонування утворюється гомогенна популяція молекул, які є прямими нащадками однієї вихідної молекули. Результат клонування залежить від типу вектора. При застосуванні плазмідних векторів проходить нагромадження дочірніх рекомбінантних ДНК, як в реципієнтній клітині, так і у клітинах її нащадків. Для деяких плазмід можлива їх ампліфікація (збільшення числа копій) при обробці культури бактерій розчином хлорамфеніколу високої концентрації. За цих умов, реплікація бактеріальної хромосоми пригнічується, а реплікація плазміди продовжується ще тривалий час. Це дає змогу отримати у клітині велику кількість копій рекомбінантних ДНК плазмід (Рис. 34).

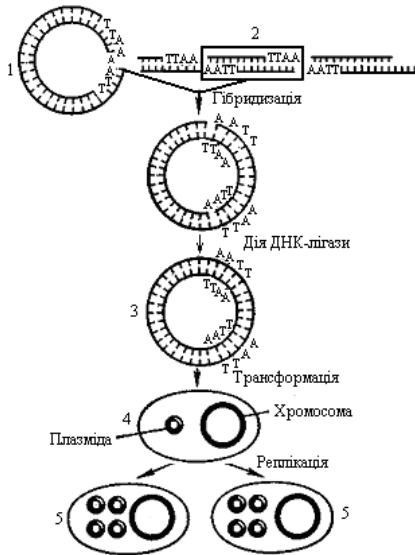


Рис. 34. Отримання рекомбінантної ДНК.

1 – плазміда, яку обробили рестриктазою; 2 – фрагменти ДНК, оброблені тією ж рестриктазою; 3 – химерна плазміда; 4 – трансформована бактерія; 5 – трансформовані дочірні клітини.

Клонування чужорідних ДНК призводить, по-перше, до нагромадження певного фрагменту ДНК у кількостях, які дають змогу вивчити його генетичні та біологічні функції і з'ясувати структуру. По-друге, забезпечує створення генетично видозмінених організмів з цінними властивостями. В першому випадку, як правило, намагаються отримати достатньо високий вихід рекомбінантних ДНК ампліфікацією плазмідних векторів, або повторним інфікуванням клітин рекомбінантними вірусами чутливих клітин. У другому – досягають стабільного функціонування рекомбінантної ДНК у клітині-реципієнті, що забезпечується надійною інтеграцією чужорідного гену в її хромосому.

3. Інтегрування рекомбінантних ДНК у клітини-реципієнти

Для введення рекомбінантних ДНК у реципієнтні клітини застосовують методи генної та клітинної інженерії: трансформацію, трансфекцію, інфікування вірусами чи бактеріофагами, злиття протопластів (у рослин), мікроін'єкції (у клітинах еукаріот).

У випадку, коли рекомбінантну ДНК отримують на основі плазмідних векторів, у клітину її інтегрують внаслідок *трансформації* (включенням ДНК із культурального середовища). Суть трансформації в генетичному обміні, який проходить внаслідок проникнення в бактеріальну клітину очищеної чужорідної ДНК та рекомбінації цієї ДНК з хромосоною клітини-реципієнта.

Ефективність трансформації залежить від ряду факторів, що зумовлено як особливостями рекомбінантних ДНК, так і реципієнтних клітин. Найвищий рівень трансформації відбувається при використанні суперспіралізованих ковалентно з'єднаних молекул ДНК, а також у тому випадку, коли в вигляді вектора використовують плазміди, виділені з того ж виду бактерій, що і реципієнтна клітина. Крім того, молекулярна маса рекомбінантної ДНК не повинна перевищувати більше 20 МДа, а частка рекомбінантних молекул у препараті ДНК, який використовується для трансформації, має бути значною. Одночасно з цим, для перебігу трансформації важливим є вид реципієнтних клітин, здатність їх до інтегрування чужорідної ДНК та відсутність рестриктаз, здатних руйнувати векторні молекули. Слід підкреслити, що навіть при дотриманні оптимальних умов, у клітини *E.coli* проникає і зазнає трансформації лише одна із мільйона рекомбінантних молекул.

Результат трансформації, у значній мірі, визначає первинна структура рекомбінантної ДНК. За відсутності комплементарних пар нуклеотидів у донорній та реципієнтній ДНК, рекомбінантні молекули реплікуються в цитоплазмі бактерій автономно.

Інтеграція чужорідної ДНК до аналога хромосоми бактеріальних клітин відбувається ефективно в тому випадку, коли до складу плазмідного вектора включені специфічні сайти, зокрема, *att*-сайт бактеріофага λ . Якщо рекомбінантні ДНК утворені на основі фагових, або вірусних векторів, у реципієнтні клітини їх інтегрують за допомогою *трансфекції*. Результатом трансфекції є включення дочірніх копій чужорідної ДНК до складу віріону та руйнування реципієнтної клітини. Інколи одночасно з трансфекцією проводять інфікування клітин спорідненим вірусом, що сприяє синтезу білкової оболонки вірусних часточок.

Якщо в ролі вектора було використано віруси, здатні до інтеграції в геном клітини-реципієнта, рекомбінантна ДНК може переходити у стан профагу. У цьому випадку вона буде передаватися наступним поколінням реципієнтних клітин.

Вектори до складу ДНК клітин-реципієнтів вводять також за допомогою *трансдукції* – перенесення фрагменту ДНК однієї бактерії

в іншу за участю помірних бактеріофагів. Ці бактеріофаги можуть викликати лізис клітини, або за механізмом генетичної рекомбінації, вбудувати свій геном у ДНК бактерії. В цьому випадку, інтегрована ДНК фагу (профаг), внаслідок реплікації передається всім нащадкам інфікованої клітини. Процес інтегрування бактеріофагу зворотній, тому, за певних умов, може проходити вихід профагу з геномної ДНК (за механізмом зворотного кросинговеру), що зумовлює синтез компонентів віріону, утворення зрілих вірусних часточок та руйнування клітини. Особливістю помірних бактеріофагів є те, що при дезінтеграції з аналога хромосоми профаг може захоплювати певні ділянки ДНК бактеріальної клітини та втрачати частину власного геному, що зумовлює дефектність трансдукуючими бактеріофагами певних ознак. При контакті з іншими бактеріальними клітинами такі бактеріофаги можуть передавати їм як власні гени, так і гени, захоплені внаслідок дезінтеграції, що надає клітинам-реципієнтам нових якостей.

Розрізняють *специфічну і неспецифічну трансдукцію*. Специфічна трансдукція має місце в тому випадку, коли певний вид бактеріофагів переносить завжди одні і ті ж гени, а неспецифічна – коли вони переносять фрагменти ДНК, які відбираються випадково і можуть знаходитися на різних сайтах. Трансдукція має важливе значення для еволюції бактерій, особливо штамів, не здатних до трансформації і кон'югації, що характерне, зокрема, для стафілококів. По типу трансдукції, за участю вірусів, може проходити обмін генетичним матеріалом і в геномі вищих організмів.

Введення рекомбінантних ДНК до клітини еукаріот проводять за участю *ліпосом* – невеликих за розміром міхурців, оточених мембранами, які отримують *in vitro* дією ультразвуку на водний розчин ліпідів. Якщо замість водного розчину ліпідів використовують фазу, що містить рекомбінантні ДНК, їх молекули можуть захоплюватися ліпосомами. При контакті навантажених рекомбінантними ДНК ліпосом з клітинами еукаріот проходить злиття їх з цитоплазматичною мембраною та проникнення у внутрішні компартменти клітини.

У клітини еукаріот чужорідні ДНК вводять також внаслідок злиття соматичних клітин, які індукують поліетиленгліколем. Цей процес може супроводжуватися нормальною експресією окремих ділянок чужорідної ДНК у гетерологічних клітинах. Такі ж ефекти спостерігаються і при злитті клітин ссавців з протопластами бактерій, в яких було клоновано певний ген еукаріот.

Інтегрування чужорідних ДНК у геном тварин може відбуватися за участю вірусів, до складу ДНК яких було вбудовано необхідний

фрагмент. Можливе також пряме перенесення генів у рослинні протопласти із застосуванням *безвекторних систем на основі методів електропортації, мікроін'єкції та балістики*.

Електропортація ґрунтується на короткотривалому електростимулюванні проникності мембран рослинних протопластів струмом, напругою 1-10 тис. В/см. Цей метод застосовують для отримання трансгенних рослин: кукурудзи, рису, цукрової тростини.

При *мікроін'єкції* чужорідну ДНК вводять безпосередньо в ядро клітини-реципієнта за участю тонкої голки. Процес введення контролюють за допомогою мікроскопії. Методом мікроін'єкції було отримано трансгенний ячмінь і капусту.

Одним з найефективніших є *балістичний метод*, який застосовують для генної трансформації однодольних рослин. Суть методу в тому, що ДНК вектора наносять на часточки вольфраму, діаметром 0,5-1,2 мкм, і фіксують на целофановій матриці всередині балістичної „пушки”, яка функціонує внаслідок перепаду тиску. Після різкого зниження тиску часточки вольфраму, із закріпленим вектором, з великою швидкістю проникають до реципієнтної клітини.

4. Відбір та клонування клітин, які включають рекомбінантні ДНК

Необхідність цих процедур зумовлена, в першу чергу тим, що при застосуванні будь-якого із вказаних вище методів, рекомбінантна ДНК потрапляє лише в невелику кількість клітин. Решта клітин містить різні фрагменти чужорідної ДНК, або молекули ДНК, які не зазнали рекомбінації. У зв'язку з цим, необхідним є проведення специфічного молекулярного відбору за допомогою методу, що ґрунтується на маркуванні генів, які входять до складу вектора. Це можуть бути гени резистентності бактерій до одного чи кількох антибіотиків. На структурі цих генів містяться сайти рестрикції, специфічні для певних рестриктаз, в які включено чужорідну ДНК. Ці гени функціонують при утворенні рекомбінантних ДНК.

Для виділення із суміші трансформованих і нетрансформованих реципієнтних клітин тих, які несуть рекомбінантні ДНК, їх культивують на середовищах у присутності ампіциліну і тетрацикліну. У випадку, коли при утворенні „липких” кінців використовували рестриктазу ВамНІ, яка інактивує ген стійкості до тетрацикліну, клітини, що містять рекомбінантну ДНК, утворюють колонії лише на середовищі з ампіциліном. Клітини трансформовані лише одними векторними молекулами будуть утворювати колонії за присутності

двох антибіотиків. Нетрансформовані клітини та клітини, що не містять вектора, на цих середовищах не утворюють колоній.

При відсутності специфічних маркерних генів, для відбору клітин з рекомбінантними ДНК використовують *метод гібридизації колоній in situ*. Цей метод застосовують в тому випадку, коли потрібний ген було отримано методом зворотної транскрипції. Суть методу *in situ* в тому, що колонії реципієнтних бактеріальних клітин вирощують на нітроцелюлозних фільтрах, розміщених на поверхні щільного поживного середовища, копіюють їх та переносять на нове культуральне середовище за допомогою фільтра. Колонії, які залишилися на фільтрі, піддають лізису в лужному середовищі, денатурують нагріванням і фіксують. Далі на фільтр наносять препарат вихідної іРНК, помічений радіоізотопною міткою. Отриманий зразок комплементарний до гену, включеного у трансформовані клітини, внаслідок чого утворюється гібрид між іРНК і ланцюгами денатурованої ДНК. Присутність на фільтрі РНК/ДНК-гібридів вказує на локалізацію генетично змінених клітин, які виявляють методом радіоавтографії.

Інший метод ідентифікації рекомбінантних ДНК ґрунтується на гібридизації нуклеїнових кислот з використанням препаратів неочищених тотальних іРНК клітин донора. Суміш таких іРНК, після попередньої гібридизації з денатурованою ДНК реципієнтних клітин, вводять в безклітинну білоксинтезуючу систему. При наявності в структурі фрагментів ДНК геному клітин донора проходить інактивація матричного синтезу комплементарних ланцюгів іРНК, у зв'язку з чим гальмується синтез відповідних білків.

Для виявлення трансформованих клітин застосовують також імунологічні методи, при проведенні яких необхідна експресія чужорідних генів. З цією метою реципієнтні клітини на поверхні щільного поживного середовища піддають лізису, після чого їх покривають полімерною плівкою з нанесеним антигеном, до білка-продукту певного гену, внаслідок чого утворюється комплекс антиген/антитіло. Локалізацію колоній виявляють при повторній обробці поверхні плівки антитілами з тією ж антигенною специфічністю, помічених радіоактивною міткою. Помічені антитіла зв'язуються із специфічними антигенами і легко можуть бути виявлені радіоавтографією.

Після відбору клітин, що містять рекомбінантні ДНК, проводять їх *клонування* у системах, які включають прокаріотичні клітини-реципієнти і вектори, хоч інколи використовують і клітини еукаріот. В цьому випадку, в ролі реципієнтних можуть бути використані клітини

дріжджів, рослин і тварин. Перевагами системи дріжджові клітини/вектор є те, що розмір гаплоїдного геному дріжджів у кілька разів більший від бактеріального (містить $1,4 \times 10^7$ н.п., які розподілені між 17 хромосомами).

Завершальним етапом отримання генетично модифікованих організмів є *експресія клонованих генів* у різних системах *in vitro* чи *in vivo*, що залежить від рівня проведення маніпуляцій з генами та мети і очікуваних наслідків. Тобто, по-суті, цей етап пов'язаний з включенням у роботу генетично модифікованих структур. Найефективніше експресія генів відбувається при перенесенні їх у клітини генетично споріднених організмів, зокрема, між різними родинами грампозитивних бактерій, а також між різними класами ссавців. Експресія генів у гетерологічних клітинах (еукаріоти-прокаріоти), як правило, загальмована, що зумовлено різницею в організації генетичного матеріалу, наявністю на структурі ДНК еукаріот нетранслуючих послідовностей нуклеотидів, нестабільністю іРНК і білків у чужорідній клітині, порушенням процесів посттранскрипційної модифікації та ін. Найчастіше гальмування експресії спостерігається в гетерологічних системах при перенесенні генів вищих організмів у клітини бактерій. Значно ефективніше відбувається *експресія генів* вищих організмів у клітинах нижчих еукаріот, зокрема, дріжджових клітинах.

Щоб забезпечити функціонування еукаріотичного гена в бактеріальних плазмідах, в нього включають високоєфективний промоутор, або проводять злиття генів, суть якого в тому, що на межі між генами вирізають ділянки, які визначають сайти їх початку і закінчення. За цих умов, проходить об'єднання синтезованих генних продуктів. Зокрема, оскільки ген, що кодує рилізінг-фактор соматотропного гормону – соматостатин, який було синтезовано хімічним методом, не містив регуляторних ділянок, для його функціонування у клітині *E. coli*, його вбудовували в вектор разом з геном, що кодує β -галактозидазу цієї бактерії. Чергування нуклеотидів цього гену при транскрипції і трансляції локалізовані на С-кінцевій ділянці ферменту β -галактозидази та містять регуляторні сигнали гену ферменту. Біологічно активний ген соматостатину відокремлювали від β -галактозидази і використовували для синтезу соматостатину. Тобто, регуляторні ділянки гену β -галактозидази забезпечували функціонування гену соматостатину.

Для функціонування гену інтерферону у клітинах *E. coli*, до нього також приєднували регуляторні ділянки, необхідні для наступної транскрипції і трансляції.

ТЕМА: ДОСЯГНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

План

1. Трансформація та трансгенне отримання рослинних організмів.
2. Трансгенез тваринних організмів.
3. Застосування досягнень генної інженерії в медицині.

Основна література: [1, с. 410-457]; [2, с. 351-392].

Додаткова література: [5]; [7]; [16]; [23]; [24]; [25].

1. Трансформація та трансгенне отримання рослинних організмів

За роки, що минули з часу започаткування генно-інженерних досліджень та формування генної і клітинної інженерії, як прикладних напрямків молекулярної біології та генетики, досягнуто значних успіхів у проведенні цілеспрямованої перебудови генетичних структур нижчих і вищих організмів. Наукові надбання вчених різних країн світу забезпечили конструювання генетично модифікованих організмів з цінними для людини якостями та отримання на їх основі генних продуктів, які широко застосовують у різних галузях народного господарства і медицині. Протягом тривалого часу успішно проводилися різні маніпуляції не лише з окремими генами, але і з геномами різних видів організмів, а також з окремими хромосомами та їх фрагментами.

В 70-80-х роках минулого століття було розроблено методи створення рекомбінантних ДНК та отримання генів внаслідок секвенування (фрагментації) геномів нижчих організмів або в результаті хіміко-ензиматичного синтезу *in vitro* і перенесення (трансгенезу) генів між клітинами одного чи різних видів організмів. На основі цього, стало можливим отримання трансгенних організмів із специфічним комбінуванням генів та відповідними спадковими ознаками, внаслідок поєднання генетичних структур, отриманих від організмів, розділених видовими ознаками. В цьому випадку, можливість трансгенезу не залежить від таксономічної спорідненості організмів, що, по-суті, відрізняє методи генної інженерії від традиційних методів селекції.

У наступні роки досягнення генної інженерії сприяли розробці методів поєднання різних геномів в одній клітині та отримання функціонально активних молекул рекомбінантних ДНК на основі

створення „химерних” плазмід, які включали фрагменти геномів не лише бактерій, але і рослинних та тваринних організмів. Застосування методів генної інженерії створило передумови для отримання трансгенних рослинних і тваринних організмів, що, у значній мірі, сприяло вдосконаленню їх генотипу та спадкових ознак. З метою генної трансформації рослинних організмів, протягом тривалого часу застосовують специфічні технології, які ґрунтуються на прямому (безвекторному) перенесенні генів, а також транслокації їх за участю Tі та Rі-плазмід агробактерій, що можуть інтегруватися до складу геному дводольних рослин.

Важливе значення для трансгенозу рослинних організмів мала розробка технології виділення, злиття та культивування протопластів. Це дало змогу створити велику кількість трансгенних культур, отримання яких було раніше не можливе, оскільки вони не інфікуються агробактеріями, які, зазвичай, використовують у ролі молекулярних векторів. У цьому випадку, чужорідна ДНК поглинається безпосередньо протопластами.

Застосування методів генної інженерії дало можливість отримати генетично модифіковані рослини ячменю, рису, пшениці, кукурудзи з цінними харчовими якостями. Внаслідок введення в геном цих рослин чужорідних генів, вони набували спадкових ознак, характерних для вихідних форм. Це, зокрема, здатність до синтезу незамінних амінокислот, запасних видоспецифічних білків, які визначають якість білків ячменю (гордеїну), пшениці (глютеліну), кукурудзи (зеїну). Для покращення якісних показників білка бобових рослин до складу їх геному включають гени синтезу незамінної амінокислоти метіоніну. З цією метою, модифікований ген білка леґуміну інтегрували в Tі-плазмід у агробактерій, а потім до клітин тютюну. Внаслідок цього, в насінні трансгенних рослин нагромаджувався білок леґумін В з підвищеним вмістом метіоніну.

Ще одним важливим напрямком генно-інженерних досліджень стало отримання трансгенних рослин, стійких до бур'янів, вірусів та комах-шкідників. Зокрема, спори *Bacillus thuringiensis* містять ген *Bt2*, який кодує проєндотоксин. У комах, внаслідок часткового протеолізу, він перетворюється в біологічно активну форму, яка згубно діє на комах-шкідників. Ген прототоксину *Bt2* за участю плазмиди *pBr322* включали у штам агробактерій за участю штучно змінених химерних Tі-плазмід. Внаслідок цього, між Tі-плазмідною і химерною плазмідною проходив трансгеноз, що забезпечувало синтез прототоксину.

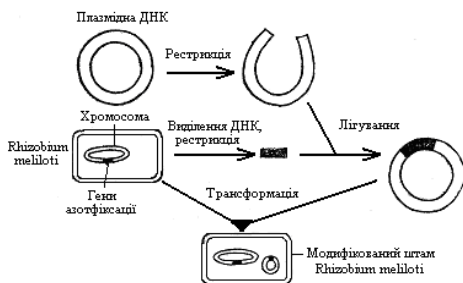
Значним досягненням генної інженерії було також створення генетично модифікованих рослин, стійких до гербіцидів таких як

гліфосат, хлорсульфурон та інших. Вказані гербіциди пригнічують активність ферментів синтезу незамінних амінокислот та перебіг процесу фотосинтезу в рослин. Для отримання рослин, стійких до гліфосату, до складу вектора, отриманого на основі Ri-плазмід, включали мутантний ген, виділений з сальмонел не чутливих до цього гербіциду. Бактеріальний ген інтегрували у клітини тютюну та створювали оптимальні умови для його експресії. Рослини, які містили гени мутантного бактеріального ферменту, були стійкими до впливу гліфосату.

Можливим є інший шлях отримання трансгенних рослин, стійких до цього гербіциду. Зокрема, дослідниками американської компанії „Монсато” було розроблено метод, суть якого в виділенні з клітин петунії іРНК, в структурі якої закодовано фермент, чутливий до дії гербіциду. За участю зворотної транскриптази на структурі іРНК було синтезовано кДНК, яку включали до складу вектора (Ri-плазмід). Для посилення ефективності експресії генів плазмиди до них приєднували сильний промоутор, виділений з геному вірусу цвітної мозаїки капусти. Трансформовані рослини з включеним химерним геномом, були набагато стійкіші до дії гліфосату, порівняно з вихідними формами. Внаслідок трансгенезу отримано трансгенні рослини, в геномі яких містяться гени, генні продукти яких виявляють токсичну дію на москітів, малярійних комарів та інших комах.

Водорості з інтегрованим геномом токсину *Bacillus thuringiensis* згубно діють на малярійний плазмодій. Методами генної інженерії створено сорти рослин, стійкі до дії вірусів, бактеріальних інвазій, грибкових захворювань, посухи та інших несприятливих факторів довкілля, а також рослин, здатних до фіксації атмосферного азоту, внаслідок включення до їх геному відповідних генів. Включення генів азотфіксації особливо важливе для злакових культур, не здатних до симбіозу з бульбочковими бактеріями.

Механізм включення генів азотфіксації до штаму *Rhizobium meliloti* представлено на схемі:



Сучасні ДНК-технології дають змогу отримувати трансгенні рослини, які за окремими якісними показниками суттєво різняться від вихідних форм. Зокрема, голландськими дослідниками створено сорт цукрових буряків, клітини яких синтезують низькокалорійний заміник цукру – фруктан, внаслідок вбудовування в геном буряків гену артишоку, що кодує специфічний фермент, здатний перетворювати 90% цукрози у фруктан. Для створення безкофеїнових сортів кави в геном рослин замість видаленого гену, який кодував фермент синтезу кофеїну (ксантозин-метилтрансферазу), вбудовували його антизмістову копію з культури безкофеїнових сортів рослин. Отримані трансгенні рослини містили кофеїн у кількості, яка складала лише 2% від його вмісту у вихідних формах.

Культури рослинних тканин і клітин широко застосовують для оздоровлення посадкового матеріалу. У вигляді експлантатів, у цьому випадку, використовують апікальну меристему, яка не встигає інфікуватися через швидкий поділ у точці росту. Отримані таким чином рослини, не інфікуються вірусами, мають підвищену врожайність, що важливо для отримання посадкового матеріалу (картоплі, суниць, малини). Клітинні культури (селекція на клітинному рівні) застосовують для отримання рослин продуцентів алкалоїдів, біологічно активних сполук.

Важливим досягненням при створенні трансгенних рослин, стало використання методик по злиттю протопластів *in vitro*. Культивування протопластів у суспензії дає змогу проведення селекції на рівні клітин, оскільки їх популяції, на відміну від клітин тварин, можуть започатковувати цілі рослини (явище тотипотентності). Залежно від складу і властивостей культурального середовища можна проводити спрямовану селекцію та отримання рослин стійких до захворювань, пестицидів, несприятливих умов вирощування.

Одним з напрямків селекції на клітинному рівні є парасексуальна гібридизація, розроблена Г. Фрусі і Г. Барскі, суть якої у злитті окремих соматичних клітин чи протопластів. Ефективність цього методу було підвищено внаслідок внесення в культуральне середовище інактивованого вірусу грипу типу Сендай.

На основі злиття клітин і протопластів різного походження можна отримати:

- гібридні клітини, що поєднують генотипи вихідних форм;
- асиметричні гібриди з різним вмістом генетичного матеріалу;
- цибриди – гібридні клітини, які містять ядро однієї клітини в цитоплазмі іншої.

Злиття протопластів *in vitro* може відбуватися спонтанно після руйнування клітинних стінок, або під впливом зовнішніх чинників – електрошоку чи поліетиленгліколю. Цим методом із протопластів та гібридних клітин отримано вегетативні органи рослин.

Сучасні технології, які ґрунтуються на методах культивування рослинних клітин *in vitro*, дають змогу вирішити ряд важливих проблем. Це, в першу чергу:

- отримання безвірусних сортів рослин;
- проведення селекції на клітинному рівні внаслідок використання самоклональної мінливості та штучного мутагенезу;
- формування нових генотипів внаслідок соматичної гібридизації клітин та протопластів.

Все викладене вище, засвідчує безмежні можливості генної інженерії по створенню генетично-модифікованих рослинних організмів. Внаслідок широкого застосування сучасних біотехнологій вченими успішно реалізуються наукові проекти, які є майже фантастичними. Значна частина цих проектів сприяла вирішенню важливих нагальних проблем, що стосуються підвищення врожайності сільськогосподарських культур, їх якісних показників, стійкості до хвороб і шкідників. Одночасно з цим, успіхи в конструюванні штучних генетично модифікованих рослинних організмів неоднозначно сприймаються як вченими, так і широким загалом, оскільки існує цілий ряд застережень стосовно доцільності проведення маніпулювання з генами в таких масштабах. Крім того, немає жодної гарантії того, що продукти харчування, які містять модифіковані організми, не виявлять шкідливого впливу на організм людини і тварин у найближчому майбутньому. Не виключною є також міграція інтегрованих генів між різними видами рослин, що може зумовити порушення екологічної рівноваги.

Слід підкреслити, що застереження вчених стосовно доцільності отримання та використання трансгенних культур мають реальну основу. Зокрема, вченими Інституту вищої нервової діяльності та нейрофізіології Російської Академії наук у дослідках на тваринах було встановлено, що близько 50% тварин, до раціону яких додавали корм, що містив генетично модифіковані організми, гинули, а 40% мали різні вади розвитку. Крім того, у всіх піддослідних тварин було виявлено порушення репродуктивних функцій.

Небезпека використання генетично модифікованих продуктів харчування з кожним роком зростає, оскільки у світовому масштабі близько 30 млн. га засівають генетично модифікованими культурами.

За даними вчених в Україні 50% сої і кукурудзи містять ГМО, а 94% світових посівів сої – це генетично модифіковані рослини.

Характерним є те, що відношення до ГМО у країнах світу різне: у Бразилії більшість культур, які вирощують, містять ГМО. Генетично модифіковану сою, картоплю, кукурудзу постачають США, Канада, Китай, Індія. „Золотий” індійський рис також містить ГМО. В переважній більшості Європейських країн використання генетично модифікованих культур заборонено. Повністю відмовилися від вирощування та завезення таких культур Німеччина, Австрія, Швейцарія, Польща, Греція, Африканські країни.

Одночасно з цим, прогрес науки зупинити неможливо, як неможливо і повністю заборонити генно-інженерні дослідження, їх слід контролювати й спрямовувати в напрямку, який може забезпечити ефективне та виважене використання всіх унікальних можливостей. З цієї метою слід об'єднати зусилля вчених різних країн світу, впроваджувати і постійно вдосконалювати сучасні біотехнології, які б виключали можливість непередбачуваних наслідків їх застосування.

2. Трансгенез тваринних організмів

Порівняно з успіхами в генній трансформації рослинних організмів, генно-інженерні дослідження на тваринних об'єктах є, до певної міри, обмеженими. В переважній більшості проводять трансгенез тваринних клітин *in vitro* на специфічних культуральних середовищах за участю чужорідних ДНК, що дає можливість вирішувати цілий ряд важливих проблем.

У вигляді векторів для трансгенезу використовують віруси та транспозибельні елементи геному. Найчастіше для трансформації клітин тваринних організмів застосовують онкогенний вірус SV-40. За допомогою цього вірусу Р. Дженіксом (1978 р.) у клітини приматів було перенесено бактеріальний ген супресорної tРНК та забезпечено його транскрипцію. Часто для трансгенезу, в вигляді векторів, використовують також віруси поліоми, герпесу, адено- та ретровіруси.

Роль селективних маркерів перенесення генів, зазвичай, виконують специфічні домінантні гени, інтегровані до складу геному молекулярних векторів (ген тимідинкінази у складі геному вірусу герпеса). Тобто, перенесення та включення генів до складу геному, може індукувати дію окремих його сайтів та посилювати функціонування певних генів. Так, Д. Мерілом і Ю. Хорстом було розроблено метод перенесення генів бактерії *E. coli* в фібробласти людини за участю бактеріофага λ . Суть методу в тому, що в культуру фібробластів із зниженою активністю ферменту β -галактозидази,

отриманих від хворих β -галактозидозом, інтегрували бактеріофаг λ , в геном якого включили ген Z (β -галактозидази E. coli). Результатом цього була індукція ферменту у клітинах фібробластів.

На сьогодні, генетична трансформація тваринних клітин *in vitro* є в достатній мірі освоєною біотехнологією, що забезпечує можливість подолання міжвидових бар'єрів та обмін генетичним матеріалом між філогенетично віддаленими організмами, контакт між якими на рівні геному, зазвичай, практично неможливий. Сучасні біотехнології, які ґрунтуються на методах культури клітин *in vitro*, забезпечують можливість клонування генотипів клітин без запліднення та отримання парасексуальних гібридів, проведення селекції на рівні клітин внаслідок самоклональної мінливості та штучного мутагенезу.

Селективні середовища для відбору мутантів та парасексуальних гібридів використовують для отримання трансгенних тварин. Прикладом може бути використання селективного ГАТ-середовища, до складу якого було включено гіпоксантин-аміноптерин та лізин, для добору гібридів між мутантними клітинами ссавців, які втратили активність ферменту гіпоксантин: гуанін-фосфорибозилтрансферази, а інші – фермент тимідинкінази. При злитті таких клітин активність вказаних ферментів поновлюється. Створення селективних середовищ дає змогу отримувати різні мутантні клітини. Метод парасексуальної гібридизації дає змогу об'єднувати генотипи філогенетично віддалених організмів. Сучасні клітинні технології разом з методами генної інженерії відкривають значні перспективи для розвитку генної селекції на рівні клітин організму. Одночасно з цим, проведення маніпуляцій з генами на організмовому рівні є значно складнішим.

Вперше трансгеноз на рівні організму було проведено Г. Рубінім та А. Спредлінгом (1982 р.) на дрозофілах. З цією метою було сконструйовано *gouy*-транспозон (*gyl*) внаслідок поєднання хромосомного гену „дикого” типу (*gy*⁺) та транспозибельного елементу P. Отриману рекомбінантну ДНК включали в клітини дрозофіли, мутантні по гену *gouy*. Результатом цих маніпуляцій був синтез ферменту ксантиндегідрогенази, який забезпечував один з етапів синтезу меланіну. Дефектні по гену *gouy* особини (*gy*⁻) мали інший колір очей, ніж трансформовані особини „дикого” типу (*gy*⁺). Генно-інженерні технології отримання трансгенних організмів постійно вдосконалювалися протягом 90-х років минулого століття та на початку третього тисячоліття. Зокрема, було розроблено технології включення та клонування генів в яйцеклітини і клітини ембріонів на різних стадіях онтогенезу.

Крім того, встановлено, що залежно від наявності у складі генів специфічних регуляторних ділянок, імплантовані гени можуть функціонувати у клітинах різних тканин. Так, якщо до гену, виділеного з будь-якого виду організму (бактерій, рослин, тварин, людини), приєднати регуляторні ділянки гену виділеного з печінки мишей, він буде функціонувати у клітинах інших трансгенних організмів. Це створює можливість індукції генів, активність яких пригнічена.

Методами генної інженерії створено трансгенні організми, в яких функціонують гени вірусів, бактерій, рослин. Для перенесення генів у тваринні організми їх вводять в ядро заплідненої яйцеклітини (зиготи) шляхом ін'єкції. Першу спробу генетичної трансформації вищих організмів внаслідок прямої ін'єкції у пронуклеус зиготи миші плазмиди pBR322, геном якої містив ген ферменту тимідинкінази вірусу герпесу та фрагмент геному вірусу SV-40, було здійснено Дж. Гордоном (1980 р.) Виділені гени вводили в запліднені яйцеклітини за допомогою шприця та мікропіпетки, внутрішній діаметр якої менший 5 мкм. Можливим є також трансгеноз безпосередньо в клітину за участю вірусів (внаслідок трансфекції) (Рис. 35).

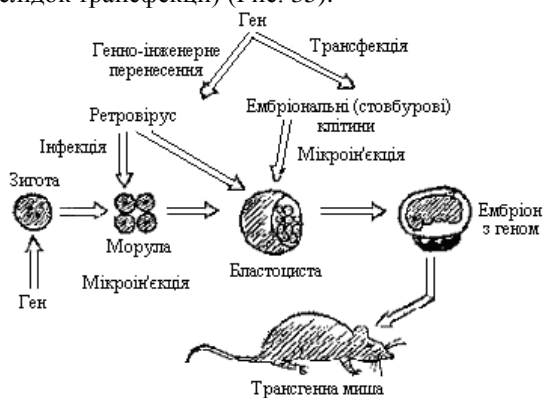


Рис. 35. Перенесення генів у генетичний апарат тваринних організмів.

Згодом було отримано трансгенні організми, здатні продукувати біологічно активні сполуки – гормон інсулін, еритропоетин, активатор плазміногену, інтерлейкіни, гонадотропні гормони, антигенні детермінанти вірусу гепатиту В, тощо. Так, при імплантації генів людини у клітини гіпофізу трансгенних мишей отримано цінні генні продукти, зокрема, гормон інсулін. Внаслідок тривалих досліджень отримано трансгенні миші, в молочних залозах яких синтезувався β-

лактальбумін овець. Методами генної інженерії отримано мишей, у геном яких включено молекулярні вектори, що забезпечують синтез гормону росту людини і щурів.

До кінця 90-х років минулого століття отримано велику кількість трансгенних сільськогосподарських тварин, які за одне покоління набувають таких цілеспрямованих змін, для появи яких необхідне проведення селекції протягом кількох десятиліть. Зокрема, на основі методів генної інженерії шотландськими вченими під керівництвом Я. Вілмата розроблено технологію клонування тваринних організмів, що дало можливість отримати необмежену кількість „генетичних копій”, для яких характерні певні цінні ознаки. Першою твариною, отриманою методом клонування, була вівця Доллі (Рис. 36).

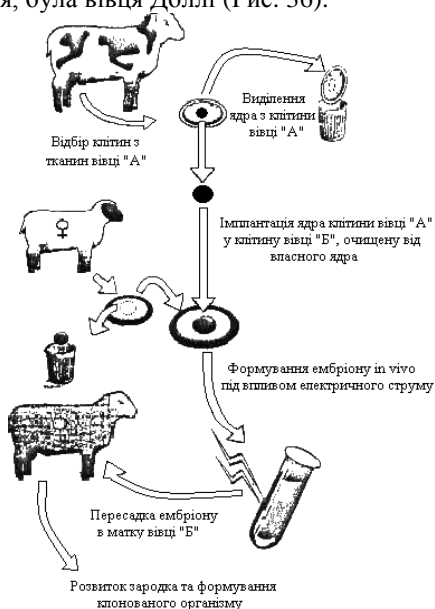


Рис. 36. Клонування тваринних організмів.

Суть методу в тому, що з вим'я вівці А відбирали клітини, в яких на деякий час було пригнічено активність генів. З яйцеклітини вівці В видаляли ядро та витримували її при температурі 5-10°C. Денуклейовану клітину цієї вівці піддавали дії електричного струму, щоб полегшити проникнення в неї ядра вівці А. Електричний розряд сприяв ефективному зіткненню статевих клітин. Результатом цього було отримання яйцеклітини з ядром, в якому була локалізована

генетична інформація не двох вихідних організмів, як це буває при звичайному заплідненні, а лише однієї – вівці А. Запліднену таким чином яйцеклітину імплантували в матку вівці В, яка виношувала майбутнього клона до народження (1996 р.).

Застосування сучасних генних технологій по клонуванню генів та трансформації тваринних організмів дає можливість проводити міжвидовий трансгенез та забезпечити створення організмів із специфічними, корисними для людини, якостями.

3. Застосування досягнень генної інженерії в медицині

Значення досягнень генної інженерії в медицині є незаперечним. Вони реалізуватися в кількох напрямках:

- у розробці методів мікробіологічного синтезу біологічно активних сполук та інших генних продуктів з цінними якостями з метою застосування їх для лікування і профілактики захворювань;
- у вивченні молекулярних аспектів розвитку спадкових захворювань та розробки методів їх лікування і профілактики;
- при проведенні генної терапії спадкових захворювань;
- при з'ясуванні молекулярних механізмів старіння організму на основі вивчення вікових змін в структурі окремих генів хроматину та функціонування всього генетичного апарату клітини.

У сучасних біотехнологіях застосовують велику кількість генетично модифікованих штамів мікроорганізмів, за допомогою яких отримують біологічно активні сполуки (гормони, ферменти), лікарські препарати, цінні білкові продукти.

Зокрема, методом мікробіологічного синтезу отримано гормони (інсулін, соматотропін), незамінні амінокислоти (лізин, метіонін, треонін), антибіотики, вакцини, інтерферони, біологічно активні пептиди (релаксин, еритропоетин), біогенні аміни (ендорфіни, енкефаліни). Ці продукти мікробіологічного синтезу широко застосовують в медицині для лікування і профілактики різних метаболічних розладів та захворювань.

Вперше технологію отримання інсуліну з використанням методів генної інженерії було розроблено У. Гілбертом (1980 р.). З цією метою, спочатку виділяють іРНК, на якій закодована структура інсуліну, після цього, за участю зворотної транскриптази, отримують кДНК, яку далі включають у плазмиду, а останню у клітини *E. coli*, які культивують на специфічному культуральному середовищі (Рис. 37).

За даних умов, в бактеріальних клітинах проходить синтез препроінсуліну, який під впливом специфічних ферментів

розщеплюється спочатку з утворенням проінсуліну, а далі і біологічно активного гормону.

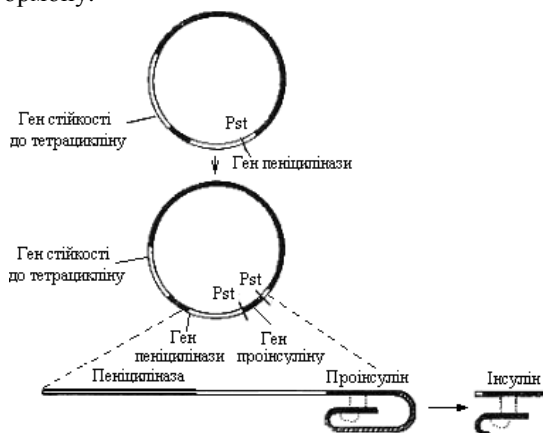


Рис. 37. Біосинтезу інсуліну щура за допомогою генетично модифікованих клітин бактерії *E. coli*.

Для лікування чисельних спадкових захворювань широко застосовують генну терапію, суть якої в корегуванні дефектного клітинного геному внаслідок заміни ушкоджених генів нормально функціонуючими. Вбудувати нормально функціонуючий ген замість дефектного, можна внаслідок рекомбінації молекул ДНК та клітинної гібридизації.

У деяких випадках замість заміни генів проводять їх стимуляцію. Це стосується, зокрема, отримання антивірусних білків.

Ще одним напрямком генної інженерії та застосування сучасних біотехнологій для лікування і профілактики вірусних захворювань і бактеріальних інвазій є досягнення в галузі імунології. Це стосується, в першу чергу, посилення захисних механізмів регуляторних систем організмів внаслідок стимулювання імунної відповіді на появу антигенів (збудників захворювань). Зокрема, ще в 80-х роках минулого століття було створено бактеріальні штами – продуценти антивірусних білків лімфокінів, до яких належать інтерферони, інтерлейкіни, фактори що стимулюють утворення гранулоцитів та ін. Інтерферони продукуються клітинами імунної системи (Т-лімфоцитами) в відповідь на появу антигенів. Тобто, їм властиві функції антитіл. Одночасно з цим, всі три типи інтерферонів (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), отримані внаслідок мікробіологічного синтезу, володіли значно нижчою

активністю порівняно з інтерфероном, що продукується в організмі природним шляхом (лейкоцитами та фібробластами).

Враховуючи це, методами генної інженерії було отримано *імуномодулятори* такі як генферон, віферон та *індуктори* інкреції інтерферонів, серед яких важливе значення мають панавір, аміксин, лавомакс, анаферон (стимулюють виділення γ -інтерферону). Інші індуктори – арбідон і циклоферон є індукторами α -інтерферону, а галавіт та імуномакс індують інкрецію обох видів інтерферонів. γ -Інтерферони застосовують як профілактичні засоби, в той час як α -інтерферони – в період загострення хвороби.

Важливим у боротьбі з вірусними захворюваннями було створення штучних моноклональних рекомбінантних антитіл із специфічними властивостями. Метод отримання моноклональних антитіл було розроблено німецькими дослідниками Д. Келлером і Д. Мілстейном (1975 р.) на основі злиття клітин пухлини з В-лімфоцитами та отримання клітинних гібридів (гібридом). Клітини пухлин надають лімфоцитам здатності до необмеженого росту і розмноження поза організмом із збереженням здатності до продукування антитіл в культуральне середовище. З кожної гібридної клітини можна отримати клон, здатний продукувати антитіла однієї специфічності (моноклональні). На основі моноклональних антитіл сконструйовано біосенсорні системи, які дають змогу проводити діагностику ревматоїдного артрити, діабету, онкозахворювань, СНІДу, ряду спадкових захворювань. Моноклональні антитіла використовують також для запобігання метастазування пухлин, відторгнення імплантантів, тощо.

При злитті двох різних гібридів можна отримати біспецифічні моноклональні антитіла. Такі гібридні гібридоми мають назву *фузом*. Їх використовують для отримання гомогенних антитіл, специфічних до будь-якого антигену.

Для отримання штучних антитіл ген важкого ланцюга імуноглобуліну, виділеного з гібридами, яка продукувала імуноглобулін, включають до хімічного агенту 4-гідрокси-3-нітрофенілацетила (ГНФ). Варіабельна ділянка цього гену (V), яка володіла антигенними властивостями, залишалася без змін, а в константну ділянку (C) вбудовували ген ферменту ДНКазу, виділеного з *Staphylococcus aureus*. При експресії гену проходив синтез рекомбінантного імуноглобуліну, який включав легкий і важкий ланцюг. Цей ланцюг володів властивістю антитіла по відношенню до ГНФ та ДНК-азною активністю (Рис. 38).

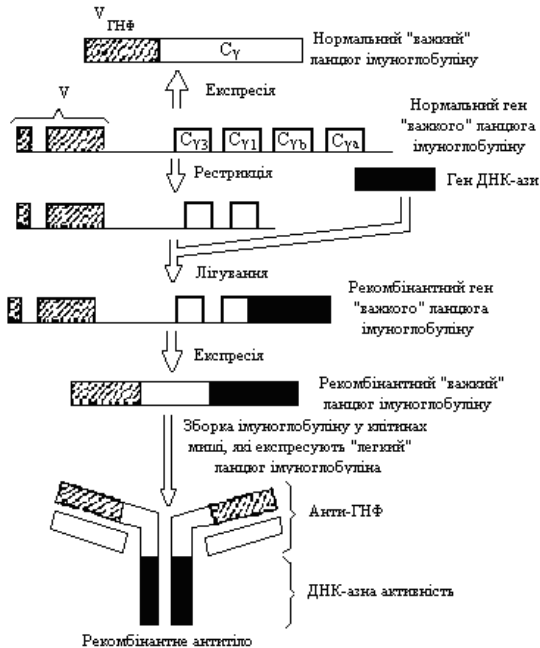


Рис. 38. Конструювання реконбінантних антитіл.

Штучні антитіла широко застосовують у медицині для лікування і діагностики захворювань, зумовлених патогенними мікроорганізмами.

Важливим напрямком генної інженерії є одержання реконбінантних живих вакцин та вакцин антигенів, які отримують клонуванням генів збудників інфекційних захворювань у бактеріальних клітинах, клітинах дріжджів та ссавців. Перевагою цих вакцин є те, що вони високостабільні, не викликають алергійних реакцій організму, хоч одночасно з цим мають низький рівень імуногенності.

Суть методу в тому, що в реконбінантну молекулу ДНК вірусу з геном тимідинкінази (Тк+), вбудовують ген іншого вірусу (гепатиту, везикулярного стоматиту). Вірус вакцини та утворену плазмиду переносять у клітини, які не містять гену тимідинкінази (Тк-). Між вірусною і плазмідною ДНК проходить реконбінація, оскільки для них характерна гомологія (наявність гену тимідинкінази). Клітини, в яких не відбулася реконбінація, внаслідок індукції тимідинкіназного гену вірусу вакцини стають Тк-позитивними, а клітини, що містять

рекомбінантний вірус, стають Тк-негативними, що дає змогу їх розділити (Рис. 39).

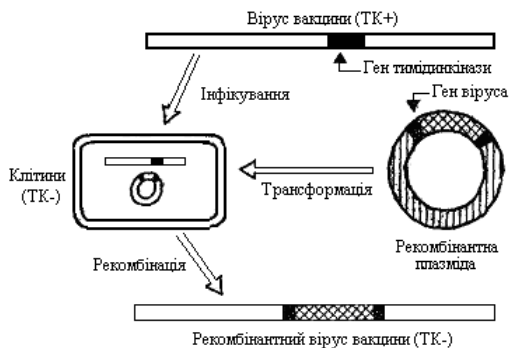


Рис. 39. Отримання живих вакцин методами генної інженерії.

Вакцини, до складу яких включають гени різних вірусів, мають назву *полівалентних*. При проведенні вакцинації такими вакцинами можна стимулювати імунітет до кількох вірусів.

Важливе значення для боротьби з захворюваннями має отримання методами генної інженерії живих, мультівалентних та рекомбінантних вакцин, а також полівакцин. Мультівалентні вакцини включають до їх складу інтегровані гени різних вірусів.

Застосування методів генної інженерії на основі досягнень молекулярної біології і генетики з кожним роком розширюють можливості профілактики та лікування інфекційних захворювань, спадкових генетичних і соматичних розладів. Для отримання вакцин-антигенів, які є високоефективними та позбавленими алергійної дії проводять клонування генів збудників хвороб у клітинах бактерії *E. coli*, дріжджових клітинах чи клітинах комах та ссавців. Недоліком цих вакцин є низька імуногенність.

Для підвищення ефективності вакцини було розроблено генно-інженерні методи отримання синтетичних вакцин внаслідок з'єднання фрагментів антигенних детермінант вірусів з *адювантами* (специфічними молекулами носіями), які посилюють імуногенність антигенів. Приєднанням до адювантів антигенів кількох вірусів отримують полівакцини.

Важливим є внесок генної інженерії в розробку методів лікування і профілактики спадкових захворювань. Це стосується, зокрема, такого напрямку як гена терапія, суть якої в корегуванні метаболічних розладів інтегруванням у соматичні клітини нормально функціонуючих генів. Цей напрямок було започатковано в 80-х роках

XX ст. після розробки методів виділення та синтезу генів, а також створення надійних молекулярних векторів, здатних до експресії у клітинах-реципієнтах. Перші спроби лікування захворювань методами генної терапії було проведено на початку 90-х років минулого століття. Згодом ці методи було вдосконалено, що створило можливість використання генної терапії соматичних розладів *in vitro* та *in vivo*. В першому випадку для перенесення генів використовують вірусні вектори, отримані на основі ретровірусів мишей. З цією метою РНК ретровірусу вбудовують у плазмиду і вилучають більшу частину гена *gag*, гени *pol* та *env* внаслідок ендонуклеазного розщеплення. Після цього між 5'-кінцевою ділянкою гена *gag* і 5'-кінцем 3'-довгого кінцевого повтору (3-LTR) вбудовують нормально функціонуючий ген, транскрипція якого контролюється промоутором 3'-LTR.

Для надійного інтегрування генів клітини, мішені та клітини донори культивують на специфічних культуральних середовищах.

Генна терапія *in vivo* включає такі етапи:

- отримання клітин від хворого;
- виправлення генетичного дефекту внаслідок перенесення корегованого гену в виділені клітини;
- клонування клітин з корегованим розладом;
- трансплантацію клітин з нормально функціонуючими генами.

Найчастіше генну терапію *in vivo* застосовують для лікування спадкових захворювань внаслідок трансплантації клітин кісткового мозку. Це зумовлено наявністю в кістковому мозку тотипотентних ембріональних стовбурових клітин, здатних до проліферації та диференціювання в різні типи клітин (Т- і В-лімфоцити, макрофаги, еритроцити, тромбоцити). Крім модифікації тотипотентних стовбурових клітин з наступною трансплантацією, для генної терапії порушень гемопоєзу застосовують також кордову кров з пуповини, яка містить стовбурові клітини. При генній терапії *in vivo* кореговані гени за допомогою специфічних векторів переносять безпосередньо до клітин-мішеней внаслідок трансфекції. З цією метою застосовують специфічні плазмовірусні системи, які включають гени ретровірусів та гени *env*, *gag*, *pol* плазмід, 5'-LTR-промоутор, а також нормально-функціонуючий ген. Плазмовірус перед введенням у дефектні клітини, модифікують включенням в білкову оболонку іншого вірусу із специфічними антигенними детермінантами, з метою підвищення трансдукуючої активності та пригнічення його самовідтворення. Тобто, проводять фенотипове змішування. Для створення векторів використовують аденовіруси, вірус простого герпесу (HSV), а також системи, що не містять вірусів. За участю цих систем кореговані гени

переносять до клітини у складі рекомбінантних ДНК (ін'єкцією), або за участю ліпосом та ДНК-ліпідних комплексів.

Генну терапію *in vivo* та *in vitro*, в переважній більшості, застосовують для лікування специфічних ферментопатій, зумовлених дефіцитом певних ферментів. У випадку гіперпродукування ферментів розроблено системи з використанням олігонуклеотидів, здатних до гібридизації з певними генами та блокування їх транскрипції, або з продуктами цих генів. У першому випадку олігонуклеотиди мають назву „антигенних”, а у другому – „антизмістових”.

Інколи застосовують модифіковані рибозими – РНК-ферменти, здатні руйнувати іРНК, або штучно синтезовані ДНК, які блокують функцію білків-регуляторів транскрипції. Щоб запобігти руйнуванню олігонуклеотидів у клітинах, їх модифікують введенням до складу фосфодіефірного зв'язку атомів сульфору, внаслідок чого утворюється тіофосфатний зв'язок, який не розпізнають ферменти нуклеази.

Слід підкреслити, що генна терапія це сучасний метод корегування генетичних розладів. У майбутньому він забезпечить надійне лікування чисельних спадкових захворювань, які на сьогодні є фатальними для організму. Незаперечним є те, що досягнення в галузі генної інженерії та сучасних біотехнологій сприяє вирішенню багатьох проблем сьогодення. В першу чергу це стосується забезпечення людства продуктами харчування, отримання повноцінних білкових продуктів, високоврожайних сортів рослин та високопродуктивних порід тварин.

Одночасно з цим, як вказувалося раніше, отримання трансгенних організмів, являє собою складний та неоднозначний процес, оскільки інтеграція чужорідних генів має випадковий характер і при включенні цих генів у геном клітини-реципієнта можуть пошкоджуватися сусідні гени, локалізовані поблизу ділянки вбудовування чужорідної ДНК, та зумовити порушення їх функціонування. Маніпулювання з генами може призвести також до появи організмів з непередбачуваними властивостями, зокрема, високою інфекційністю. При створенні штаму бактерії *E. coli*, який може нести плазмиду, з інтегрованим в неї геном патогенного для людини вірусу, потрапляння її в організм і розмноження в ньому, може призвести до інфікування та розвитку вірусної інфекції. У зв'язку з цим, ще у 70-80-х роках минулого століття було проведено ряд Міжнародних конференцій, з метою пошуків запобіжних заходів для усунення шкідливих наслідків безконтрольного застосування методів генної інженерії.

Учасники цих конференцій вимагали при проведенні генно-інженерних досліджень по отриманню рекомбінантних ДНК

забезпечити біологічні та фізичні бар'єри, які б запобігали поширенню створених трансгенних організмів. Зокрема, було рекомендовано використовувати у вигляді векторів бактерії і плазмиди, не здатні виживати в екстремальних умовах за межами лабораторії та при температурі вищій за + 35°C (в організмі людини). Крім того, в ході експериментів було встановлено, що внаслідок простих маніпуляцій з генами нові патогенні форми організмів отримати практично неможливо.

На сьогодні, маніпулювання з генами набуло великого розмаху, зокрема, в лабораторіях різних країн світу створено велику кількість трансгенних рослинних і тваринних організмів, які дедалі більше поширюються в біосфері.

Досягнуті успіхи генної інженерії дають змогу долати міжвидові бар'єри. Це відкриває можливості до транслокації генів між організмами, які до цього практично ніколи не вступали в генетичний контакт, та отримувати ефекти, що інколи важко передбачити і спрогнозувати їх пролонгований вплив на організм людини. Все це вказує на необхідність, при маніпулюванні з генами, дотримання певних застережень.

Список рекомендованої літератури

Основна

1. Боечко Ф.Ф. Основы молекулярной биологии. / Ф.Ф. Боечко, Л.О. Боечко, И.В. Шмиголь. – Черкаси : Вид. відділ ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2010. – 460 с.
2. Коничев А.С. Молекулярная биология : Учеб. для студ. пед. вузов: 2-е изд., испр. / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М. : Академия, 2005. – 400 с.
3. Мушкамбаров Н.Н. Молекулярная биология : Учебное пособие для студентов мед. вузов. / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 536 с.

Додаткова

1. Альбертс Б. и др. Молекулярная биология клетки. / Б.Альбертс, Д.Брей, Дж. Льюис, К.Робертс, Дж. Уотсон. – М. : Мир, 1994.
2. Ашмарин И.П. Молекулярная биология. / И.П. Ашмарин. – Л. : Изд-во ЛГУ, 1975. – 368 с.
3. Боечко Ф.Ф. Біологічна хімія. / Ф.Ф. Боечко. – К. : Вища школа, 1995. – 536 с.
4. Боечко Ф. Ф., Боечко Л. О., Чепчуренко Н. В. Біологічна хімія, частина І. / Ф. Ф. Боечко, Л. О. Боечко, Н. В. Чепчуренко – Черкаси: Вид. від ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2011. – 252 с.
5. Бурьянов В.С. Обзор успехов и перспектив генно-инженерной биотехнологии растений. / В.С. Бурьянов. // Физиология растений. – 1999. – Т.46. – Вып.6. – С.930-944.
6. Гвоздев В.А. Механизмы регуляции активности генов в процессе транскрипции. / В.А. Гвоздев. // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – №1. – С.23-31.
7. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак. [Под ред. Н.К. Янковского]. – М. : Мир, 2002. – 585 с.
8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. / В. Зенгер. – М. : Мир, 1987. – 584 с.
9. Киселев Л.Л. Геном человека и биология XXI века / Л.Л. Киселев. // Вестник РАН 2000. – Т. 70. – Вып.5. – С.412-424.
10. Коротяев А.И. Молекулярная биология и медицина. / А.И. Коротяев, Н.Н. Лищенко. – М. : Медицина, 1987. – 288 с.
11. Ланцов В.А. Репарация ДНК и канцерогенез: универсальные механизмы репарации у про- и эукариот и последствия их

- повреждения у человека / В.А. Ланцов. // Молекулярная биология. – 1998. – Т.32. – Вып. 5. – С. 757-772.
12. Мартин Й. Фолдинг белка, протекающий с участием шаперониновой системы GroEl/GroEs. / Й. Мартин. // Биохимия. – 1998. – Т.63. – Вып.4. – С. 444-452.
 13. Ніколайчук В.І. Генетична інженерія : Підручник для студентів біол. спеціальностей вищих закладів освіти. / В.І. Ніколайчук, І.Ю. Горбатенко. – Ужгород, 1999. – 188 с.
 14. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. / Л.И. Патрушев. – М. : Наука, 2000. – 830 с.
 15. Рис Э. Введение в молекулярную биологию : От клеток к атомам. [Пер. с англ.] / Э. Рис, М. Стернберг. – М. : Мир, 2002. – 142 с.
 16. Самуилов В.Д. Программируемая клеточная смерть. / В.Д. Самуилов, А.В. Олескин, Е.М. Лагунова. // Биохимия. – 2000. – Т.65. – Вып. 8. – С.1029-1046.
 17. Сингер М. Гены и геномы : в 2-х томах. / М. Сингер, П. Берг. – М. : Мир, 1998. – Т.1. – 377 с.; Т.2. – 394 с.
 18. Спирин А.С. Молекулярная биология : Структура рибосомы и биосинтез белка. / А.С. Спирин. – М. : Высшая школа, 1986. – 303 с.
 19. Спирин А.С. Молекулярная биология : Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. / В.И. Агол, А.А. Богданов, В.А. Гвоздев и др.; [Под ред. А.С. Спирина.] – М. : Вышш. шк., 1990. – 352 с.
 20. Спирин А.С. Регуляция трансляции мРНК-связывающими факторами у высших эукариот / А.С. Спирин. // Успехи биологической химии. – 1996. – Т.36. – С.3-48.
 21. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков. / В.М. Степанов. – М. : Изд-во МГУ, Наука, 2005. – 336 с.
 22. Тоцький В.М. Генетика. 2-е вид., виправл. та доп. / В.М. Тоцький. – Одеса : Астропринт, 2002. – 710 с.
 23. Чемерис А.В. Секвенирование ДНК : монография / А.В. Чемерис, Э.Д. Ахунов, В.А. Вахитов; Отдел биохимии и цитохимии Уфимского научного центра РАН. – Научное издание. – М. : Наука, 1999. – 429 с.
 24. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия : Учеб.-справ. пособие. – 2-е изд., испр. и доп. / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.
 25. Биохимия и молекулярная биология / В.Эллиот, Д. Эллиот. Пер. с англ. О.В. Добрыниной, И.С. Севериной, Е.Д. Скоцеляс и др. – М. : МАИК «Наука/Интерпериодика», 2002. – 446 с.

Навчально-методичне видання

Федір Федорович Боєчко
Любов Олександрівна Боєчко
Ірина Василівна Шмиголь

Основи молекулярної біології
(курс лекцій)

Навчально-методичний посібник
для студентів університетів

Комп'ютерна верстка Н. О. Кузова

Редагування Л.О. Боєчко

Підписано до друку Формат 60x84/16. Гарнітура Таймс
Папір офсет. Ум. друк. арк. Тираж пр. Зам. №

Виготовлено й віддруковано у видавничому відділі
Черкаського національного університету імені Богдана Хмельницького
Свідоцтво про внесення до державного реєстру
суб'єктів видавничої справи ДК № 294 від 22.12.2000 р.

Адреса: 18000, м. Черкаси, бул. Шевченка, 81, кімн. 117,
Тел. (0472) 37-13-16, факс (0472) 37-22-33,

e-mail: vydav@cdu.edu.ua, <http://www.cdu.edu.ua>