

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Навчально-науковий центр «Інститут біології»
Кафедра біохімії

Л.І.Остапченко, Д.М. Гребіник

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

БІОХІМІЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Затверджено на засіданні кафедри біохімії,
протокол № 2 від 16 вересня 2013 року
Зав. кафедри, проф. Л.І. Остапченко

Затверджено на засіданні Вченої Ради
ННЦ «Інститут біології»,
протокол № 2 від 17 вересня 2013 року
Голова Вченої Ради, проф. Л.І. Остапченко

Рецензенти: кандидат біологічних наук, доцент Бабенюк Юрій Дем'янович
доктор біологічних наук, доцент Савчук Олексій Миколайович

Київ-2013

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. Первинна структура нуклеїнових кислот	10
<i>1.1 Історія вивчення природи генетичного матеріалу</i>	<i>10</i>
<i>1.2. Будова нуклеозидів та нуклеотидів</i>	<i>14</i>
<i>1.3. Властивості азотистих основ</i>	<i>22</i>
<i>1.4. Модифікації азотистих основ та нуклеозидів</i>	<i>23</i>
<i>1.5. Конформаційні особливості площини пентофураноз</i>	<i>28</i>
<i>1.6. Варіанти конформацій глікозидного зв'язку</i>	<i>31</i>
<i>1.7. Первинна структура ДНК та РНК та її конформація</i>	<i>32</i>
РОЗДІЛ 2. Особливості вторинної структури ДНК	36
<i>2.1. Історія відкриття вторинної структури ДНК</i>	<i>36</i>
<i>2.2. Особливості організації пар основ</i>	<i>41</i>
<i>2.3. Параметри парування азотистих основ</i>	<i>43</i>
<i>2.4. Основні параметри хеліксу ДНК</i>	<i>44</i>
<i>2.5. Класичні та неканонічні форми вторинної структури ДНК</i>	<i>45</i>
<i>2.6. Формування зігнутоостей хеліксу ДНК</i>	<i>48</i>
РОЗДІЛ 3. Фізико-хімічні властивості ДНК	51
<i>3.1. Варіабельність нуклеотидного складу</i>	<i>51</i>
<i>3.2. Денатурація та оптичне поглинання ДНК</i>	<i>52</i>
<i>3.3. Явище ренатурації ДНК та його особливості</i>	<i>55</i>

РОЗДІЛ 4. Форми конденсації ДНК in vitro та конденсація генного матеріалу бактеріофагів та бактерій	60
<i>4.1. Поняття конденсації ДНК in vitro</i>	<i>60</i>
<i>4.2. Конденсуючі агенти</i>	<i>60</i>
<i>4.3. Види конденсованих структур ДНК, отримані in vitro</i>	<i>62</i>
<i>4.4. Сили та чинники конденсації ДНК</i>	<i>63</i>
<i>4.5. Особливості конденсації геному ДНК-вмісних бактеріофагів</i>	<i>64</i>
<i>4.6. Конденсація геному бактерій</i>	<i>66</i>
РОЗДІЛ 5. Особливості будови та функцій РНК	68
<i>5.1. Загальна характеристика рибонуклеїнових кислот</i>	<i>68</i>
<i>5.2. Методи отримання та вивчення структури РНК</i>	<i>70</i>
<i>5.3. Структура та конформації дуплексних ділянок РНК</i>	<i>70</i>
<i>5.4. Унікальні екстрахеліксні структури РНК</i>	<i>74</i>
<i>5.5. Структура мРНК</i>	<i>82</i>
<i>5.6. Особливості структури тРНК</i>	<i>85</i>
<i>5.7. Рибосомальні РНК та структура рибосом</i>	<i>90</i>
<i>5.8. Складові субодиниці 30S</i>	<i>93</i>
<i>5.9. Субодиниця 50S</i>	<i>97</i>
<i>5.10. Визначення структури цілих рибосом</i>	<i>99</i>
<i>5.11. Рибозими та особливості їх структури</i>	<i>100</i>
<i>5.12. Рибосвітчі</i>	<i>107</i>

РОЗДІЛ 6. Взаємодія нуклеїнових кислот з білками	113
<i>6.1. Функціональна класифікація білків, що приєднуються до ДНК</i>	<i>113</i>
<i>6.2. «Зчитування» ДНК білками</i>	<i>114</i>
<i>6.3. Особливості прямих контактів ДНК з білками</i>	<i>116</i>
<i>6.4. Білкові сайти розпізнавання ДНК</i>	<i>120</i>
<i>6.5. Домен НТН</i>	<i>120</i>
<i>6.6. Домени «цинкових пальців»</i>	<i>122</i>
<i>6.7. Лейциновий «зіппер» та інші розпізнавальні ділянки</i>	<i>127</i>

РОЗДІЛ 7. Конденсація ДНК еукаріотичних організмів та особливості структури хроматину	131
<i>7.1. Загальна характеристика рівнів структури хроматину</i>	<i>131</i>
<i>7.2. Загальна будова нуклеосом</i>	<i>133</i>
<i>7.3. Особливості структури компонентів нуклеосомного кору</i>	<i>134</i>
<i>7.4. Будова хроматосоми та лінкерних гістонів</i>	<i>137</i>
<i>7.5. Нуклеосомний та хроматинний філаменти</i>	<i>139</i>
<i>7.6. Петельні домени та вищі форми конденсації хроматину</i>	<i>141</i>
<i>7.7. Позичіонування нуклеосом</i>	<i>143</i>
<i>7.8. Нуклеосоми і транскрипційна активність хроматину</i>	<i>144</i>

РОЗДІЛ 8. Механізми репарації пошкоджень ДНК	148
<i>8.1. Види пошкоджень ДНК та пошкоджуючі фактори</i>	<i>148</i>
<i>8.2. Система ексцизійної репарації</i>	<i>151</i>
<i>8.3. Система ексцизійної репарації основ</i>	<i>155</i>
<i>8.4. Система ексцизійної репарації нуклеотидів</i>	<i>157</i>
<i>8.5. Ексцизійна репарація внутрішньоланцюгових (повздожжніх) та міжланцюгових (поперечних або перехресних) ковалентних «зшивок» ДНК</i>	<i>162</i>
<i>8.6. Патології, пов'язані з мутаціями генів факторів ESRH</i>	<i>169</i>
<i>8.7. Репарація одниткових та двониткових розривів ланцюгів ДНК</i>	<i>170</i>
<i>8.8. Патології, пов'язані з мутаціями генів факторів CRR</i>	<i>178</i>
РОЗДІЛ 9. Обмін нуклеотидів	179
<i>9.1. Синтез інозинмонофосфату de novo</i>	<i>179</i>
<i>9.2. Перетворення ІМФ на інші пуринові нуклеотиди</i>	<i>187</i>
<i>9.3. Біосинтез уридинмонофосфату</i>	<i>190</i>
<i>9.4. Регуляція синтезу УМФ</i>	<i>194</i>
<i>9.5. Формування цитидинтрифосфату</i>	<i>196</i>
<i>9.6. Відновлення рибонуклеотидів</i>	<i>198</i>
<i>9.7. Утворення дТМФ з дУМФ</i>	<i>200</i>
<i>9.8. Реутилізація пуринів та піримідинів</i>	<i>202</i>
<i>9.9. Катаболізм пуринів</i>	<i>206</i>
<i>9.10. Особливості розщеплення піримідинів</i>	<i>209</i>
<i>9.11. Патології, пов'язані з порушенням обміну нуклеотидів</i>	<i>211</i>

РОЗДІЛ 10. Реплікація ДНК	213
<i>10.1. Загальні відомості про реплікацію та її особливості</i>	213
<i>10.2. ДНК-полімерази прокаріот</i>	215
<i>10. 3. Еукаріотичні ДНК-полімерази</i>	217
<i>10. 4. Відмінності між ДНК- та РНК-полімеразами</i>	218
<i>10. 5. Допоміжні фактори реплісоми прокаріот</i>	219
<i>10.6. Структура голоферменту ДНК-полімерази III прокаріот</i>	221
<i>10.7. Механізм реплікації прокаріотичної ДНК</i>	222
<i>10.8. Особливості реплікації ДНК еукаріот</i>	224
<i>10.9. Ініціація та проходження реплікації у еукаріот</i>	225
РОЗДІЛ 11. Механізми транскрипції	227
<i>11.1. Основні особливості транскрипції</i>	227
<i>11.2. Будова РНК-полімерази прокаріот</i>	228
<i>11.3. Робочий цикл РНК-полімерази</i>	229
<i>11.4. Еукаріотичні РНК-полімерази</i>	230
<i>11.5. Еукаріотична РНК-полімераза II</i>	232
<i>11.6. Промотори РНК-полімераз</i>	233
<i>11.7. Базальні фактори транскрипції</i>	236
<i>11.8. Механізм ініціації транскрипції ДНК прокаріот</i>	238
<i>11.9. Ініціація транскрипції РНК-полімеразами еукаріот</i>	241
<i>11.10. Механізм елонгації під час транскрипції ДНК на прикладі прокаріот</i>	243
<i>11.11. Термінація транскрипції</i>	245

РОЗДІЛ 12. «Дозрівання» матричної та інших видів РНК	248
<i>12.1. Загальна характеристика процесингу мРНК</i>	<i>248</i>
<i>12.2. Кепування мРНК</i>	<i>249</i>
<i>12.3. Реакції сплайсингу мРНК</i>	<i>252</i>
<i>12.4. Сплайсосома та молекулярний механізм сплайсингу</i>	<i>254</i>
<i>12.5. Поліаденілювання мРНК і термінація транскрипції</i>	<i>258</i>
<i>12.6. Альтернативний сплайсинг та транс-сплайсинг</i>	<i>259</i>
<i>12.7. Редагування мРНК</i>	<i>262</i>
<i>12.8. Процесинг тРНК</i>	<i>265</i>
<i>12.9. Механізми «дозрівання» рРНК</i>	<i>268</i>
РОЗДІЛ 13. Деградація нуклеїнових кислот	270
<i>13.1. Загальна характеристика нуклеаз</i>	<i>270</i>
<i>13.2. Лужний гідроліз РНК</i>	<i>274</i>
<i>13.3. Гідроліз РНК рибонуклеазою А</i>	<i>276</i>
<i>13.4. Ендонуклеази рестрикції</i>	<i>278</i>
<i>13.5. Особливості з'вязування ендонуклеаз рестрикції з ДНК</i>	<i>282</i>
<i>13.6. Використання рестриктаз</i>	<i>283</i>
КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ	289
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	290

ВСТУП

Нуклеїнові кислоти – унікальний клас органічних сполук, основна функція представників якого полягає у забезпеченні зберігання, регуляції, реалізації генетичної інформації, а також її передачі між клітинними поколіннями. Таким чином, нуклеїнові кислоти, являючи собою матеріальну основу спадковості, виконують важливі інформаційні функції, які визначають фенотип організму і його функціонування. Хімічно нуклеїнові кислоти представляють собою складні багатомолекулярні полімери, що формуються з **нуклеозидів** (азотиста основа і вуглевод), поєднаних між собою фосфодиефірними зв'язками. За структурою ці молекули можна поділити на два великих класи – **дезоксирибонуклеїнові (ДНК)** та **рибонуклеїнові кислоти (РНК)**. Вони відрізняються між собою природою вуглеводу у складі нуклеозиду (дезоксирибоза у складі ДНК або рибоза в РНК), а також набором азотистих основ - аденін, гуанін та цитозин є спільними для обох форм нуклеїнових кислот, в той час як тимін та урацил характерні для ДНК та РНК відповідно. Передача інформації у живих клітинах йде згідно основній догмі молекулярної біології: ДНК є матрицею для синтезу таких же молекул ДНК (**самоподвоєння чи реплікація**), або слугує джерелом синтезу РНК (**транскрипція**). РНК, у свою чергу, є матрицею для синтезу білку (**трансляція**). Можливим є також синтез ДНК на матриці РНК (зворотня транскрипція).

Завдяки інформаційній функції нуклеїнових кислот, даний клас органічних сполук має певні унікальні особливості, не властиві іншим класам макромолекулярних полімерів:

- 1) Являють собою єдині полімери у клітині, що формуються зі складних (двохкомпонентних) мономерів – нуклеозидів, які містять азотисту основу та фосфорильований вуглевод. На відміну від нуклеїнових кислот, всі інші полімери мають прості однокомпонентні момери – наприклад, амінокислоти в білках або моноцукри в полісахаридах.
- 2) Якщо приймати до уваги ДНК – мають надзвичайно великий розмір та масу молекул та надмолекулярних комплексів. Маса однієї неперервної молекули ДНК, що лежить в основі хромосоми середньої довжини (~100 млн. п.о.) у ссавців складає біля 1000 МДа, а у поєднанні з білками у складі хроматину зростає більше, ніж утричі.
- 3) ДНК та РНК – єдині молекули живого організму, які слугують у якості матриці для синтезу. ДНК дає початок таким же молекулам ДНК та різним формам РНК, одна з останніх (мРНК) є матрицею для трансляції, тобто, синтезу білку.
- 4) ДНК – єдина молекула клітини, яка здатна до репарації (виправлення пошкоджень), за що відповідає ціла низка факторів та надмолекулярних

комплексів, об'єднаних у спеціалізовані системи репарації, які будуть розглянуті тут дещо пізніше.

В цілому, нуклеїнові кислоти є надзвичайно цікавим класом органічних сполук, розуміння структури та функціонування якого є визначальним для основ класичних предметів біоорганічної хімії та біохімії живих організмів, а також лежить у основі молекулярної біології та біотехнології. Даний посібник є спробою огляду та систематизації сучасних уявлень щодо основ структури, регуляції активності та функцій нуклеїнових кислот, як біохімічних факторів спадковості на клітинному рівні. Зокрема, розглядаються:

- 1) Загальні поняття про структурні компоненти ДНК та РНК,
- 2) Види та форми цих молекул, рівні їх структурної організації,
- 3) Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот та взаємодія їх з білками та іншими макромолекулами,
- 4) Сучасні уявлення про організацію будови та функціонування хроматину,
- 5) Види репараційних систем клітини та особливості регуляції їх функцій,
- 6) Механізми обміну нуклеїнових кислот – синтез цих молекул шляхами реплікації та транскрипції, шляхи їх модифікації та дозрівання, а також особливості їх деградації у живих клітинах.

РОЗДІЛ 1. Первинна структура нуклеїнових кислот

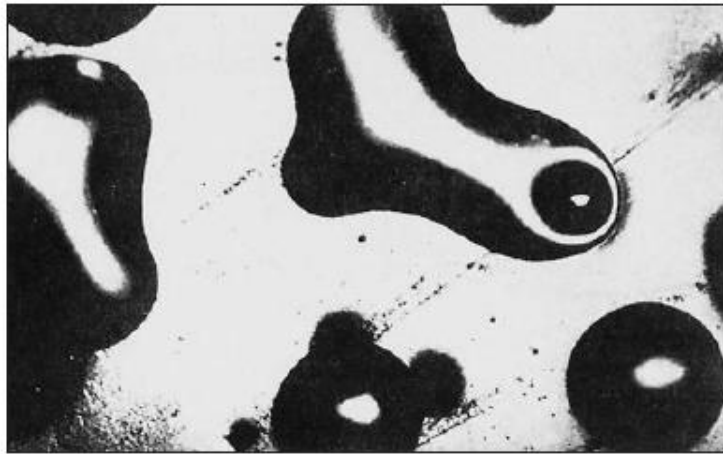
У цьому розділі розглядаються коротка історія досліджень з вивчення хімічної структури та функцій генетичного матеріалу, а також питання, які стосуються організації первинної структури нуклеїнових кислот та окремих її компонентів – нуклеотидів, нуклеозидів, тощо.

1.1 Історія вивчення природи генетичного матеріалу

Вперше дослідження хімічної природи генів почалися ще в 1869 році з дослідів Фрідріха Мейшера в місті Тюбінген, Германія. Він ізолював ядра з клітин гнійних відкладень (білих кров'яних тілець) на використаних перев'язочних матеріалах. Мейшер виявив, що ядра містили певну фосфор-вмісну речовину, яку він назвав **нуклеїном**. Нуклеїн складався в основному з хроматину, який являв собою комплекс ДНК з хромосомними білками. Саме з терміну **«нуклеїн»** і походить пізніше встановлена назва **«нуклеїнові кислоти»**. Починаючи з кінця 19 століття обидва види нуклеїнових кислот були виділені і очищені від хромосомних білків. На початку 30-их рр. 20 ст. Левін та Якобс продемонстрували, що РНК складається з цукру (рибози) та чотирьох азотовмісних основ, а ДНК має той же план будови, але вуглеводом виступає дезоксирибоза. Також було виявлено, що кожна основа поєднана з фосфорильованим цукром у складі нуклеотиду.

Доказом того, що саме ДНК є основою генетичного матеріалу, стали дослідження Фредеріка Гріффіна у 1928 році. Експерименти полягали у трансформації пневмококів. Дикий тип цих бактерій являє собою сферичну клітину, оточену мукозною капсулою, такі клітини формують великі блискучі колонії, що називаються **«гладенькими»** або **S-колоніями**. Ці клітини є вірулентними, оскільки викликають летальну форму інфекції у мишей. Інший мутантний тип штаму цієї ж бактерії втратив можливість формувати капсули, через що такі клітини швидко знищуються лімфоцитами мишей. Тому вони є авірулентними і ростуть у вигляді малих **«шорстких» R-колоній (рис. 1)**.

Основним відкриттям Гріффіна був той факт, що інактивовані нагріванням вірулентні S-колонії пневмококів мали здатність трансформувати авірулентні R-колонії на вірулентні, що мали капсулу. Разом обидві інактивовані вірулентні та активні невірулентні форми індукували патогенний процес, хоча поодиноці жодна з форм не діяла. Отже, якимось невідомим чином невірулентні форми отримували вірулентність від інактивованих S-колоній **(рис. 2)**. Причому така здатність зберігалась у подальших поколіннях бактерій.



А



Б

Рис. 1. Мікрофотографії «гладеньких» S-колоній (**А**) та «шорстких» R-колоній (**Б**).

Таким чином, було виявлено існування **спадкового фактора вірулентності**, еквівалентом якого був саме **ген вірулентності**. Але про структуру даного фактору на той час було мало що відомо. В 1944 році Освальд Ейвері, Колін МакЛеод та Меклін МакКарті розібралися з природою невідомого фактора спадковості. Вони повторили трансформаційний експеримент, однак зосередилися на з'ясуванні структури даного фактора, виділеного з вірулентних форм бактерій. Спочатку вони позбавилися білку в екстракті за допомогою органічних розчинників, і виявили, що екстракт не втратив трансформаційної здатності. Потім було проведене розщеплення екстракту різними формами ферментів, причому виявилось, що трипсин та хімотрипсин не мають ефекту на трансформаційну здатність, так само, як і рибонуклеаза. Однак ДНК-аза виявилася здатною інактивувати трансформаційну активність екстракту з пневмококів. Таким чином, **ДНК** виявилась єдиним кандидатом на **роль фактора трансформації**.

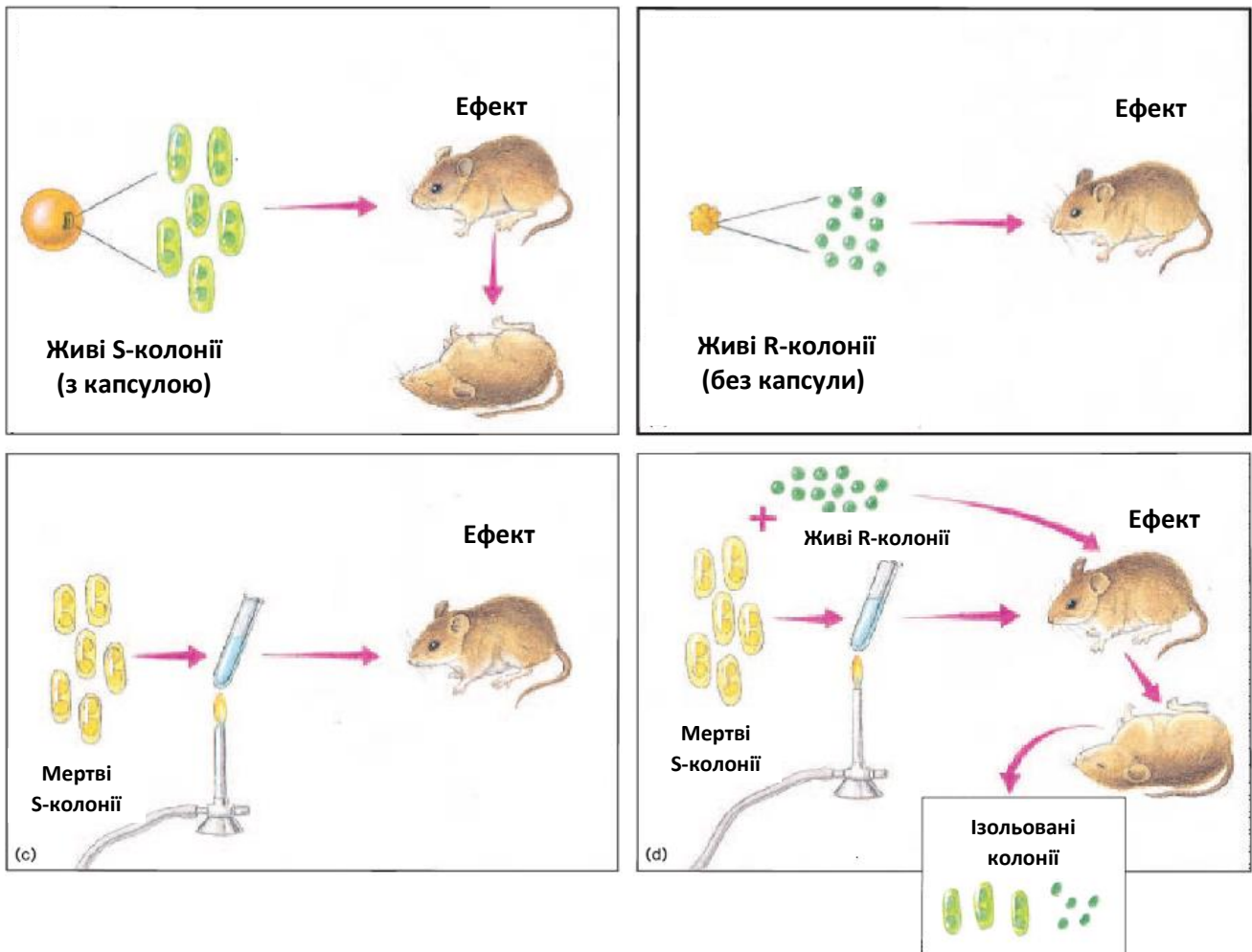


Рис. 2. Ефекти різних штамів пневмококів у експериментах Гріффіна.

У 1953 році Уотсон та Крик постулювали **модель подвійного хеліксу** у якості структури ДНК, що елімінувало останні сумніви у тому, що саме ДНК є основою генного матеріалу. Перед цим, у 1950 році, Ервін Чаргафф розробив відомі **правила комбінації пар основ** в молекулі ДНК і виявив, що основи зустрічаються не у рівних пропорціях у складі ДНК і що співвідношення якісного складу основ відрізняється у різних видів організмів. Нарешті, у 1952 році Херслі та Чейз на експериментах з використанням бактеріофагів T2 та E. coli показали, що гени фагу здатні проникати всередину бактерії і індукувати синтез нових вірусних часточок. Як було встановлено у ході цих експериментів шляхом застосування мічених елементів - ^{32}P для ДНК та ^{35}S для білку - в бактерію проникає лише ДНК, а більша частина білку залишається назовні (рис. 3).

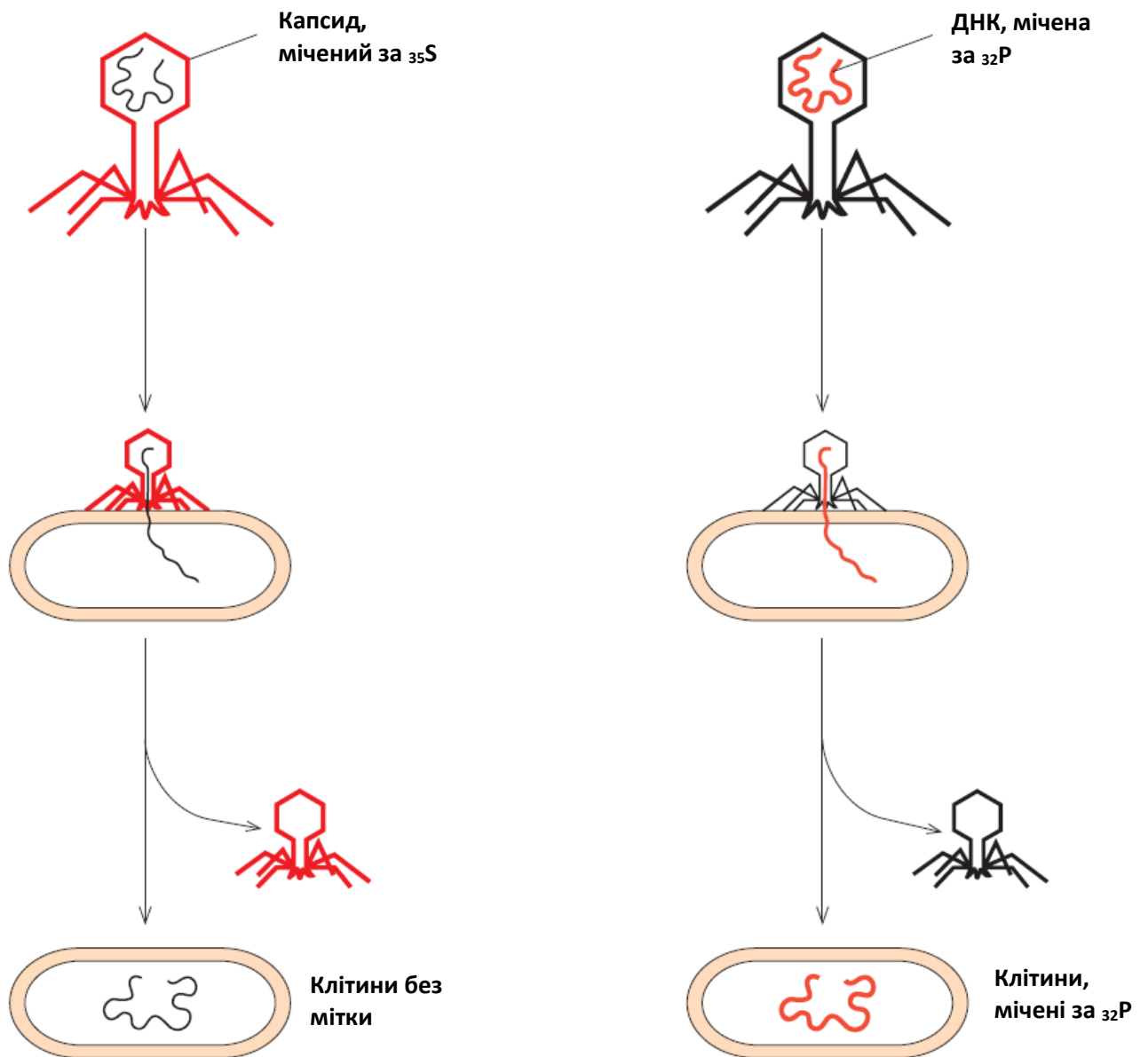


Рис. 3. Схема експерименту Херслі та Чейза.

Отже, серіями вищенаведених експериментів і даних було остаточно підтверджено, що **саме ДНК**, а не білок, є **матеріальною основою генетичного апарату**, що відповідає за збереження інформації та спадковість.

1.2. Будова нуклеозидів та нуклеотидів

Структура нуклеотидів була з'ясована ще в середині 40-их рр. минулого сторіччя. Було виявлено, що в нуклеїнових кислотах присутні два їх види, в залежності від цукрового компоненту – **рибо- або дезоксирибонуклеотиди**. Нуклеотиди є трьохкомпонентними сполуками, тобто, складаються з:

- 1) Азотистої основи,
- 2) Вуглеводу (пентози) - рибози або дезоксирибози,
- 3) Ортофосфорної кислоти.

Встановлено, що у складі ДНК міститься чотири основи, дві з яких є похідними двохкільцевого **пурина** - **аденін (А)** та **гуанін (G)**, ще дві походять від моно-кільця **піримідину** - **тимін (Т)** та **цитозин (С)**. У складі РНК похідні пуринів є ідентичними, а от в наборі піримідинових основ замість тиміну знаходиться **урацил (U)** зі збереженням цитозину (рис. 5).

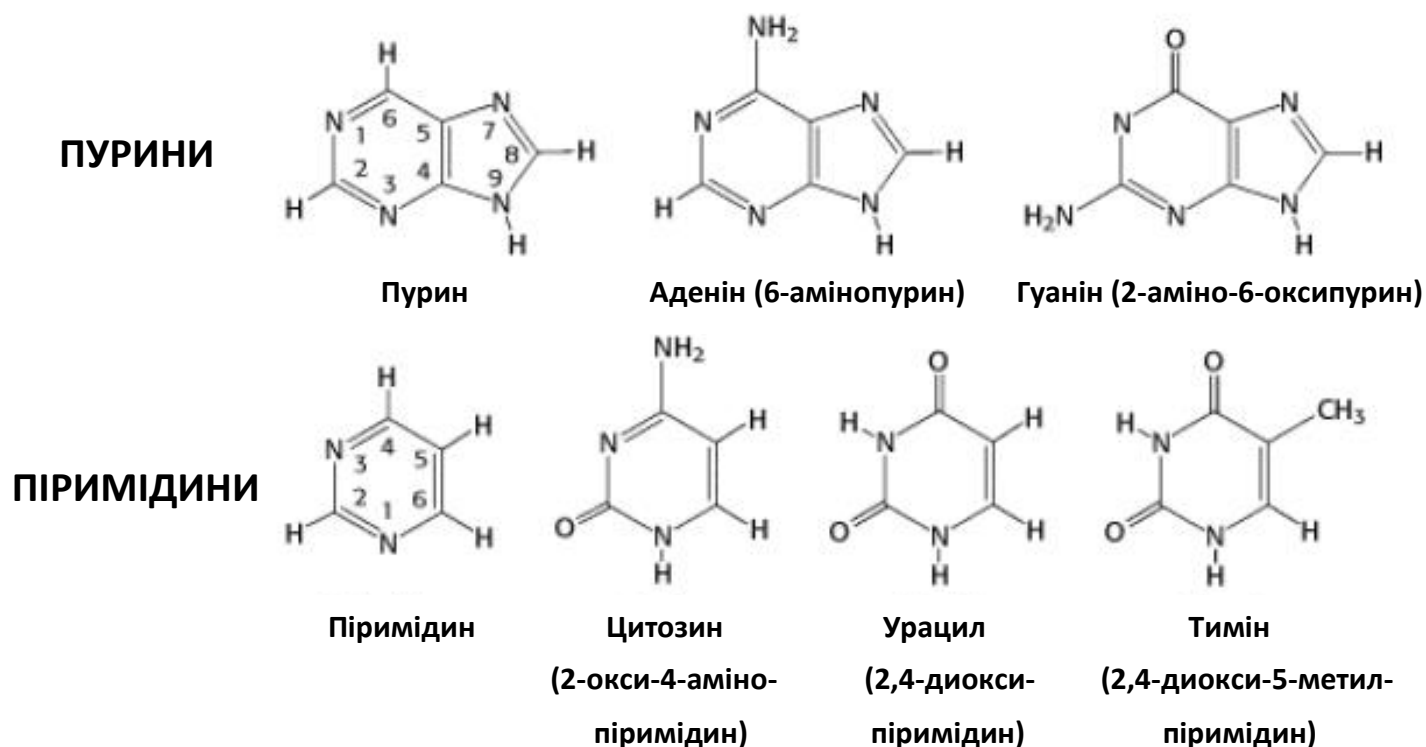


Рис. 4. Структурні формули азотистих основ у складі нуклеотидів.

Цукровий компонент нуклеотидів, як уже було сказано, представлений **альдопентозами - D-рибозою або D-дезоксирибозою**, які у складі нуклеїнових кислот існують виключно у кільцевій фуранозній формі. Після циклізації аномерний атом вуглецю приймає **β -конформацію**. Дезоксирибоза відрізняється від рибози

відсутністю кисню у другому положенні цукру, тобто, по суті, є відновленою формою рибози (**рис. 5**).

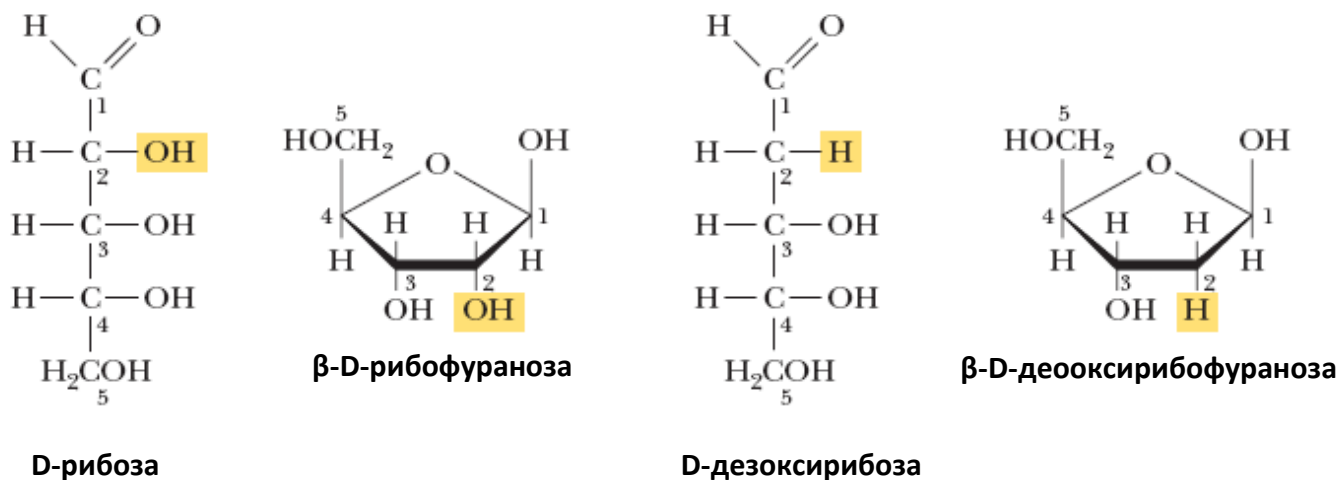


Рис. 5. Структурні формули вуглеводів у складі нуклеотидів.

Азотиста основа та пентоза поєднуються за допомогою **N-β-глікозидного зв'язку** між першим атомом вуглецю цукру та першим атомом азоту у піримідиновій або дев'ятим – у пуриновій основі. Така сполука називається **нуклеозидом** – мономером первинної структури нуклеїнових кислот. Відповідно, існують рибо- (**рис. 6**) та дезоксирибонуклеозиди. Назви нуклеозидів походять від відповідних основ :

- Аденин – аденозин/дезоксаденозин,
- Гуанін – гуанозин/дезоксигуанозин,
- Цитозин – цитидин/дезоксцитидин,
- Тимін – тимідин/дезокситимідин,
- Урацил – уридин/дезоксиуридин.

Оскільки тимін практично не зустрічається у складі РНК, назва дезокситимідин майже не використовується, і заміщується тимідином. Детальна номенклатура нуклеозидів представлена у **табл. 1**.

Важливим є також спосіб **нумерації атомів** в молекулі нуклеозиду. Атоми в складі основ позначаються просто арабськими цифрами, в той час як атоми цукру – цифрами з штрихом (1', 3', 5' тощо).

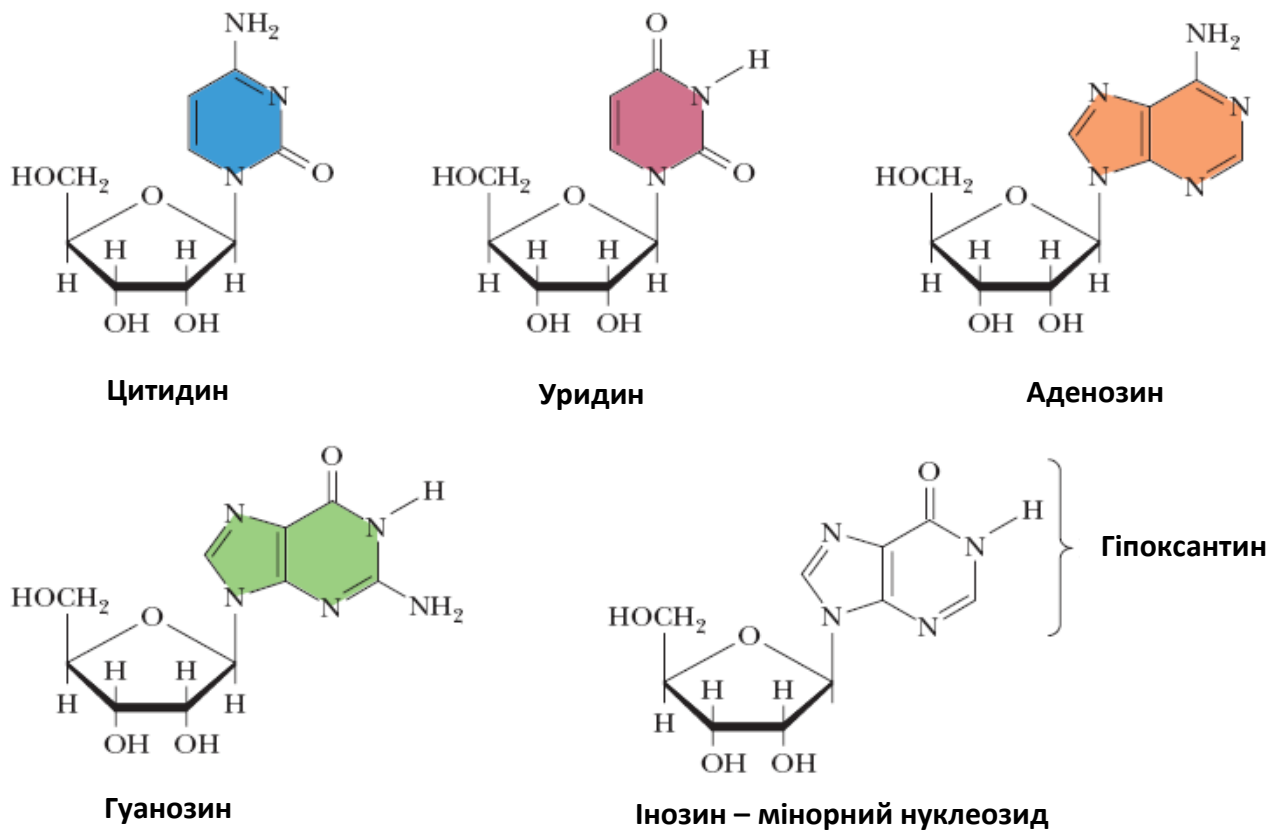


Рис. 6. Структурні формули рибонуклеозидів.

Зв'язок між основою та цукром у нуклеозиді, як уже було відмічено, носить назву **глікозидного**, тобто зв'язку цукру з нецукровим компонентом через напівацетальний гідроксил, що розташований у β -положенні.

У природніх НК глікозидний зв'язок знаходиться завжди у **β -конфігурації**, тобто основа розміщена над площиною цукру, і займає той же бік, що й замісник біля C5'-положення у нуклеозиді. Інші положення цукру, якщо дивитися на площину цукру з киснем в положенні C4' позаду, розміщуються так, що гідроксильна група у положенні C3' знаходиться знизу площини пентози а гідроксиметил у положенні C4' знаходиться зверху площини кільця (**рис. 7, А**). В принципі, можливим є хімічне конструювання нуклеозидів та олігонуклеозидів, в яких основа буде знизу площини кільця (**рис. 7, Б**). Вони виявляються набагато більш резистентними до дії нуклеаз і, таким чином, використовуються у якості антисенсних олігомерів у складі мРНК.

Таблиця 1. Номенклатура типових компонентів нуклеїнових кислот.

Основа	Нуклеозид	Нуклеотид	Нуклеїнова кислота
Пурини			
Аденін	Аденозин	Аденілат	РНК
	Дезоксиаденозин	Дезоксиаденілат	ДНК
Гуанін	Гуанозин	Гуанілат	РНК
	Дезоксигуанозин	Дезоксигуанілат	ДНК
Піримідини			
Цитозин	Цитидин	Цитидилат	РНК
	Дезоксицитидин	Дезоксицитидилат	ДНК
Тимін	Тимідин або дезокситимідин	Тимідилат або дезокситимідилат	ДНК
Урацил	Уридин	Уридилат	РНК

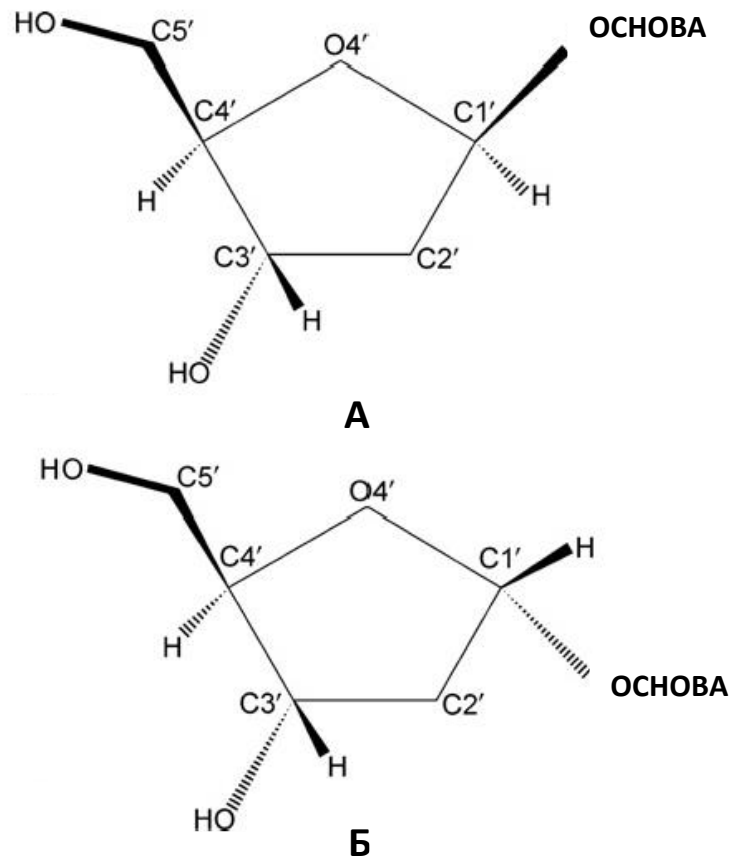


Рис. 7. Варіанти конформації пентофураноз (пояснення у тексті).

Нуклеотиди – це фосфорильовані похідні нуклеозидів, через кислу природу їх часто називають нуклеотидними кислотами - у такому разі до назви додається суфікс –ат: аденілат, дезоксицитидилат, тощо (**табл. 1**). Фосфорна кислота приєднується до цукру складноефірним зв'язком (кислота - спирт), а у випадку декількох фосфорних залишків на одному положенні зв'язки між фосфатами є високоенергетичними фосфоангідридними (кислота - кислота). Причому фосфорні залишки можуть бути у п'ятому, третьому (первинна структура НК) та другому (у випадку лише РНК) положенні (**рис. 8**).

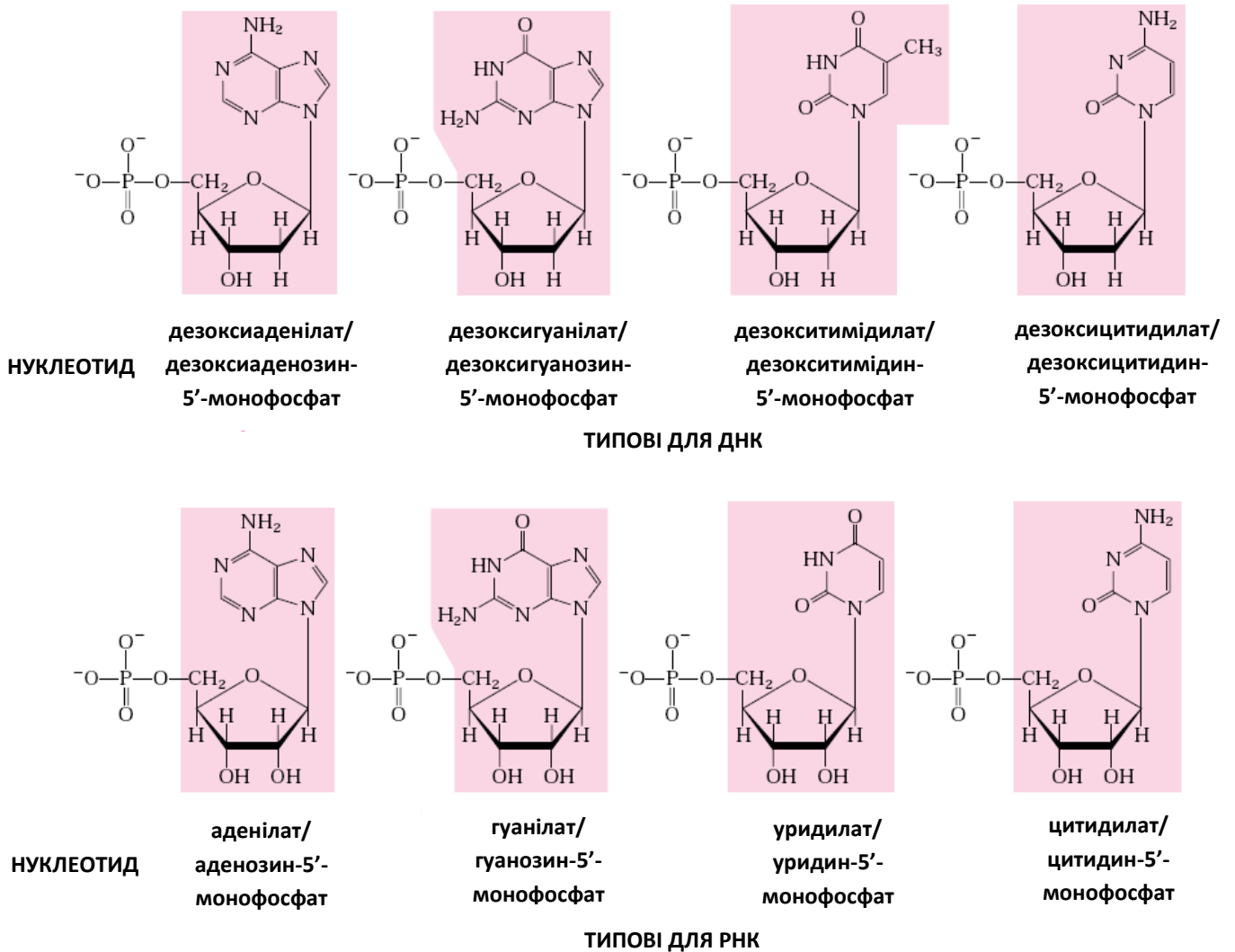


Рис. 8. Структурні формули нуклеотидів.

Кількість фосфатних груп у п'ятому положенні цукру може бути до трьох на одному з вищенаведених положень, які додаються послідовним фосфорилуванням за допомогою відповідних кіназ з вилученням молекули води (**рис. 9**). У даному випадку пов'язаний з пентозою складнофірним зв'язком **атом фосфору** позначається як **α**, а другий та третій атоми, що розміщуються одне за одним завдяки фосфоангідридним зв'язкам – як **β** та **γ** відповідно. Таким чином, існують моно-, ди- та трифосфати всіх нуклеозидів, що позначаються як НМФ, НДФ або НТФ (Н – назва будь-якого нуклеозиду). До речі, саме трифосфати є попередниками синтезу ДНК та РНК у процесах реплікації та транскрипції відповідно. У ході даної реакції β- та γ-фосфати вилучаються у вигляді пірофосфату, який згодом розщеплюється пірофосфатазою, забезпечуючи енергію та незворотність процесу, а α-фосфат формує фосфодієфірний зв'язок у новоствореному ланцюзі первинної структури.

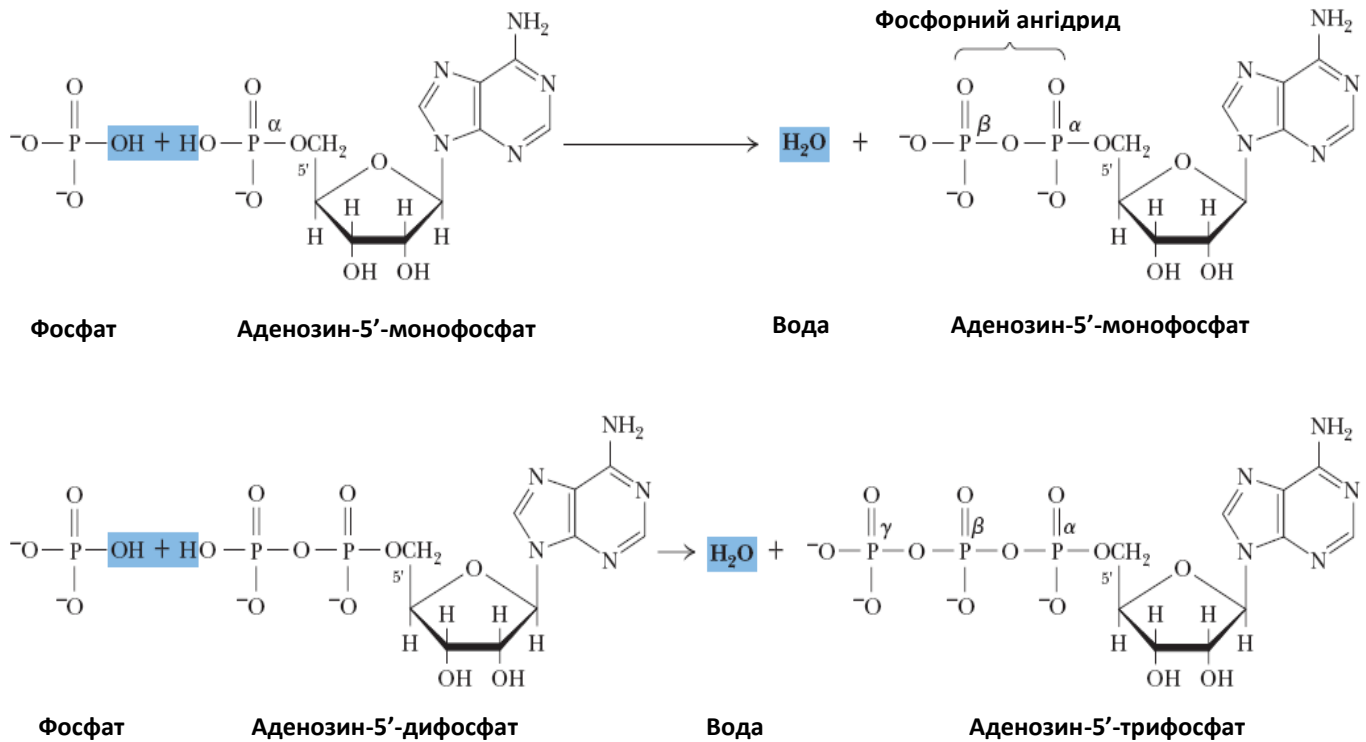
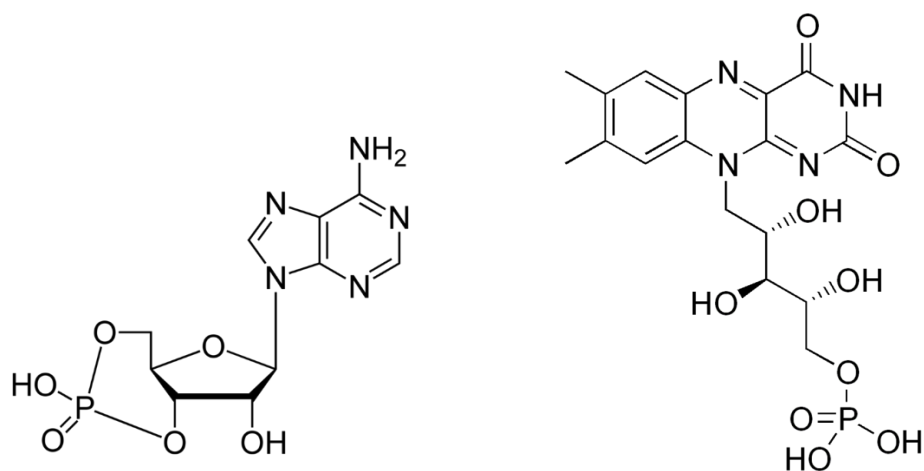


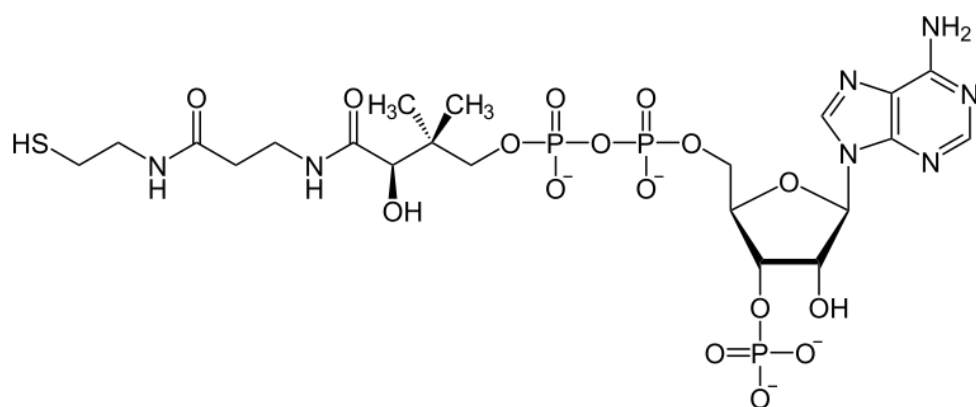
Рис. 9. Реакції синтезу АТФ з АМФ, що каталізуються нуклеотидкіназами.

Серед нуклеотидів у живій клітині зустрічаються також ті, в яких фосфорний залишок займає не лише 5' положення вуглеводу. Наприклад, **циклічні рибонуклеозид-2'-3'-монофосфати (2'-3'-цНМФ)** являють собою інтермедіати метаболічних шляхів, які можна ізолювати. Також зустрічаються рибонуклеозид-3'-монофосфати, які є продуктами гідролізу РНК певними ендонуклеазами. Але найвідомішими варіантами цієї групи сполук є циклічні нуклеотиди – аденозин – 3'-5' – монофосфат (**рис. 10, А**) та гуанозин – 3'-5' – монофосфат (цАМФ та цГМФ відповідно), які є важливими регуляторними молекулами та вторинними месенджерами. Є моно- та динуклеотидні похідні зі специфічною структурою - як приклади можна навести флавінові коферменти дегідрогеназ ФАД та ФМН (**рис. 10, Б**), переносник ацильних груп кофермент А (**рис. 10, В**), піридинові коферменти оксидоредуктаз НАД та НАДФ (**рис. 10, Г**), а також модулятор внутрішньоклітинних йонних каналів циклічну АДФ-рибозу (**рис. 10, Д**). Нарешті, нуклеотидну частину має також кобаламін та його похідні.

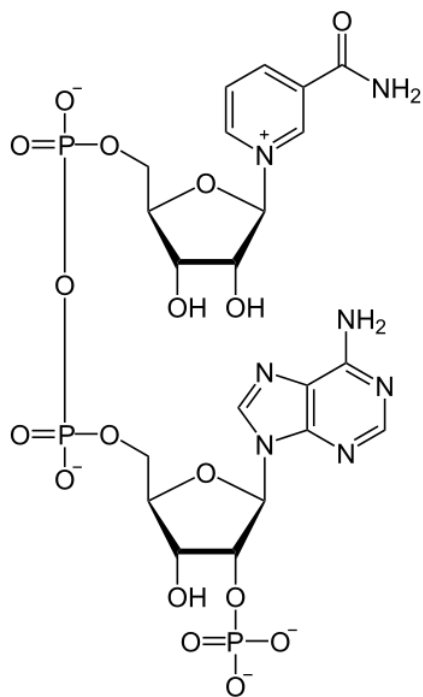


A

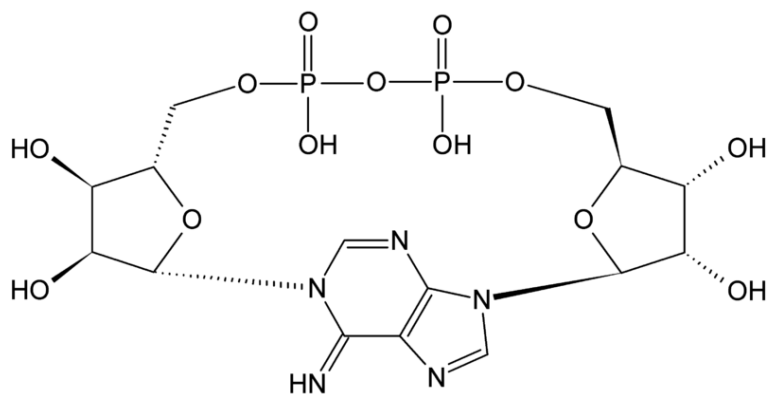
Б



B



Г



Д

Рис. 10. Приклади структур похідних нуклеотидів (пояснення у тексті).

1.3. Властивості азотистих основ

Вільні піримідини та пурини через присутність атомів азоту в гетероциклах володіють **слабкими основними властивостями**, саме тому і були названі азотистими основами. Обидва види основ є **резонансними молекулами** з великою кількістю кон'югованих зв'язків, що визначає їх основні властивості у плані структури, розподілу електронної щільності та поглинання світла молекулами нуклеїнових кислот. Явище резонансу між атомами кілець основ дає більшості зі зв'язків **частково подвійний характер**. Це призводить до того, що кільця піримідинів є повністю плоскими, в той час як пурини майже плоскі з невеликою складкою.

Вільні основи обох типів можуть існувати у декількох таутомерних формах в залежності від рН. Так, урацил може бути у формі лактаму (кето-), лактиму (дигідрокси-) та лактам-лактиму (кето- та гідрокси-). Також існують форми амінні та імінні, наприклад, для аденіну або гуаніну (**рис. 11**). За фізіологічних умов (рН = 7,2 -7,4) переважають форми основ, представлені на **рис. 4**.



Рис. 11. Таутомерні форми аміно- і кетовмісних сполук.

Ще одним наслідком резонансності структур основ є те, що всі вони інтенсивно поглинають промені у ультрафіолетовому діапазоні довжин хвиль **від 230 до 280 нм**, таким чином нуклеїнові кислоти характеризуються поглинальним максимумом за **260 нм**. Найбільшим ступенем поглинання відрізняється аденозинмонофосфат (**рис. 12**). На спектральних характеристиках азотистих основ засновані усі методи якісного та кількісного спектрофотометричного визначення нуклеїнових кислот.

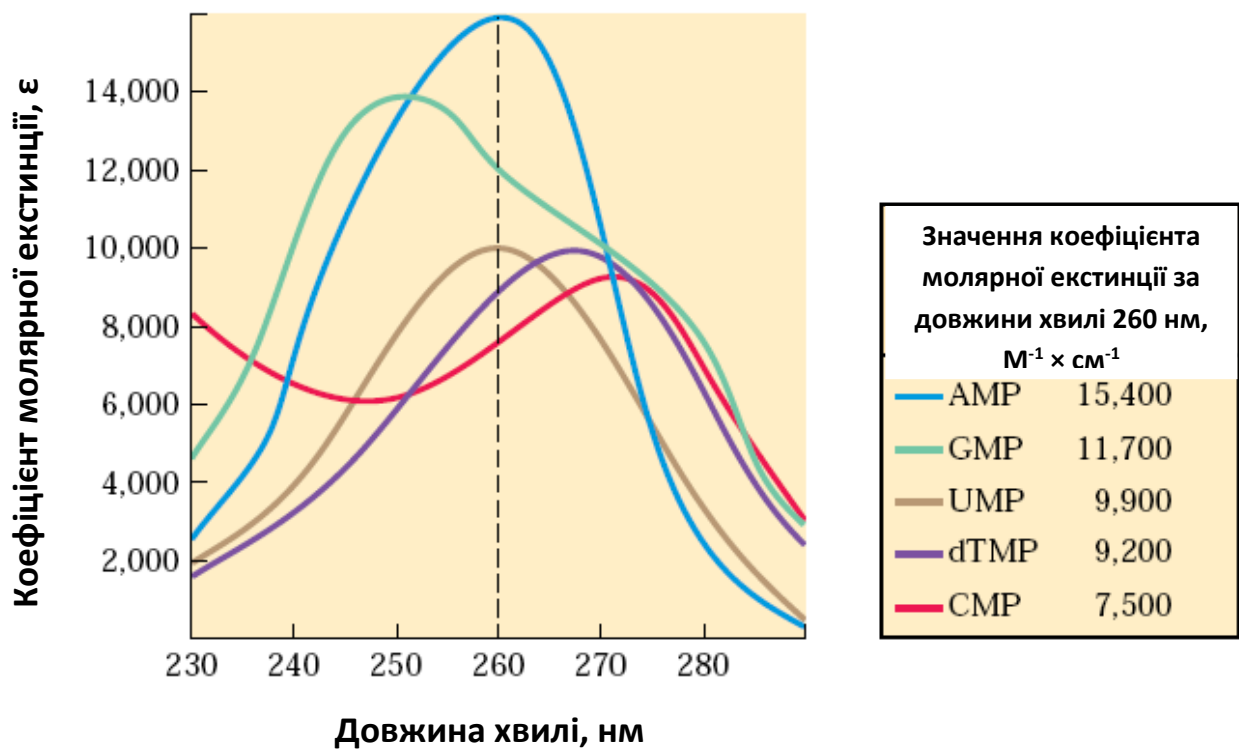


Рис. 12. Спектр поглинання та коефіцієнти молярної екстинції нуклеотидів.

За нейтрального значення рН у клітинах основи є гідрофобними та практично не розчиняються у воді. За кислого або лужного рН вони отримують заряд, тому їхня розчинність у воді зростає. Саме гідрофобна природа основ дозволяє їм вступати між собою у **три типи взаємодій**:

- 1) Ван-дер-Ваальсові,
- 2) диполь-дипольні,
- 3) стекінг-взаємодії.

Такі взаємодії є дуже важливими для **мінімізації контакту основ з водою** і є основним фактором стабільності вторинної структури НК. Найбільш важливими функціональними групами основ є атоми азоту кілець, карбонільні групи та екзоциклічні аміногрупи. Водневі зв'язки між основами, що здійснюються через дані групи, є важливими факторами стабільності будови ДНК та РНК.

1.4. Модифікації азотистих основ та нуклеозидів

Пурини та піримідини у складі нуклеотидів можуть зазнавати низки **спонтанних або індукованих змін ковалентної структури**. Швидкість таких змін у першому випадку, як правило, є дуже низькою, але вони мають певне фізіологічне значення,

оскільки нормальна клітина характеризується невеликим рівнем толерантності щодо змін власної генетичної структури. Незворотні зміни будови ДНК називаються мутаціями, багато з яких індуковано якраз модифікаціями основ. Найбільш розповсюджені видозміни азотистих основ у складі природних нуклеїнових кислот на прикладі дезамінування представлені на **рис 13**.

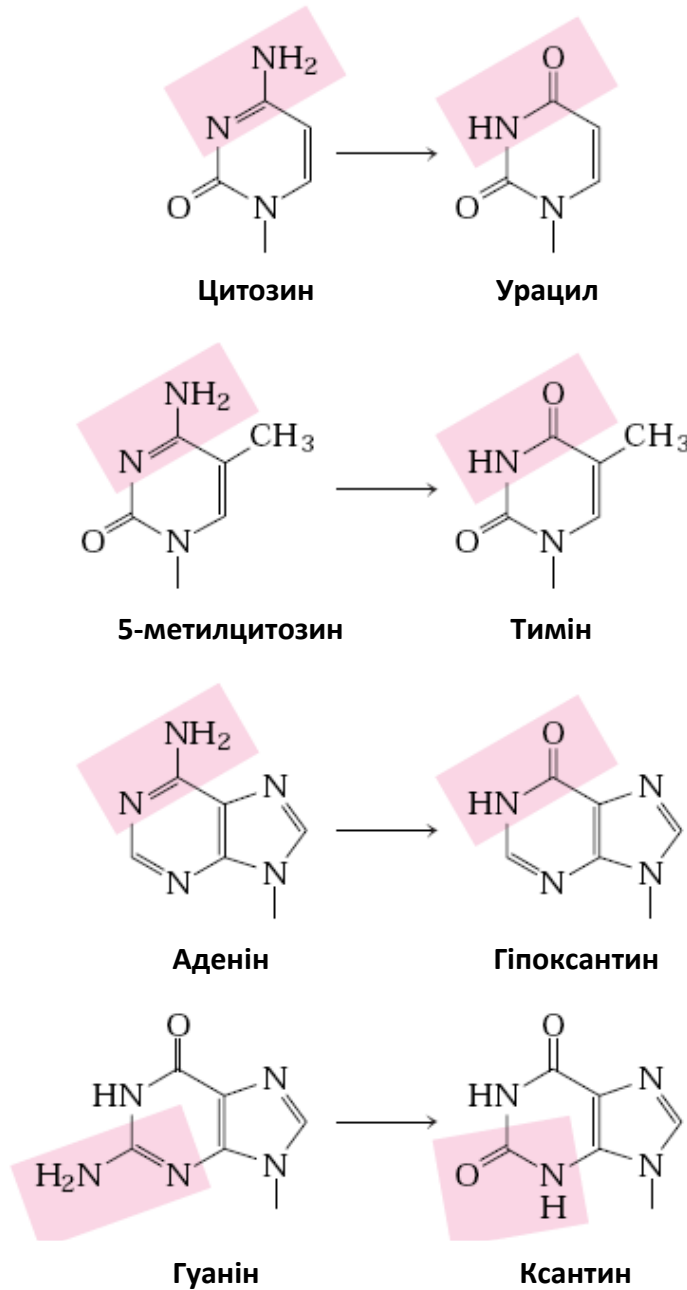


Рис. 13. Реакції дезамінування азотистих основ.

Однією з найпростіших змін структури ДНК або РНК є спонтанна втрата аміногруп основ – **дезамінування (рис. 13)**. Наприклад, у одній клітині за нормальних умов дезамінування цитозину на урацил у складі ДНК відбувається раз на 10⁷ цитидинів за

добу. Це відповідає приблизно 100 спонтанним дезамінуванням за день. Ще однією розповсюдженою реакцією дезамінування є перетворення 5-метилцитозину на тимін (**рис. 13**). Така реакція, як правило, призводить до зсуву рамки зчитування під час реплікації інтенсивно метильованих ділянок геному. Дезамінування гуаніну до ксантину та аденіну до гіпоксантину (**рис. 13**) відбувається приблизно у 100 разів повільніше, ніж у піримідинах.

Можливо, саме здатність цитозину активно дезамінуватися і є однією з причин заміни урацилу на тимін у складі ДНК. Урацил, який у складі ДНК за умов норми не зустрічається, таким чином, швидко розпізнається та видаляється системами репарації. Якби ця основа була присутня у якості звичайної для ДНК, це призвело б до значної зміни генетичного матеріалу завдяки одному лише спонтанному дезамінуванню. До того ж, за рахунок цього процесу кількість G-C пар неуклінно зменшувалася б на користь пар A-T, що призвело б до нестабільності структури ДНК.

Важливою спонтанною реакцією нуклеозидів є гідроліз глікозидного зв'язку між пентозою та основою - **апуринізація або апіримідинізація**. Ця реакція у випадку пуринів відбувається швидше – за добу втрачається приблизно **10000 пуринових основ на одну тваринну клітину**. У РНК апуринізація йде набагато повільніше, до того ж не вважається фізіологічно значимою. За експериментальних умов втрата пуринів може бути пришвидшена у кислих умовах. Наприклад, інкубація ДНК за умов закислення середовища (рН = 3) призводить до селективного гідролізу глікозидного зв'язку у пуринових нуклеозидах та формування **AP-сайтів (Apurinic)** у складі нуклеїнової кислоти.

Яскравим прикладом індукованої модифікації ДНК є **формування піримідинових циклобутанових димерів**, яке активується у відповідь на дію ультрафіолетового випромінювання і проходить за рахунок конденсації двох етиленових груп сусідніх у ланцюзі ДНК тимінів або цитозинів. Найчастіше утворюються так звані **тимінові димери** між двома сусідніми тимінами одного ланцюга. Також за рахунок дії ультрафіолету може утворюватись інший тип продукту – **6-4-фотопродукт (рис. 14)**. Формування піримідинових димерів відбувається за умов опромінення ДНК у діапазоні довжин хвиль **від 200 до 400 нм**, який є наближеним до видимого (400 – 700 нм), тому входить у спектральний діапазон сонячного випромінювання. Тому такі, як правило, нерідко відбуваються з нуклеїновими кислотами клітин епітелію та з бактеріальною ДНК.

Випромінювання у більш високоенергетичному рентгенівському діапазоні (гамма-промені особливої потужності) призводить до більш значних пошкоджень - відкриття кільця та фрагментації основ, а також до одно- та двониткових розривів ковалентного кістяку нуклеїнових кислот. Джерелом такого іонізуючого випромінювання у біосфері є космос, а також природні радіоактивні родовища ізотопів - радію, плутонію, урану, радону, ^{14}C , ^3H (так звані тератогенні джерела). Також

існують антропогенні джерела – медичні прилади діагностики (флуорографічні, рентгенівські установки) та радіаційної терапії, тощо. Підраховано, що близько 10% змін геному людини спричинюються саме даними факторами.

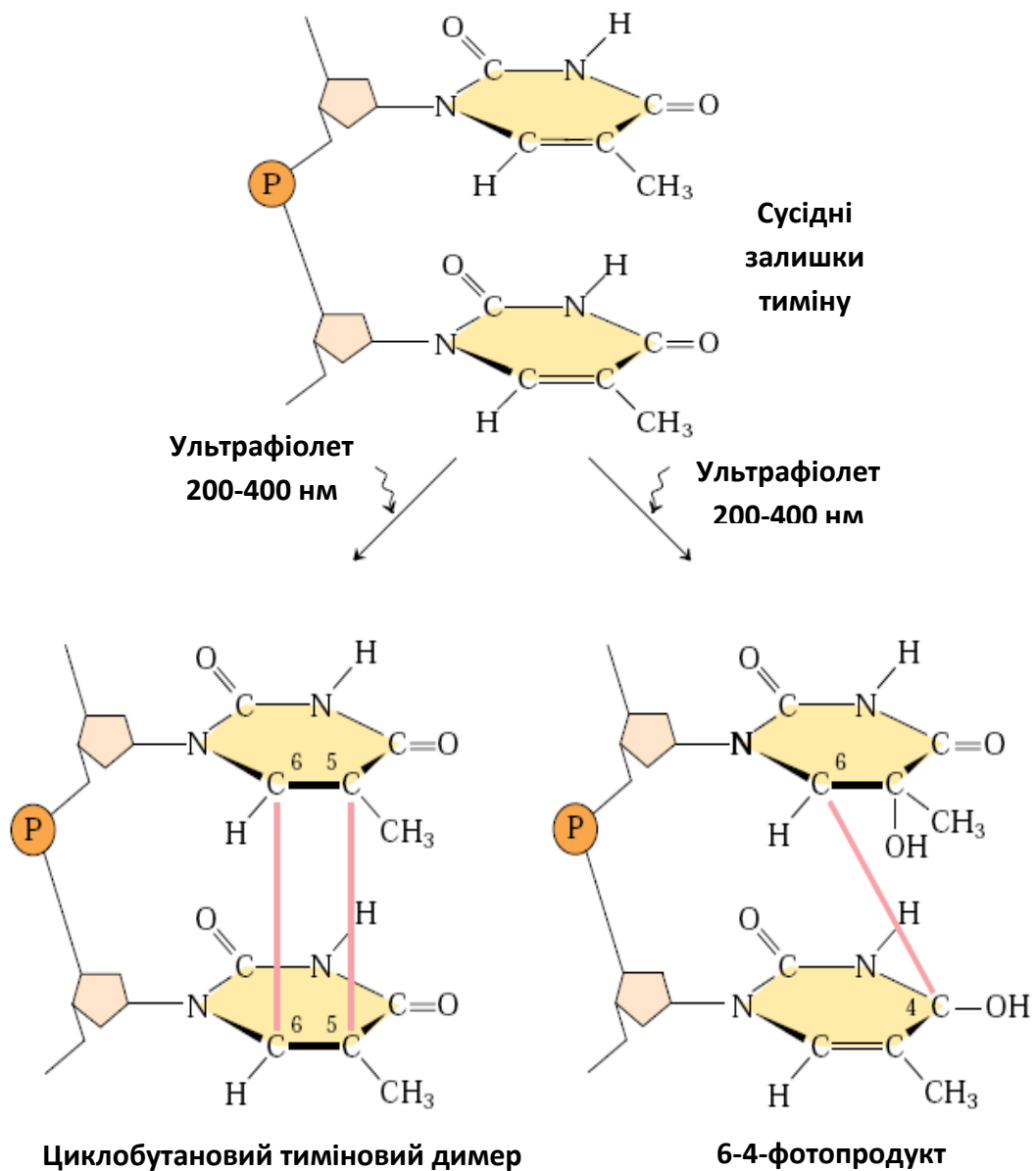


Рис. 14. Реакції дезамінування азотистих основ.

Ще одним джерелом індукованих неферментативних модифікацій азотистих основ і нуклеозидів є **вплив хімічних речовин техногенного походження**. Іноді вони самі по собі не є шкідливими, але метаболізують у клітині до небезпечних форм. Такі речовини можна поділити на **два основних класи**:

- Дезамінуючі агенти,
- Алкілюючі агенти.

Серед першої групи можна відмітити, наприклад, **нітритну кислоту (HNO_2)**, яка метаболізує у організмі до нітритів або **нітратної кислоти (HNO_3)**. З іншого боку, нітратна кислота може формуватися і з органічних попередників, таких як нітрозаміни, або з нітритних та нітратних солей. HNO_3 значно пришвидшує дезамінування азотистих основ усіх типів. Подібний ефект має **бісульфіт (HSO_3^-)**, тому обидві речовини використовуються у якості консервантів для пригнічення росту токсичних бактерій, причому характеризуються відносно низьким канцерогенним потенціалом. Прикладом речовин другої групи можна вважати **диметилсульфат (рис. 15, А)**. Дана сполука метилує гуанін, перетворюючи його на 6-метилгуанін, що виключає його спарювання з цитозином. Ще одним алкілюючим агентом природного походження вважається універсальний донор метильних груп в клітині, **S-аденозилметіонін (рис. 15, Б)**.

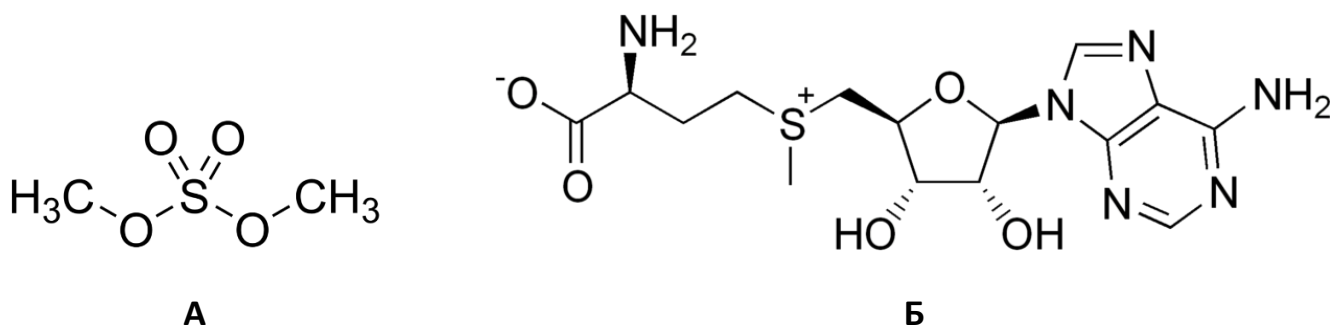


Рис. 15. Приклади дезамінуючих та алкілюючих агентів (пояснення у тексті).

Нарешті, можливо, найбільш важливим джерелом індукованих неферментативних змін азотистих основ та нуклеозидів клітини є **дія активних форм кисню (АФК)** за умов окисного стресу. Пероксид водню, гідроксил-радикал та супероксид-аніон, можуть синтезуватися або внаслідок пострадіаційних ефектів через іонізацію води, або ж у якості побічних продуктів функціонування ланцюга окисного фосфорилування в мембранах мітохондрій. Найбільш активними у плані окисного пошкодження ДНК виступають гідроксил-радикали. Захист від АФК включає в себе ферментативну систему клітини, що включає в себе **каталазу, супероксиддисмутазу, глутатіон-пероксидазу, комплекс цитохромів P450**, тощо, а також неферментативну антиоксидантну ланку, яка представлена низькомолекулярними антиоксидантами – **аскорбатом, глутатіоном, токоферолом, убіхіноном**, та іншими. Однак не весь об'єм АФК, що утворюється в клітині, знешкоджується, особливо це стосується розвитку окисного стресу внаслідок дії патологічних чинників. Таким чином, модифікації та пошкодження ДНК під впливом АФК все ж відбуваються.

Найбільш яскравим прикладом ферментативно-індукованих модифікацій виступає **метилування основ** у складі ДНК спеціалізованими метилазами. Причому аденін та цитозин за цим шляхом метилуються частіше, ніж гуанін та тимін. Метилування, в основному, відбувається лише в певних регіонах молекули ДНК. Як правило, метилування потрібно для регуляції експресії геному, а також для захисту ДНК від дії нуклеаз (більш характерно для бактерій). Однак, у більшості випадках функціональне навантаження цієї модифікації не встановлено. Усі без виключення відомі на сьогодні метилази ДНК використовують у якості донора метильної групи **S-аденозилметіонін**. Наприклад, бактерії мають **дві ферментативні системи метилування**:

- 1) **Система модифікації-рестрикції DMRS (DNA Modification Restriction System)** - захищає клітину від чужорідної ДНК шляхом метилування власного геному. В результаті метильована ДНК не розпізнається нуклеазами, в той час як неметильована чужорідна -знищується.
- 2) **Метилазна система DAM (DNA Adenine Methylation)** - метилує аденозинові залишки у складі послідовності **5'-GATC-3'**, продукуючи **N6-метиладенозин**. Таке метилування здійснюється ферментом DAM-метилазою, який є компонентом системи репарації неправильно поєднаних пар основ ДНК.

Як уже відмічалось, у клітинах еукаріот приблизно 5% цитозину ДНК метилується до 5-метилцитозину. **5-метилцитозин** зустрічається, як правило, у послідовності **CpG**, причому симетрично на обох ланцюгах одразу. Таке метилування, як вважають, пригнічує міграцію мобільних елементів ДНК, так званих транспозонів. Метилування цитозину має також і структурне значення, оскільки визначає перехід ДНК з однієї форми вторинної структури у іншу.

1.5. Конформаційні особливості площини пентофураноз

П'ятичленні пентофуранози у складі ДНК та РНК, по суті, не є планарними. Така відсутність справжньої плоскості називається складчастістю. Складчастість можна пояснити ефектом нековалентних взаємодій між замісниками біля чотирьох атомів вуглецю пентоз – найбільш енергетично стабільна з конформацій потребує, щоб усі **замісники знаходилися якнайдалі один від одного**. Таким чином, різні замісники дають різну картину складчастості. Складчастість можна охарактеризувати **двома основними шляхами**:

- За допомогою аналізу положення атомів кільця, які не входять у площину кільця.
- За допомогою аналізу торсійних кутів всередині кільця.

Конформація складчастості вуглеводу описується п'ятьма основними ендоциклічними торсійними кутами (**рис. 16, А**). В принципі, існує певна кількість взаємоперетворюваних видів складчастості, які розділені між собою енергетичними бар'єрами. Основна причина змін конформації кільця полягає саме у варіабельному значенні торсійних кутів. Для розрахунку і визначення взаємовідносин таких кутів у різних конформаціях використовують так зване «**колесо**» ротації торсійних кутів пентоз (**рис. 16, Б**).

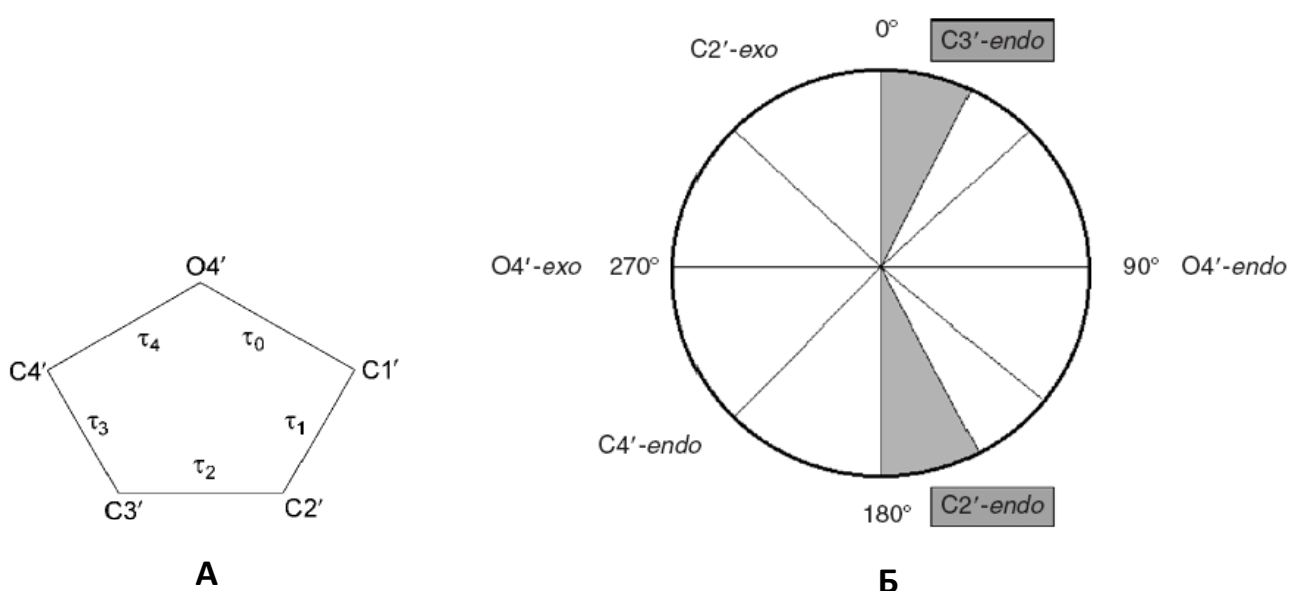


Рис. 16. Торсійні кути складчастості пентофуранози (**А**) та «колесо» ротації кутів (**Б**) для визначення конформації вуглеводів.

Коли один з атомів кільця відхиляється від загальної площини, говорять про конформацію **конверт-1 (envelope-1)**. Частіше зустрічається варіант, коли декілька атомів відхилено від площини, наприклад, двоє з них знаходяться по різні боки площини інших трьох. Це призводить до конформації, відомої як **твіст (twist)**. Дуже важливим є напрямок відхилення атомів від площини пентози. Якщо таке відхилення спостерігається на **стороні азотистої основи та зв'язку C4'-C5'**, тоді відхилений атом відноситься до **ендо (endo)**. Якщо ж відхилення йде на **протилежному боці – екзо (exo)**. У кристалічних структурах ізольованих нуклеозидів найчастіше спостерігаються варіанти складчастості пентофураноз типів **C2'-ендо** та **C3'-ендо** (**рис. 16, Б, зафарбована сірим область, та рис. 17**). Але на практиці такі «чисті» конформації присутні **рідко** через наявність замісників навколо кільця. «Чиста» конформація твіст виявляється лише тоді, коли атоми, відхилені на обох боках площини, є сусідніми, наприклад, C2'-ендо – C3'-екзо. Складчастості з родини **C2'-ендо** часто називають «**південними**» (**S, south**) конформаціями через те, що вони розташовані у нижній ділянці «колеса» ротацій кутів пентоз. Конформації **C2'-екзо**, навпаки, отримали

назву «північних» (**N, north**), оскільки у цьому випадку торсійні кути мають значення від -10° до $+40^{\circ}$, а, отже, розміщуються у верхньому секторі «колеса» (**рис. 16, Б**). Такі географічні назви вельми поширені серед спектроскопістів у сфері ЯМР.

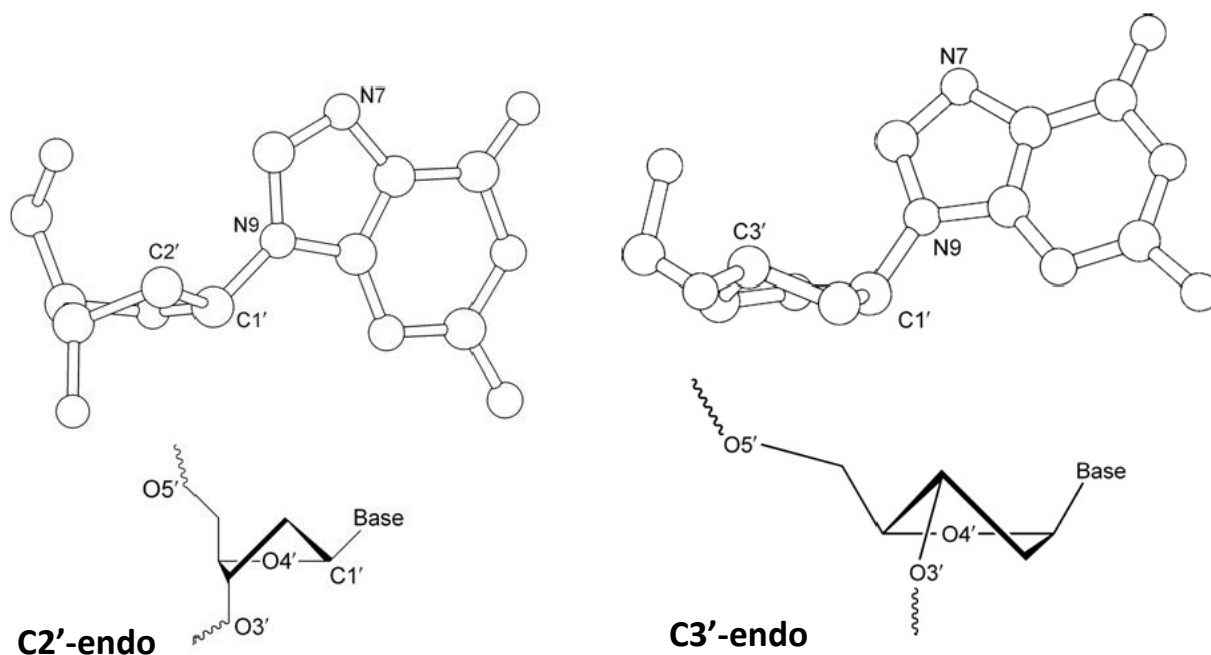


Рис. 17. Найбільш розповсюджені варіанти складчастості пентофураноз у складі кристалічних форм нуклеозидів.

З «колеса» ротації кутів (**рис. 16, Б**) видно, що значення кутів змінюються, а, отже, конформації вуглеводу здатні переходити одна в одну. На практиці існують енергетичні бар'єри, що перешкоджають таким переходам між головними формами конформацій. Наприклад, для переходу конформації C2'-ендо на C3'-ендо пентоза повинна прийняти проміжну конформацію O4'-ендо, для чого, згідно даних моделювання молекулярної динаміки, треба подолати енергетичний бар'єр у 2-5 ккал/моль (1,5 ккал/моль). Іншими методами було розраховано значення даного параметру, яке склало 2,5-4 ккал/моль.

Основними **особливостями конформації пентофураноз** у природних нуклеозидах є наступні:

- 1) У **пуринових нуклеотидах** переважає конформація пентози **C2'-ендо**, тоді як для **піримідинових** більш характерною є **C3'-ендо**.
- 2) **Дезоксирибонуклеозиди** у більш, ніж 60% випадків знаходяться у формі **C2'-ендо**, а **рибонуклеозиди** – **C3'-ендо**. Це пов'язано з тим, що дві гідроксильні групи у положеннях 2 та 3 вуглеводу рибонуклеозиду будуть знаходитись якнайдалі одна від одної саме у конформації C3'-ендо.

3) Рибонуклеозиди більш обмежені у переходах між конформаціями, ніж дезоксирибонуклеозиди, що дещо обмежує конформаційну рухливість одноланцюгових полімерів РНК по відношенню до ДНК, про що мова піде дещо пізніше.

1.6. Варіанти конформацій глікозидного зв'язку

Глікозидний зв'язок, як уже відмічалось, представляє собою зв'язок між положеннями **C1'** та **N9** у складі **пуринових** та **C1'** і **N1** для **піримідинових** нуклеозидів. **Торсійний кут** даного зв'язку позначається як χ і характеризується надзвичайно широким діапазоном значень. Однак, у даному випадку також існують найбільш поширені конформації. Глікозидні торсійні кути визначаються, в основному, по **площині чотирьох основних атомів**:

- Для пуринових нуклеозидів - «**O4'-C1'-N9-C4**»,
- Для піримідинових нуклеозидів – «**O4'-C1'-N1-C2**».

Теоретично існує два експериментально підтверджених основних низькоенергетичних **діапазони значень глікозидного кута**:

- 1) **Анти (Anti)** - грані «**N1-C2**» пуринових основ або «**C2-N3**» піримідинових основ повернуті у дальній бік від залишку альдопентози вздовж горизонтальної вісі нуклеотиду. Таким чином, атоми **C8** пуринів або **C6** піримідинів «нависають» над площиною пентофуранози. Водневі зв'язки між парами основ у спарених ділянках нуклеїнових кислот направлені від площини пентози (**рис. 18, А**).
- 2) **Син (Sin)** – прямо протилежна конформація, коли основа повністю «нависає» над площиною альдопентози, причому водневі зв'язки пар основ орієнтовані у бік вуглеводу, зокрема, атому **O5'** (**рис. 18, Б**).

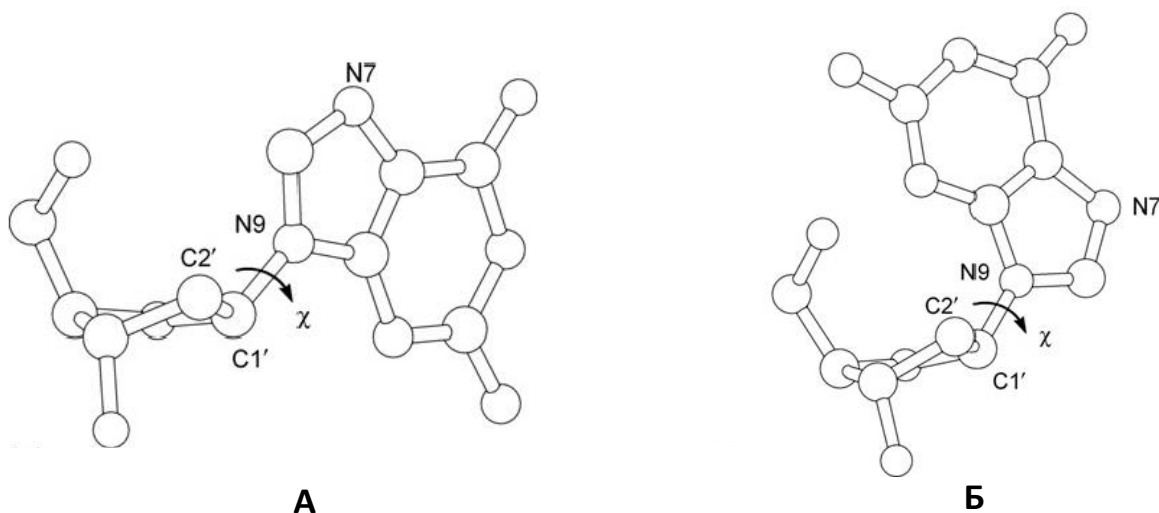


Рис. 18. Структура нуклеозидів за значення глікозидного кута анти (**А**) та син (**Б**).

Встановлено, що деякі пуринові нуклеозиди у кристалах з конформацією син можуть формувати водневий зв'язок між атомами O5' та N3, що в цілому сприяє стабілізації структури сполуки. У будь-якому випадку, для пуринових нуклеозидів і нуклеотидів **конформація син є енергетично менш вигідною**, оскільки, у порівнянні з анти, створює стеричні перешкоди. Виключенням з цього правила виступає гуанілова кислота, яка частіше зустрічається у формі син. Це пояснюється тим, що у даному випадку виникають вигідні електростатичні взаємодії між екзоциклічною аміногрупою N2 гуаніну та α -фосфатним атомом, приєднаним до положення C5'. Для **піримідинових нуклеотидів** більш поширеною є **конформація анти**, оскільки у випадку син створюється не вигідний контакт між атомами O2 основи та фосфатною 5' групою.

Використовуючи програму AMBER для визначення енергетичних параметрів сполук, було виявлено різницю між показниками енергії обох видів розглянутих форм нуклеотидів. Результати наведені у **табл. 4**.

Таблиця 4. Різниця енергетичних показників за переходу між значеннями глікозидного кута у конформаціях нуклеотидів ДНК, ккал/моль

Перехід між конформаціями	Енергетична різниця
дАМФ(анти) – дАМФ(син)	0,3
дГМФ(син) – дГМФ(анти)	3,3
дЦМФ(анти) – дЦМФ(син)	1,8
ТМФ(анти) – ТМФ(син)	1,7

Варто відмітити, що результати в таблиці були отримані з використанням В-форми ДНК у якості модельного об'єкту.

1.7. Первинна структура ДНК та РНК та її конформація

Первинна структура нуклеїнових кислот являє собою **лінійний асиметричний ланцюг нуклеозидів**, які поєднані між собою ковалентними фосфодіефірними зв'язками за допомогою атому фосфору, який сполучає 3'-положення пентофуранози попереднього нуклеозиду (якщо дивитися з 5'-кінця) та 5'-положення вуглеводу наступного (**рис. 19**). Таким чином, серед ковалентних

зв'язків у первинній структурі ДНК та РНК присутні лише глікозидні і складноефірні. За фізіологічних умов в клітині ДНК та РНК на кожен нуклеотидну одиницю має по одному негативному заряду, що забезпечує кислу реакцію сполуки.

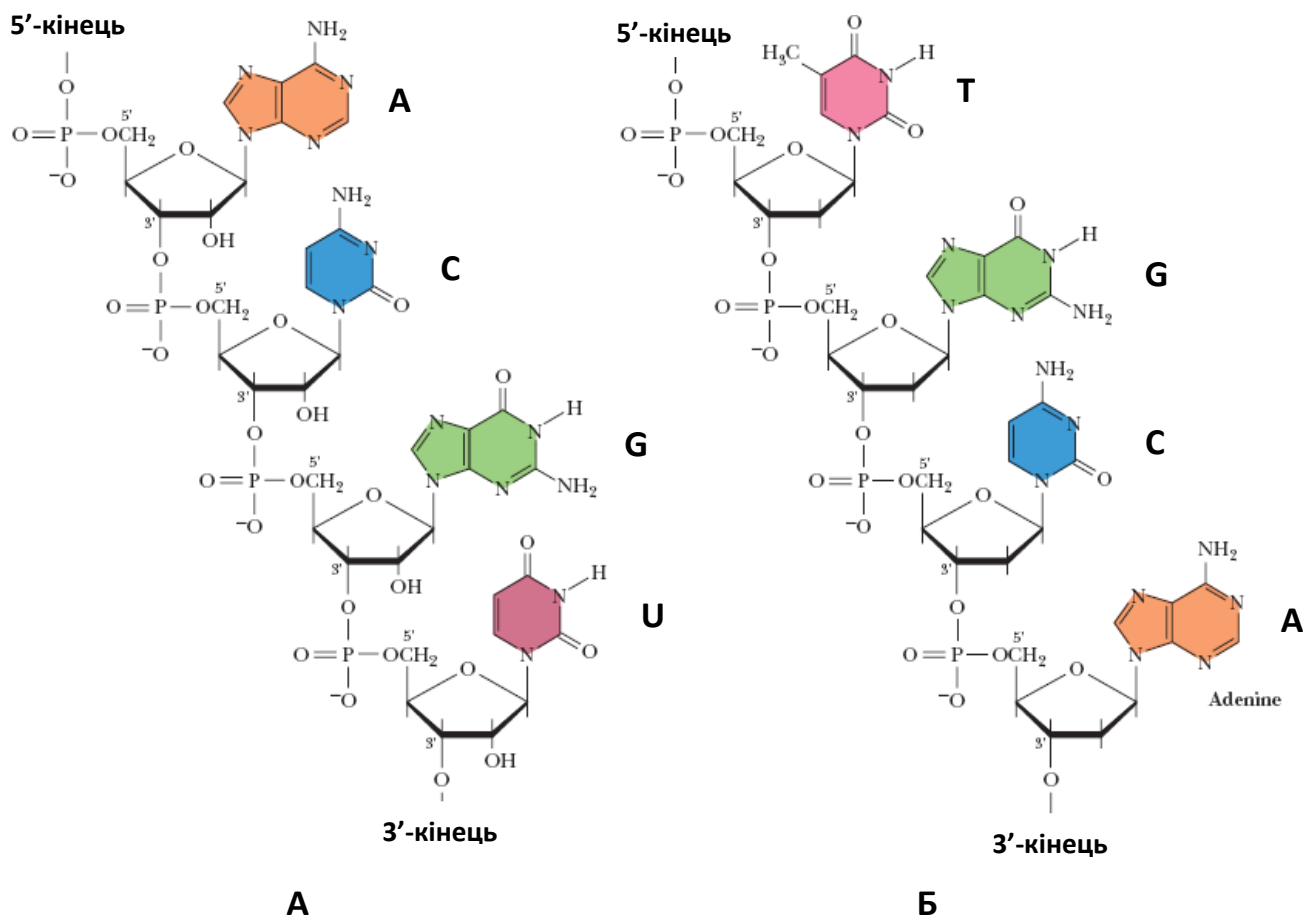


Рис. 19. Фрагмент первинної структури РНК (А) та ДНК (Б).

Для позначення послідовностей НК на письмі використовують однолітерні позначення нуклеотидів, додатковими позначками є У для піримідину та R – для пурину. Фосфатні групи позначаються як Р. Таким чином, одно ланцюгова молекула нуклеїнової кислоти починає записуватись з 5'-кінця, наприклад:



Така послідовність містить нуклеозид на 5'-кінці (аденозин), який має вільну гідроксильну групу, та 3'-кінцевий нуклеотид (гуанозин), який також має вільну гідроксильну групу, але уже у третьому положенні рибози. Іноді для зручності

позначки фосфатів взагалі опускають, іноді спеціально вказують обидва кінці. Беручи це до уваги, подвійна антипаралельна послідовність хеліксу може бути записаною як:



або по-іншому:



Іноді для підкреслювання природи нуклеотиду, до позначок у послідовності додають d (дезоксирибоза) або r (рибоза). Наприклад:



Фосфодиефірний кістяк олігонуклеотидів, як зараз відомо, має шість варіабельних **торсійних кутів**, що позначаються грецькими літерами **від α до ζ** (рис. 20, А).

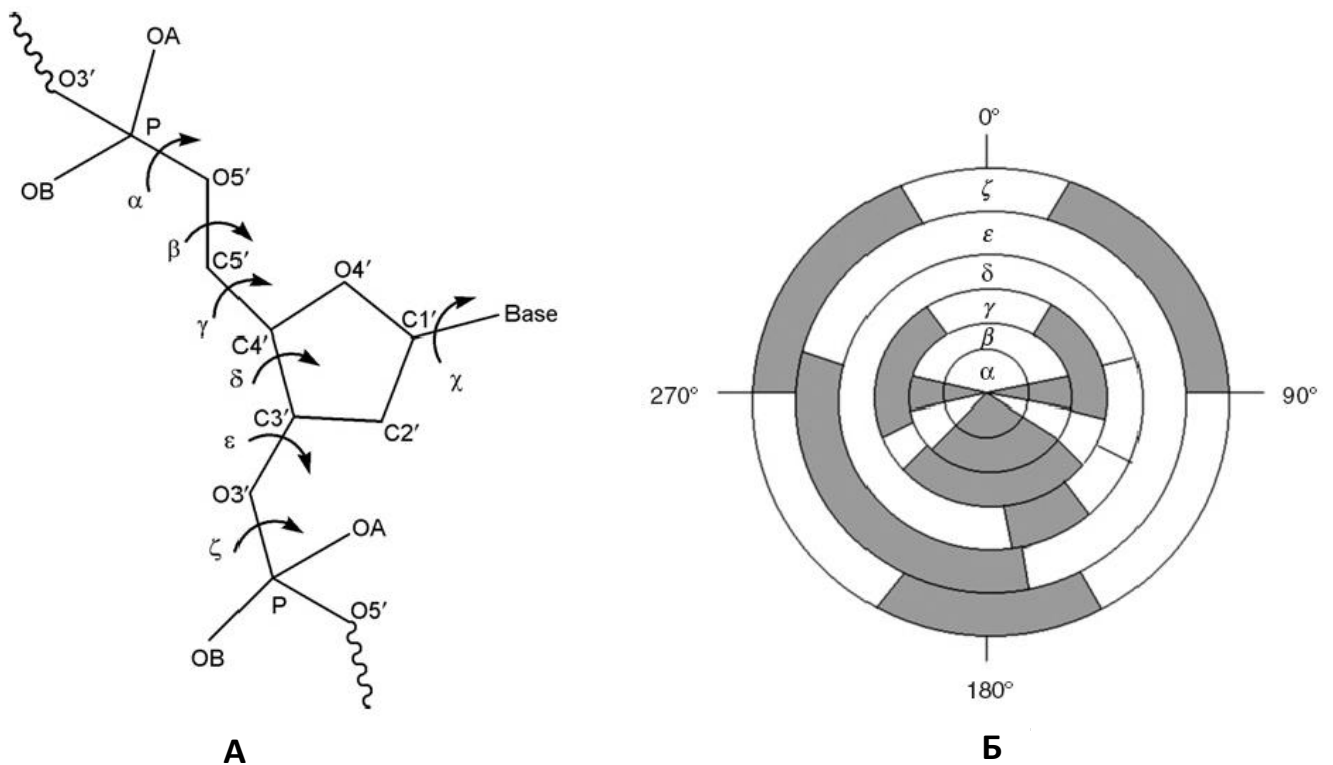


Рис. 20. Торсійні кути кістяку полінуклеотидів **(А)** та «колесо» їх ротації **(Б)**.

Треба пам'ятати, що п'ять торсійних кутів пентофураноз (τ_0 - τ_4 , **рис. 16, А**) та глікозидний кут (χ) також входять у конформаційні параметри кістяку. Таким чином, маємо загалом **12 торсійних кутів**, які описують стан конформації первинної

структури нуклеїнових кислот. Не зважаючи на таку велику кількість кутів, усі вони у певному ступені корелюють один з одним і визначають рухливість фосфодиефірного кістяка у розчині.

Стеричні особливості структури нуклеїнових кислот визначають лише обмежений діапазон кутів, іншими словами, лише окремі значення у діапазоні від 0° до 360° доступні для даних кутів (рис. 20, Б, зафарбована сірим область). Насправді, в теорії зовсім невелика кількість структурних класів оліго- та полінуклеотидів мають конформації, що виходять за межі представлених «дозволенних» значень торсійних кутів. Основною причиною обмежень кутів є формування пар основ за моделлю Уотсона-Крика у складі хеліксу. Однак кристалографічні експерименти та дослідження шляхом ЯМР великої кількості стандартних та модифікованих мононуклеозидів та мононуклеотидів показали набагато більшу різноманітність структури, ніж та, яка випливає зі значень «колеса» ротації (рис. 20, Б). Щодо кристалографії такі розбіжності пояснюються тим, що формування кристалу, як правило, потребує змін вільної енергії, що може призвести до індукції переходів тих енергетичних бар'єрів «заборонених» значень торсійних кутів. До того ж, багато видів молекул РНК характеризуються високою варіабельністю взаємодій між основами, що теж може забезпечити перехід на «заборонені» значення кутів.

Для певних значень кутів кістяка НК існують свої спеціальні конформаційні терміни. Так, для торсійні кути, значення яких близькі до $+60^{\circ}$, називаються **gaucho⁺** або **g⁺**, а близько -60° - **gaucho⁻** або **g⁻**. Кути, що мають значення близько 180° називаються **trans**. Існує також альтернативна номенклатура для торсійних кутів фосфодиефірного кістяку – так звана **система Кляйна-Прелога**, прийнята в органічній хімії. За нею значення кутів близько 0° позначаються як **син (sin)**, а ті, що мають значення біля 180° – **анти (anti)**. Проміжні кути визначаються як **\pm синклінальні ($\pm sc$) для $\pm 60^{\circ}$, та \pm антиклінальні ($\pm ac$) для значень $\pm 120^{\circ}$.**

Загалом, існує чітка кореляція між трьома параметрами конформацій - кутів пар основ, кутів кістяка, та глікозидного кута для нуклеозидів, окремих нуклеотидів, а також менш гнучких оліго- та полінуклеотидів. Існування такої кореляції дуже важливе, оскільки показує, що молекулярні рухи атомів і окремих ділянок оліго- та полінуклеотидів відбуваються узгоджено та взаємозалежно.

РОЗДІЛ 2. Особливості вторинної структури ДНК

Даний розділ знайомить читача з історією відкриття подвійного хеліксу ДНК, хімічною будовою та параметрами вторинної структури нуклеїнових кислот, особливостями формування та енергетичними і конформаційними параметрами зв'язків у парах основ, а також з відомими на сьогодні формами вторинної структури ДНК.

2.1. Історія відкриття вторинної структури ДНК

До 40-их років 20 ст. була однозначно встановлена роль нуклеїнових кислот як носіїв та передатчиків спадкової інформації, наступною задачею було виявлення їх тривимірної структури ДНК. Одними з найперших персоналій, що вели дослідження у даному напрямку, були відомі своїми дослідженнями з біохімії білків лауреати Нобелівської премії Лайнус Полінг і Роберт Корі, а також їх помічник Герман Бренсон. Полінг і Корі у 1951 році прославилися відкриттям α -хеліксу, як однієї з форм вторинної структури поліпептидів. Розроблена саме цими вченими модель стабілізованого водневими зв'язками α -хеліксу і лягла у основу досліджень щодо з'ясування структури подвійного хеліксу ДНК та сприяла створенню відповідної моделі, запропонованої Уотсоном та Криком у 1953 році. Вперше ж дослідження у області безпосереднього з'ясування структури ДНК розпочалося у групі Моріса Уілкінса, Розалін Франклін та цілою низкою співробітників Королівського коледжу в Лондоні. В ході експериментів для аналізу тривимірної структури полінуклеотидів було використано методичку дифракції рентгенівських променів. Знаменита група дослідників під керівництвом Джеймса Уотсона та Френсіса Крика підключилася до роботи дещо пізніше. Ці дослідники, які тоді базувалися у Кавендішській лабораторії Кембріджу, не проводили ніяких експериментів, а зосередили свої зусилля саме на розробці математичної моделі структури ДНК на основі даних, отриманих Уілкінсом та Франклін.

Вагомий внесок у з'ясування структури ДНК зробив також і Ервін Чаргафф. В 1950 році він приймав участь у ідентифікації ДНК, як фактичної основи генетичного матеріалу та з'ясуванні природи явища комплементарності азотистих основ, розробивши спеціальну систему підрахунку співвідношення нуклеотидів у молекулах з різних видів живих істот. Зі своїх розрахунків вчений вивів знамениті правила, які згодом отримали його ім'я - Chargaff's Rules. Перше правило полягало у тому, що молекула ДНК має однакове відсоткове представництво пуринів та піримідинів, а також, що відсоток аденінових нуклеотидів завжди дорівнює відсотку тимінових, а кількість гуанінових відповідає кількості цитозинових ($\%A = \%T$ та $\%G = \%C$). Згодом якраз це правило стало одним з основних постулатів теорії подвійної спіралі ДНК

Уотсона-Крика. Друге правило наголошує, що кількісне співвідношення %A ~ %T та %G ~ %C розповсюджується на два ланцюги і є видоспецифічним параметром. Таким чином, одним з найважливіших заключень правил Чаргаффа був висновок про приблизно однакову кількість пуринових та піримідинових основ у складі ДНК з рівними кількостями тиміну та аденіну, так само, як і цитозину та гуаніну. На основі результатів досліджень Чаргаффа була розроблена таблиця співвідношень нуклеотидів в різних пробах ДНК (**табл. 5.**). Як видно з таблиці, кількість А приблизно відповідає кількості Т, так само як G співвідноситься до С, хоча у пробах з різних джерел кількість відповідної основи відрізняється.

Таблиця 5. Співвідношення кількості нуклеотидів в ДНК по Чаргаффу

Зразок*	S1	S2	HT	LC	Y1	Y2	ATB	BT1	BT2	BT3	BS1	BS2
Нуклеотид												
A	0,29	0,27	0,28	0,27	0,24	0,30	0,12	0,26	0,28	0,30	0,25	0,26
T	0,31	0,30	0,28	0,27	0,25	0,29	0,11	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24
G	0,18	0,17	0,19	0,18	0,14	0,18	0,28	0,21	0,24	0,22	0,20	0,21
C	0,18	0,18	0,16	0,15	0,13	0,15	0,26	0,16	0,18	0,17	0,15	0,17
ЗВ**	0,96	0,92	0,91	0,87	0,76	0,92	0,77	0,88	0,94	0,94	0,84	0,88

* - Зразки: S1 та S2 – сперма ссавців, HT – тимус людини, LC – карцинома печінки, Y1 та Y2 – дріжджі, ATB – бактерії (збудники пташиного туберкульозу), BT1-BT3 – тимус теляти, BS1 та BS2 – селезінка теляти. ** - ЗВ – загальний вихід проби.

Але найбільш критичними для з'ясування тривимірної структури ДНК виявилися дифракційні картини, отримані групою Франклін у 1952 році і передані через Уілкінса Уотсону 30 січня 1953 року в Лондоні. У ті часи рентгеноструктурна кристалографія була невідомою, тому отримання дифракційних картин полягало у наступному: дослідник готував сильно концентрований щільний розчин ДНК, а потім за допомогою тонкої скляної голки обережно виймав з розчину окремі нитки. Самі нитки являли собою декілька довгих нативних молекул. Завдяки вологості повітря і сильній гідрофільності таких ниток вони могли слугувати у якості псевдокристалів. Іншими словами, нитки не мали справжньої кристалічної будови, але відбивали рентгенівські промені з формуванням дифракційних картин, подібних до кристалографічних. Насправді, Франклін отримала просту картинку у вигляді літери X («мальтійський хрест»), що було доказом простоти структури молекули (**рис. 21, А**).

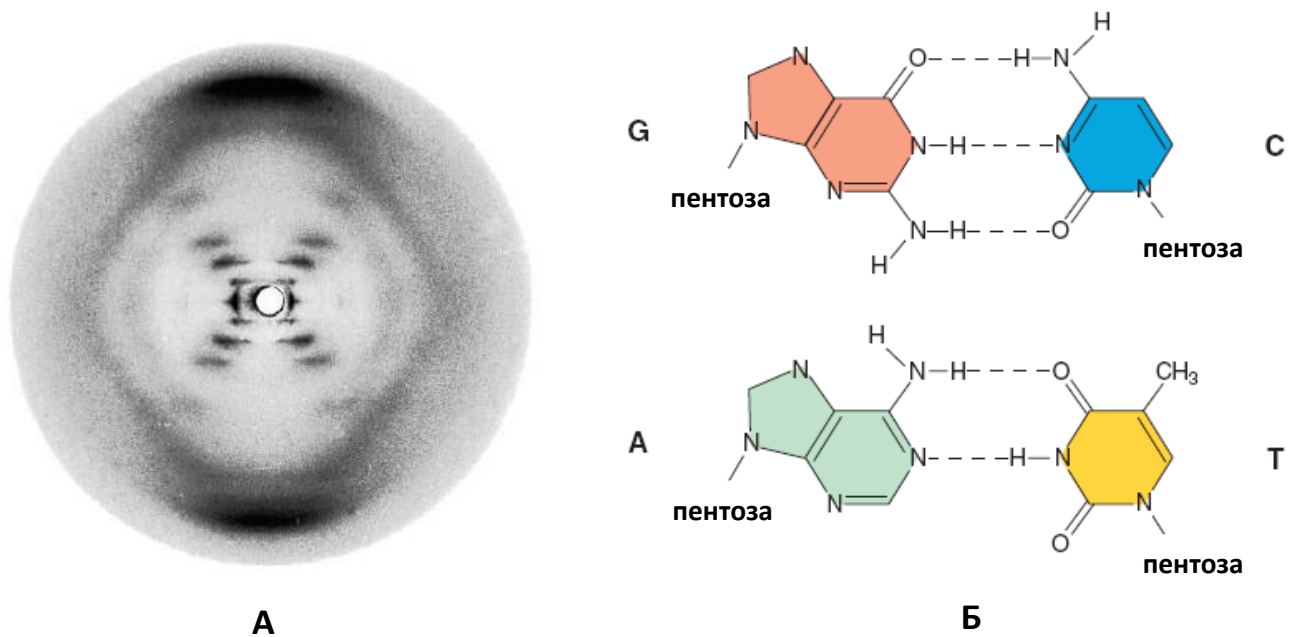


Рис. 21. Дифракційна картина з ниток ДНК, отримана Франклін **(А)** та приклади конфігурації пар основ з водневими зв'язками **(Б)**.

Оскільки ДНК є значною за розміром, подібна спрощена дифракційна картина говорить про те, що ця молекула повинна мати просту регулярну структуру. І найбільш ймовірною у цьому відношенні є будова у вигляді штопора або хелікса. Було встановлено, що відстань між найближчими гілками літери X на картині дорівнювала **3,4 нм**, тобто довжині повторюваної ділянки у структурі (повний виток спіралі ДНК), а проміжки між плямами в межах однієї гілки становили **0,34 нм** (саме стільки займає в ДНК одна пара основ).

У зв'язку з отриманими результатами виникав певний **парадокс**: з одного боку **ДНК** повинна бути **регулярною**, бо має просту структуру згідно картини дифракції, з іншого ж боку, враховуючи різноманітність генів, у якості генетичного матеріалу повинна виступати **нерегулярна і складна молекула**. Вирішення цього парадоксу Уотсон та Крик побачили у подвійноланцюговості хеліксу ДНК. До того ж, найбільш вірогідною є структура ДНК, в якій цукрово-фосфатний кістяк розміщується назовні молекули, а основи «заховані» всередину спіралі. Більше того, основи, скоріше за все, повинні бути спареними, а кожна пара обов'язково повинна містити як двохкільцевий пурин, так і однокільцевий піримідин. Таким чином, хелікс буде зберігати регулярну повторювану структуру, не маючи ні потовщень з двома спарованими пуринами, ні звужень з парами піримідинових основ **(рис. 22)**.

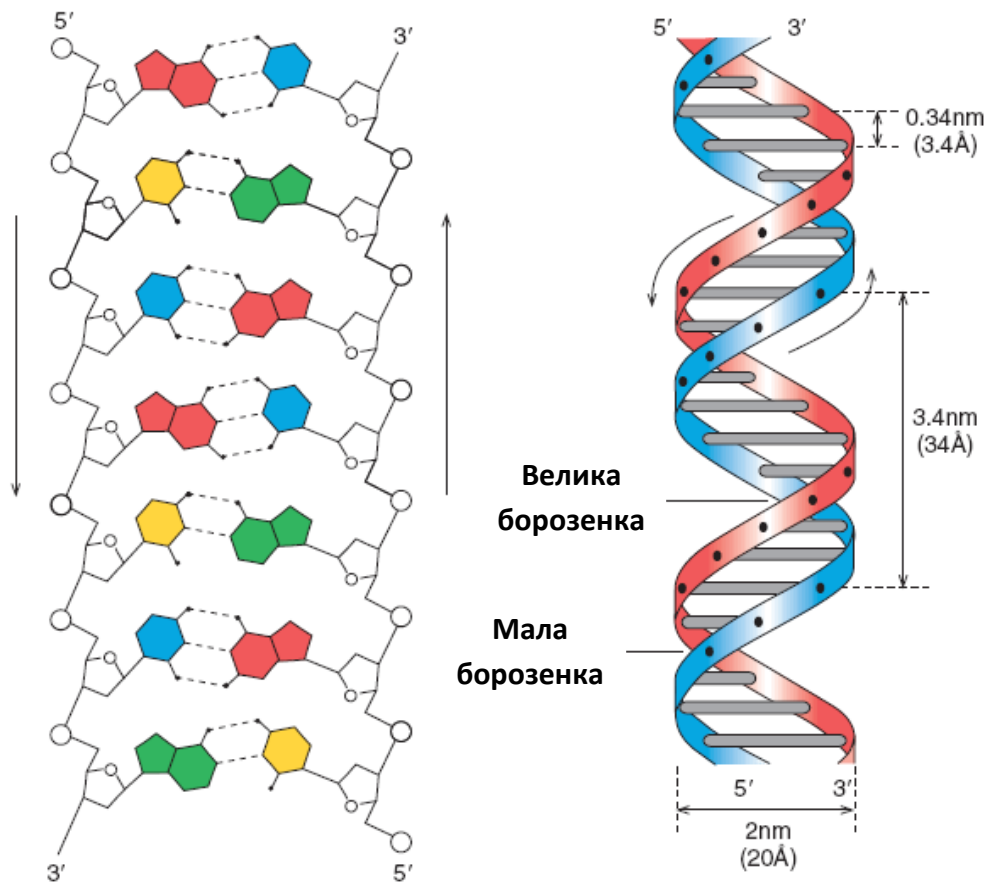


Рис. 22. Схематична будова хеліксу за моделлю Уотсона-Крика.

Дослідження Чаргаффа підтвердили правильність припущень Уотсона та Крика. Дійсно, **кількість пуринів дорівнюватиме кількості піримідинів** лише у тому випадку, коли існуватимуть пари пуринової основи з піримідиною. Також це не суперечить основному правилу комплементарності – **A=T** та **G=C**. Розміри обох видів пар за таких умов будуть ідентичними (**рис. 21, Б**). Саме можливість парування гуаніну виключно з цитозином, а аденіну – лише з тиміном на фоні подвійноланцюговості у будові хеліксу і виявилася ключовим принципом у основі моделі структури ДНК, який наразі відомий як принцип комплементарності. До того ж, модель Уотсона-Крика вирішувала вже згаданий парадокс регулярної нерегулярності ДНК.

Таким чином, модель Уотсона-Крика постулювала існування ДНК у вигляді «гвинтової драбини» з асиметричною, але регулярною будовою (**рис. 22**). Причому:

- Зігнута частина «драбини» являє собою кістяк, що складається з пентофураноз та фосфорних залишків двох ланцюгів ДНК, а кільця пар основ розміщуються всередині спіралі між двома ланцюгами,
- Асиметричні ланцюги первинної структури у складі спіралі ДНК направлені по відношенню один до одного у протилежні боки, тобто, є антипаралельними,

- Сам цукровфосфатний кістяк складається з поєднаних фосфодієфірними зв'язками послідовності нуклеотидів
- Беручи до уваги параметри **кроку спіралі (3,4 нм)** та **довжини однієї пари основ (0,34 нм)**, кожен виток спіралі містить **10 пар основ**.

Стаття про нову модель ДНК, опублікована у Nature поряд з фотографією дифракційної картини, ще й досьгодні є недосяжним зразком одночасної простоти і насиченості друкованого наукового матеріалу – одне з найголовніших відкриттів біохімії, яке, до того ж, лежить у основі усієї молекулярної біології, описане лише 900 словами, і це зайняло трохи більше сторінки тексту. На основі своїх даних Уотсон та Крик також вже готові були запропонувати можливий механізм копіювання молекул ДНК згідно з комплементарністю ланцюгів (**рис. 23**), але цей матеріал у статтю не увійшов. Саме це припущення і дало початок теорії напівконсервативного подвоєння (редуплікації або реплікації) ДНК зі збереженням цілісності генів. У 1958 році Мет'ю Мезельсон і Франклін Сталь у дослідженнях з використанням радіаційної мітки показали, що ДНК дійсно реплікується за напівконсервативним механізмом, коли у першому поколінні кожна з новостворених молекул має по одному материнському і одному дочірньому ланцюгу, а у другому поколінні дві з молекул будуть ідентичними з першим, а ще дві складатимуться повністю з дочірніх ланцюгів нуклеотидів (**рис. 23**).

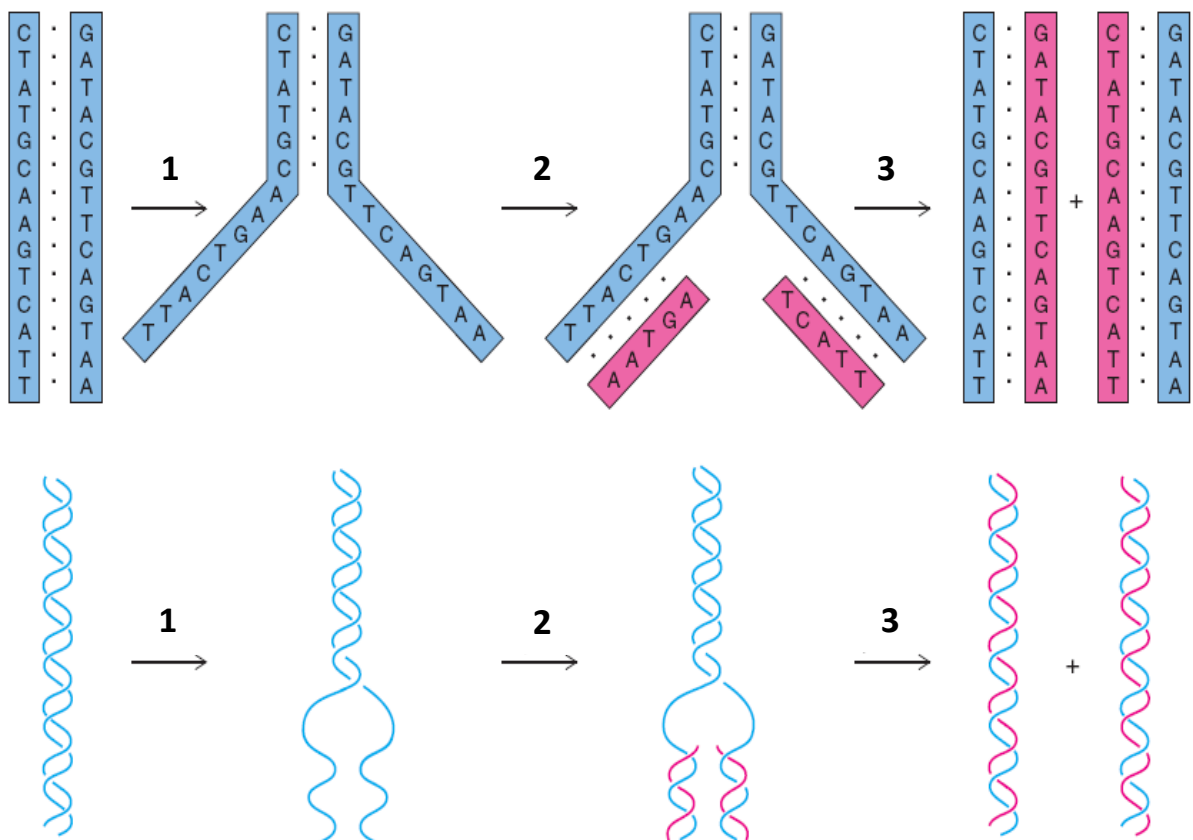


Рис. 23. Схеми напівконсервативної реплікації (подвоєння) молекул ДНК: **1** – розплетення ланцюгів, **2** – синтез дочірнього ланцюга, **3** – результат реплікації.

2.2. Особливості організації пар основ

Хоча індивідуальні молекули основ є майже плоскими, пари основ доволі різноманітні за конфігурацією площини. Така різноманітність, в основному, забезпечується за рахунок впливу оточуючого середовища. Параметри конфігурації основ ДНК були розраховані завдяки **двом основним групам підходів**:

- Визначення згідно координат відносно однієї пари основ,
- Встановлення координат по відношенню до двох сусідніх пар основ.

В ході розрахунків до уваги бралось три взаємноперпендикулярні у двох трьох вимірах основні вісі: X – коротка вісь пари основ, Y – довга вісь пари основ (вектор між атомом C8 пурину та C6 піримідину пари), та Z – довга вісь усього хеліксу (**рис. 24**). Також обов'язково враховувалось існування малої та великої борозенок, які утворюються у подвійному хеліксі завдяки певній несиметричності закручування пар основ у спіраль (**рис. 22**). Причому глікозидні зв'язки (C1'-N9 в пуринах та C1'-N1 в піримідинах) розташовуються ближче до малої борозенки, в той час як атоми C6-N7 пуринів та C4 піримідинів із замісниками знаходяться ближче до великої.

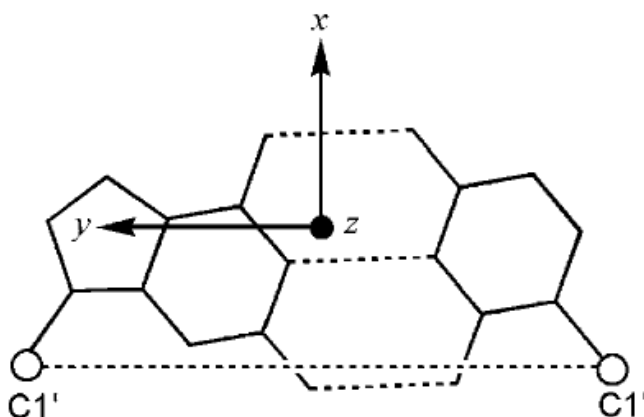


Рис. 24. Розрахункові вісі типової пари основ (пояснення у тексті).

Для індивідуальних пар основ були розраховані наступні параметри:

- 1) **Кут пропелерного вигину (propeller twist, ω)** – кут між нормаллями, проведеними до основ, якщо дивитись вздовж вісі Y (**рис. 25, А**).
- 2) **Кут скоби (buckle, κ)** – кут між основами вздовж вісі X за умови приведення значення кута ω до 0° (**рис. 25, Б**).
- 3) **Уклін (inclination, η)** – кут між віссю Y та площиною, перпендикулярною до вісі Z.

4) **Зсуви X та Y (displacements)**– являють собою переміщення пар основ у серединній площині і визначаються як зміни відстані до вісі Z вздовж відповідних вісей (короткої або довгої) пари.

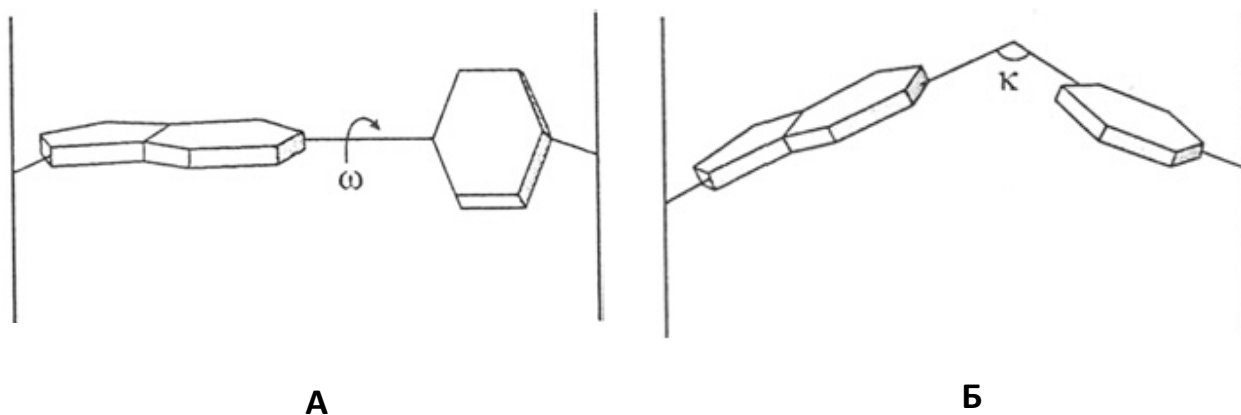


Рис. 25. Кут пропелерного вигину (А) і кут скоби (Б) в парі основ.

Для сусідніх пар основ були розраховані наступні параметри:

- 1) **Кут вигину хеліксу (helical twist, Ω)** – кут між сусідніми парами основ, виміряний відносно вісі Z. Для повторюваного подвійноланцюгового хеліксу цей параметр становитиме $360^\circ/n$, де n – кількість повторюваних одиниць (рис. 26, А).
- 2) **Обертання (roll, ρ)** – кут обертання однієї пари основ по відношенню до сусідньої, виміряний вздовж вісі Y. Позитивне обертання зміщує пару основ у бік малої борозенки (рис. 26, Б).
- 3) **Кут нахилу (tilt, τ)** – відповідний двогранний кут між сусідніми парами основ вздовж вісі X.
- 4) **Ковзання X та Y (slides)** – відносне зміщення однієї пари основ по відношенню до іншої у напрямку одного з ланцюгів тобто, зсув вздовж вісі Y (відстань між середніми точками граней C6-C8 вздовж вісі Y кожної з сусідніх пар основ, або ж у напрямку вздовж вісі X).

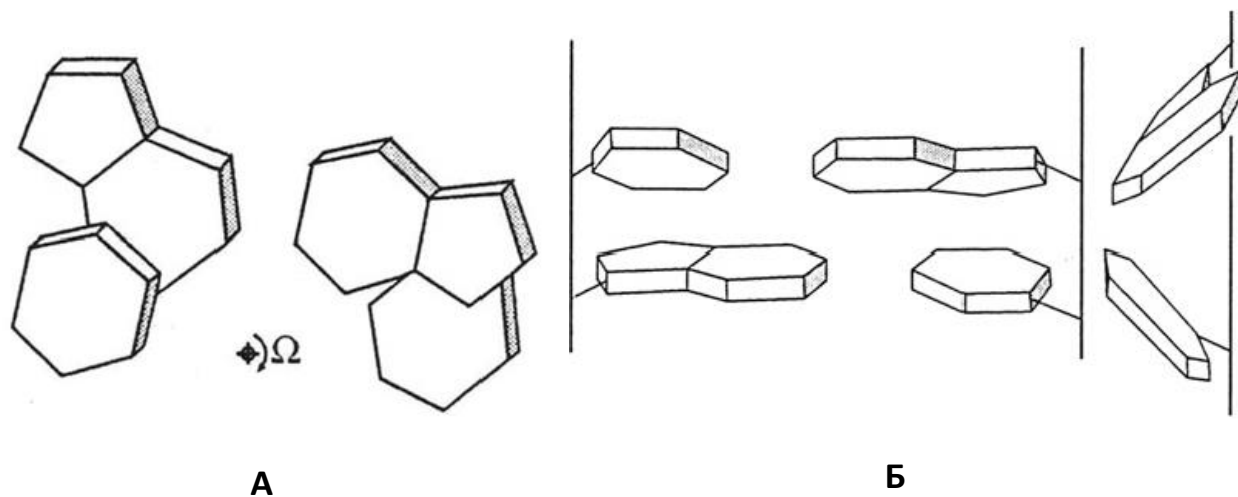


Рис. 26. Кут вигину хеліксу (А) і кут обертання (Б) між сусідніми парами основ.

2.3. Параметри парування азотистих основ

Як уже відмічалось здатність основ до парування лежить в основі компліментарності ланцюгів ДНК. Одразу після постулювання моделі Уотсона-Крика інсувала думка, що обидва види пар основ (А-Т та G-С) мають по два водневих зв'язки. Однак в 1956 році було виявлено, що між Г та Ц існує три такі зв'язки (**рис. 27**). У 1976 році Річ з колегами за допомогою кристалографічних досліджень з роздільною здатністю 0,8-0,9 ангстрем вперше встановили геометрію пар основ для дуплексів рибонуклеотидмонофосфатів **GpC** та **ApU**. Отримані результати вказували на те, що різниця у розмірі пар є мінімальною. Так, відстань між атомами С1' пентози у парі G-С складає 1,067 нм, в той час як у парі А-Т – 1,048 нм.

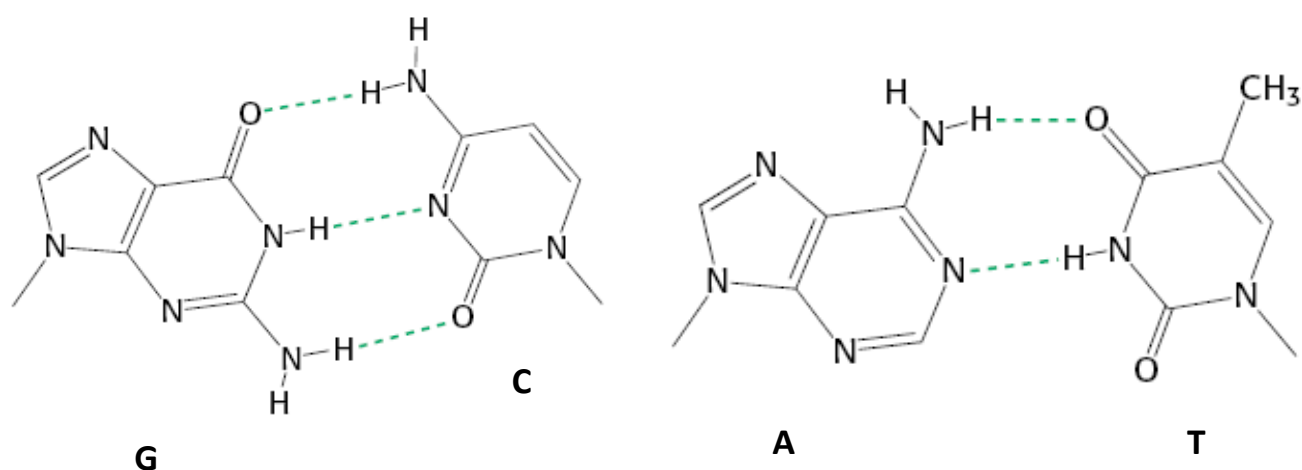


Рис. 27. Структура класичних пар основ ДНК.

У 1976 році згідно результатів рентгенівсько-кристалографічних досліджень на дуплексах РНК у незалежних групах під керівництвом Сімана та Розенберга були розраховані довжини кожного з водневих зв'язків у класичних парах основ моделі Уотсона і Крика (**табл. 6**). З таблиці видно, що всі 5 зв'язків мають приблизно однакову довжину, що ще раз говорить на користь регулярності подвійноланцюгової молекули ДНК у вигляді хеліксу.

Таблиця 6. Довжини водневих зв'язків у класичних парах основ, нм

Пара основ	Атоми у водневому зв'язку	Відстань
U - A	N3-H- - - - -N1	0,283
	O4- - - - - H-N6	0,294
C - G	O2- - - - - H-N2	0,286
	N3- - - - - H-N1	0,295
	N4-H- - - - -O6	0,291

За допомогою симуляційних методів молекулярної динаміки у водному середовищі було також визначено **вільну енергію водневих зв'язків** між парами основ. Для пари А-Т вона склала 4,3 ккал/моль, в той час як для та G-C значення дорівнювало 5,8 ккал/моль (приблизно 1,5 ккал/моль на кожен водневий зв'язок). Цікавим є те, що у парах, де основи попередньо були обернені на 180° , значення вільної енергії не змінювалося. Пізніше ці дані підтвердилися у експериментах з використанням методів квантової механіки, а також за допомогою тестів у силовому полі. Нарешті, розраховані **ентальпії взаємодій гідратованих пар** А-Т та G-C складають 14,0 та 27 ккал/моль відповідно, тобто, на кожен водневий зв'язок припадає приблизно по 7-9 ккал/моль.

2.4. Основні параметри хеліксу ДНК

Вперше параметри хеліксу ДНК були визначені на основі дифракційних картин ниток ДНК – методу, який передував класичній кристалографії і за допомогою якого було визначено вторинну структуру цієї нуклеїнової кислоти. По суті, спочатку було встановлено конформаційні параметри повторюваних регіонів хеліксу. Серед них шляхом вимірювання відстаней між дифракційними плямами і було визначено такі **основні параметри**:

1. **Крок хеліксу (P, pitch)** - відстань між першою та останньою нуклеотидними одиницями у рамках одного повного оберту спіралі, що паралельна вісі Z (**рис. 22, права схема**). Крок визначається виміром відстані між сусідніми полосками на дифракційній картині.
2. **Підйом хеліксу (d, r, rise)** – відстань, яка обмежує одну нуклеотидну пару в ДНК вздовж вісі Z (**рис. 22, права схема**).
3. **Число або повтор (n, number)** – кількість нуклеотидних одиниць, що припадають на один повний оберт хеліксу. Розраховується як P/d .

Саме ці параметри беруться до уваги, коли порівнюються різні форми структури ДНК, про що мова піде у наступному підрозділі.

2.5. Класичні та неканонічні форми вторинної структури ДНК

Як уже було сказано, класичні параметри структури ДНК були отримані з дифракційних досліджень ниток ДНК за умови високої гідратованості середовища, що складала близько 92%, причому дифракційна картина у цьому випадку мала вигляд «мальтійського хреста» (**рис. 21, А**). Така структура отримала назву **В-ДНК** або першої класичної вторинної структури. На її основі була розроблена постульована Уотсоном і Криком модель, оскільки остання була розрахована саме з дифракційних картин, отриманих Франклін у 1953 році.

У ході подальших досліджень було встановлено, що зниження гідратованості середовища призводить до появи інших дифракційних картин, тобто, до утворення нових форм вторинної структури. Наприклад, **зниження гідратованості до 65-75%** веде до появи так званої **А-ДНК**, яка дає кращі за інтенсивністю картини, а отже, краще «кристалізується». Пізніше були виявлені також підкласи А- та В-ДНК, та ще 2 основні класи – С, D та Z. У кінцевому рахунку лише форми А-ДНК та В-ДНК отримали назву канонічних. На сьогодні відомо вже **21 молекулярна модель ДНК**, що позначається латинськими літерами, «вільними» поки що залишаються F, Q, U, V, and Y. У **табл. 7** приведені значення конформаційних параметрів найбільш відомих форм вторинної структури, а **табл. 8** містить значення торсійних кутів кістяку цих молекул.

В-ДНК – найперша вторинна структура, відкрита, як уже відмічалось, у 1953 році та оптимізована Арноттом у 1999 році за рахунок рентгенівської кристалографії. Основні особливості цієї структури:

- Нуклеотиди мають порівняно високі значення глікозидних кутів, та конформацію анти глікозидного зв'язку.
- Складчастість пентофураноз - **C2'-ендо**.
- Хелікс є правозакрученим, з десятьма парами основ на один повний оберт,

- Ланцюги розташовані **антипаралельно** один до одного та **поєднані водневими зв'язками** між основами (горизонтальна стабілізація) та **стекинг-взаємодіями** (вертикальна стабілізація).
- **Пари основ** майже повністю **перпендикулярні до вісі Z** за рахунку чого формування вертикальних гідрофобних взаємодій полегшується.
- Прогалини між залишками дезоксирибози формують **подовжені виїмки** на поверхні молекули, що йдуть паралельно фосфодиефірним зв'язкам. Такі виїмки називають **великою та малою борозенками (рис. 21, права схема)**.

Таблиця 7. Конформаційні параметри форм вторинної структури ДНК

Форма ДНК	Повтор, n	Підйом, d, нм	Кут вигину, Ω	Пропелерний вигин, ω	Обертання, ρ	Уклін, η
A	11	0,254	32,7	-10,5	0,0	22,6
B	10	0,338	36,0	-15,1	0,0	2,8
C	28/3	0,331	38,6	-1,8	0,0	-8,2
D	8	0,301	45,0	-21,0	0,0	-13,0
Z (C)	6 (12)	0,725	-49,3	8,3	5,6	0,1
Z (G)	6 (12)	0,725	-10,3	8,3	-5,6	0,1

Таблиця 8. Значення торсійних кутів кістяку форм вторинної структури ДНК

ДНК	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
A	-52	175	42	79	-148	-75	-157
B	-30	136	31	143	-141	-161	-98
C	-37	-160	37	157	161	-106	-97
D	-59	156	64	145	-163	-131	-102
Z (C)	-140	-137	51	138	-97	82	-154
Z (G)	52	179	-174	95	-104	-65	59

Ширина борозенок визначається як **відстань між фосфатними групами** на протилежних ланцюгах за виключенням ван-дер-ваальсового діаметру фосфатної групи, що складає 0,58 нм. Альтернативно цей параметр можна розрахувати, визначивши відстань між парами атомів у складі пари нуклеотидів, наприклад, між С1' або між О4'. Глибина борозенок визначається як різниця між циліндричними полярними радіусами атома фосфору та N2 гуаніну чи N6 аденіну для малої та великої борозенок відповідно (табл. 9).

Таблиця 9. Розміри борозенок у формах ДНК, нм

ДНК	Велика борозенка		Маленька борозенка	
	Ширина	Глибина	Ширина	Глибина
A	0,22	1,3	1,11	0,26
B	1,16	0,85	0,6	0,82
C	1,05	0,76	0,48	0,79
D	0,96	0,62	0,08	0,74
Z	0,88	0,37	0,2	1,38

Як видно з таблиці, у В-формі ДНК велика борозенка є достатньо широкою, і за глибиною вона майже ідентична до малої, яка, однак є набагато вузкою. Взагалі, велика борозенка збагачена замісниками у положеннях О6 та N6 пуринів або N4 та О4 піримідинів, мала ж у якості «стінок» має цукрофосфатний кістяк. Це є одним з визначальних факторів формування різних видів взаємодії ДНК з білками та іншими молекулами, про що детальніше мова піде пізніше.

А-ДНК – друга за хронологією відкриття форма вторинної структури. Також має свої особливості:

- Пентофуранози знаходяться у конформації **С3'-ендо**.
- Фосфатні групи різних ланцюгів більш наближені – відстань між ними складає 0,59 нм проти 0,7 нм у В-ДНК.
- Конформація **анти** навколо глікозидного зв'язку зберігається, але кут χ менший.
- Площини пар основ відхилені від майже перпендикулярного положення по відношенню до вісі Z та розташовані від неї на відстані близько 0,5 нм.

- **Підйом** складає меншу величину, ніж у В-форми, тому хелікс у цьому випадку є **ширшим** та більш конденсованим (11 пар основ на 0,254 нм проти 10 на 0,34 у В-ДНК).
- **Центр подвійного хеліксу** виглядає як пустотілий циліндр.

Крім того, також існують **підкласи А- та В-ДНК** які відрізняються іншим ступенем закрученості ланцюгів навколо вісі хеліксу, тому характеризуються дещо зміненими конформаційними параметрами у порівнянні з канонічними формами.

Всі інші види вторинної структури ДНК вважаються неканонічними. Перехід до них і між ними, за виключенням С-ДНК, окрім зміни гідратованості, як правило, потребує додаткових факторів, наприклад, суворо визначеної послідовності, як у випадку D-ДНК та Z-ДНК.

С-ДНК – отримується з А-ДНК подальшим зниженням гідратованості середовища до значення 65% і менше. Має більший ступінь закрученості, ніж В-форма, але, взагалі, за параметрами є ближчою до В-ДНК, а не до А-ДНК.

D-ДНК – є можливою лише для ДНК, з послідовностями чергування пуринових та піримідинових нуклеозидів складу **poly(dA-dT)•poly(dA-dT)** або **poly(dI-dT)•poly(dI-dT)**. Структура такого полімеру до сьогодні точно не визначена – одні вчені стверджують, що він є **лівозакрученим** та має **7 або 8 пар** основ на повний виток, інші вказують на **правозакрученість** з **n = 8**.

Z-ДНК – лівозакручена структура, вперше була виявлена Арноттом у 1980 році. Існує лише у послідовностях з чергуванням **poly(dC-dG)•poly(dC-dG)**, формується за умови високої йонної сили середовища, наприклад, з додаванням 2,5М NaCl. Така форма ДНК має чітко визначений динуклеотидний періодичний повтор, що відрізняє її від інших форм ДНК. Причому параметри гуанілових нуклеотидів у цій структурі мають відмінності від показників конформації цитидилових, тому вирізняють форми Z(C) та Z(G) (**табл. 7**). Кожна динуклеотидна одиниця (тобто, дві сусідні пари основ) має довжину 0,725 нм, що дає **найбільший** серед форм ДНК **підйом хеліксу**, що складає 0,363 нм. Враховуючи те, що у даному випадку **n = 12**, Z-ДНК репрезентує собою найбільш релаксовану форму вторинної структури.

2.6. Формування зігнутостей хеліксу ДНК

Як правило, для спрощення сприйняття вважається, що ДНК - пряма молекула. Це постулювалося ще у моделі Уотсона-Крика, оскільки для визначення структури використовувалися саме витягнуті гідрофільні нитки. Насправді ж подвійноланцюговий хелікс, незважаючи на жорстку структуру, має зігнутості та перекручення, що потрібно, в першу чергу, для компактизації і конденсації (формування вищих форм організації геному) або взаємодії з білками та іншими

молекулами. Найрозповсюдженіший з таких згинів молекули має кут приблизно у 20° – саме така зігнутість індукується електростатичними взаємодіями корової ДНК з гістонами у складі нуклеосоми. Однак існують види послідовностей, які згинають молекули нуклеїнової кислоти незалежно від присутності білка. Найбільш розповсюдженими з таких послідовностей є ділянки, симетрично збагачені парами А-Т, тобто один ланцюг повинен мати переважно аденілові, а інший – лише тимідилові нуклеотиди. Такі регіони ДНК часто називаються А-Т-трактами або просто А-шляхами і репрезентують собою регіони зниженої локальної стабільності хеліксу.

Феномен згинання ДНК пояснюють за допомогою двох модельних теорій:

- 1) **Модель «злиття» (рис. 28, А)** - постулює, що зігнутості формуються через раптові зміни у структурі молекули ДНК саме на ділянці, де А-шлях переходить у звичайну В-форму. Таким чином, згинання йде по двом вісям, які нахилені одна по відношенню одна до одної на певний кут. Сам А-шлях при цьому не згинається. Модель було розроблено на основі результатів, отриманих методиками ЯМР та затримки молекул ДНК у гелі.
- 2) **Модель «клин» (рис. 28, Б)** - вказує на те, що зігнутість формується безпосередньо у регіоні А-шляху і викликається, в основному, невеликими змінами ступеню обертання хеліксу біля кожного з його динуклеотидних одиниць. Така модель добре описує особливо подовжені ділянки зігнутостей – наприклад, навколо гістонів у нуклеосомах.

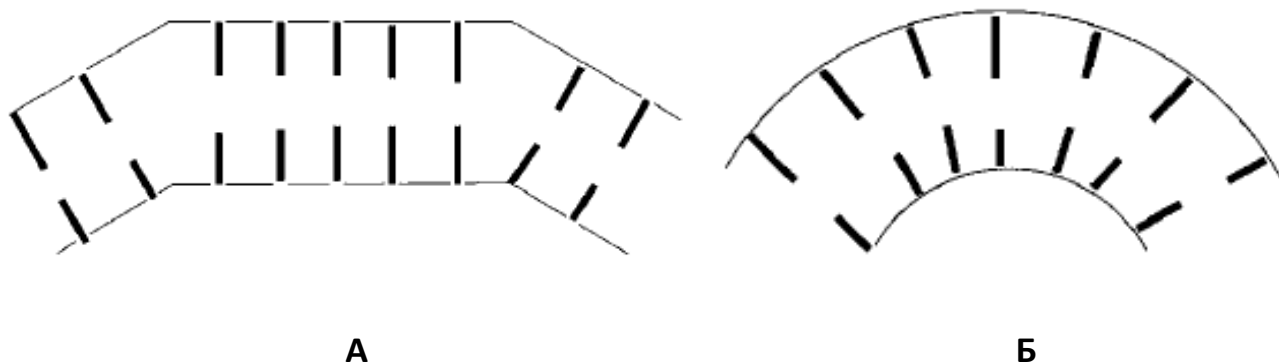


Рис. 28. Схеми зігнутостей ДНК згідно моделей «злиття» (А) та «клин» (Б).

Зігнутості відбуваються лише у **бік малої борозенки ДНК**, що супроводжується стисканням та закриттям останньої. У дослідженнях на ДНК кінетопластів виявлено велику кількість А-шляхів у вигляді **повторів по 5-7 пар основ**. Як правило, найбільш вираженою зігнутість хеліксу була у тих ділянках, де послідовність 5'-AAAAAA за частотою виникнення точно співпадала з хеліксним повтором, тобто, виявлялася з

періодичністю 10-11 пар основ. На цих ділянках зігнутість хеліксу варіювала від 17 до 21⁰. Прикладом подібної послідовності може слугувати такий фрагмент:

5'-.....ССАААААТGTСААААААТAGGСААААААТGССАААААТ.....-3'

Інші послідовності, які потенційно здатні формувати згини хеліксу, представлені у табл. 10.

Таблиця 10. Послідовності дуплексних ділянок ДНК, що формують зігнутості

Послідовність	Номер у базі PDB*	Номер у базі NDB**
d(CGСААААААAGCG)	1D98	BDL006
d(CGСААААААТGCG)	1BDN	BDL015
d(GСААААТТТТGС)	1RVH	-
d(CGТТТТТААААСG)	1RVI	-
d(GGСАААААСGG)	1NEV	-

* - PDB – Protein Data Bank. ** - NDB – Nucleotide Data Bank.

Таким чином, виявлений поліморфізм вторинної структури ДНК у полімерних нитках може слугувати індикатором гнучкості самої молекули, яка пояснюється широкою різноманітністю конформаційних варіантів фосфатного кістяка, основ та цукрів у складі ДНК, а також гнучкістю пар основ. Це призводить до існування структурно-різних, але енергетично-еквівалентних форм ДНК, які є важливими для функціонування та біологічної активності останньої.

РОЗДІЛ 3. Фізико-хімічні властивості ДНК

У даному розділі розглядаються основні фізико-хімічні властивості ДНК, як то варіабельність вмісту нуклеотидів, оптичне поглинання, особливості денатурації та ренатурації ДНК, тощо.

3.1. Варіабельність нуклеотидного складу

Хоча, як уже відмічалось, **співвідношення пар G-C та A-T** у кожному виді організмів є сталим, воно відрізняється значною варіабельністю у різних груп організмів. Мірою такої варіабельності, як правило, вважають вміст пар G-C. Даний параметр у відсотковому вираженні від загального вмісту пар геному коливається **від 22 до 73% (табл. 11)**. Оскільки пари G-C є більш стабільними, ніж пари A-T, цей показник використовують також як міру загальної стабільності геному. Від нього також прямо залежать інші фізико-хімічні властивості ДНК, як то, температура плавлення, швидкість денатурації, тощо.

Таблиця 11. Вміст пар G-C у геномах з різних джерел, %

Джерело геному	Вміст пар G-C
Слизовик роду Dictyostelium	22
Бактерія Streptococcus pyogenes	34
Вірус роду Vaccinia	36
Бактерія Bacillus cereus	37
Бактерія Bacillus megaterium	38
Бактерія Hemophilus influenzae	39
Дріжджі Saccharomyces cerevisiae	39
Тимус теляти	40
Печінка щура	40
Сперматозоїд бика	41

Бактерія <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
Зерно пшениці	43
Печінка курки	43
Селезінка миші	44
Сперматозоїд лосося	44
Бактерія <i>Bacillus subtilis</i>	44
Бактеріофаг T1	46
Бактерія <i>Escherichia coli</i>	51
Бактеріофаг T7	51
Бактеріофаг T3	53
Грибок <i>Neurospora crassa</i>	54
Бактерія <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Бактерія <i>Sarcina lutea</i>	72
Бактерія <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	72
Вірус <i>Herpes simplex</i>	72
Бактерія <i>Mycobacterium phlei</i>	73

Варто відмітити, що вміст пар Г-Ц є відображенням більш раннього параметра – **коефіцієнта специфічності**. Це показник був розрахований Чаргаффом у 1950 році і визначається як співвідношення кількості пар А-Т до пар Г – Ц. Визначено, що у **рослин** він становить **0,5 – 1,2**, у **тварин** складає **0,4 – 0,95**, а **бактерій** коливається у найбільш широкому діапазоні - від **0,5 до 2,7**.

3.2. Денатурація та оптичне поглинання ДНК

У випадку нагрівання молекул ДНК нековалентні сили, що тримають разом обидва ланцюги - водневі зв'язки та гідрофобні стекінг-взаємодії - послаблюються і

розриваються. При цьому відбувається розходження ланцюгів, що відомо як **денатурація ДНК**. При цьому ковалентні зв'язки у молекулах залишаються інтактними, тобто, процес денатурації до певної межі є зворотнім. Основним чинником денатурації є нагрівання, звідси пішла інша назва денатурації - **плавлення**. Температура, за якої розходиться рівно половина довжини ланцюга, називається **температурою або точкою плавлення (melting point)** і позначається T_m (рис. 29).

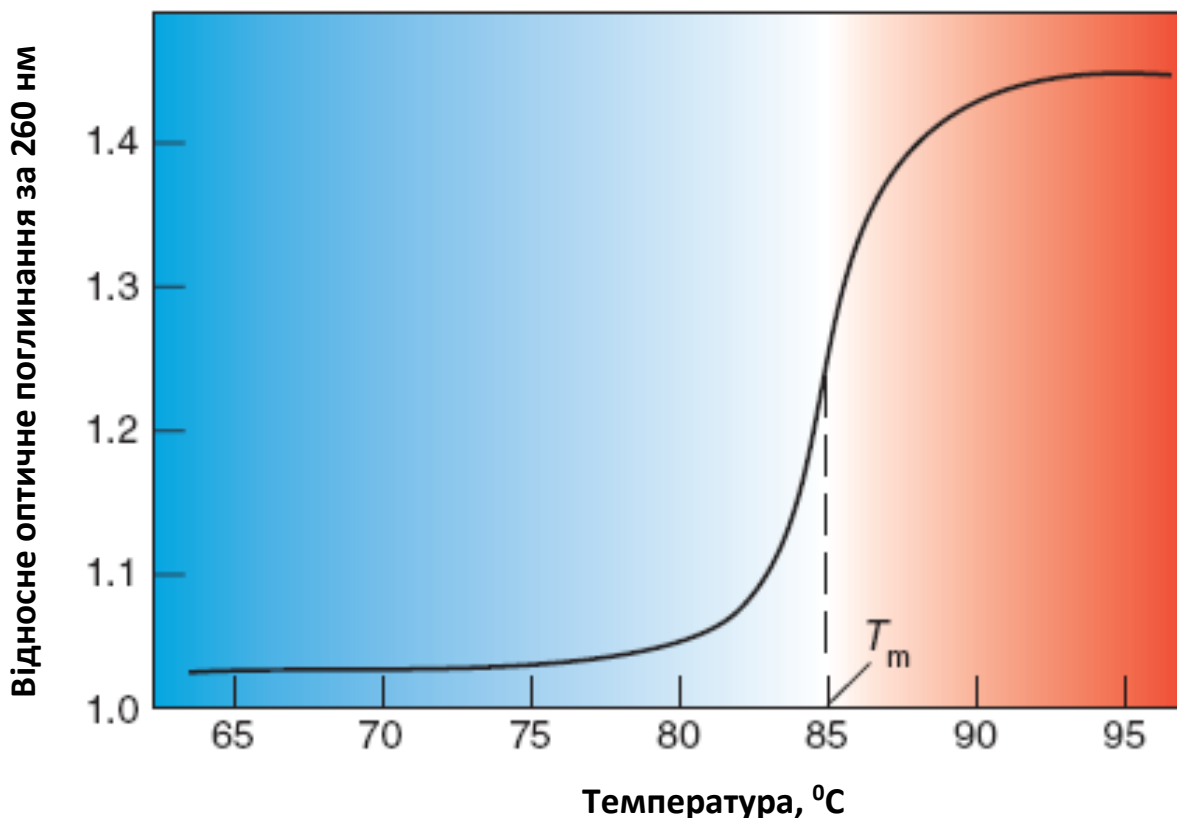


Рис. 29. Крива плавлення ДНК з бактерії роду *Streptococcus*.

Як видно з рисунку, ступінь денатурації (розходження ланцюгів) в молекулі ДНК можна якісно і кількісно визначити за **зміною поглинання розчину ДНК за довжини хвилі 260 нм**. Явище збільшення оптичного поглинання ДНК за умови нагрівання або дії іншого денатуруючого чинника, називається **гіперхромним ефектом або гіперхромізмом**. Фізичний зміст гіперхромізму полягає у наступному. За умов розташування полінуклеотидних ланцюгів вигляді хеліксу пари основ знаходяться всередині молекули і саме тому стерично екрануються, що призводить до зменшення поглинання ними світла. Коли, внаслідок денатурації, відбувається розділення двох ланцюгів, оптичне поглинання зростає на 30-40%, що може бути використане у якості індикатора ступеню інтактності ДНК під час плавлення. Цим можна пояснити той факт,

що, в цілому, одноланцюговий полінуклеотид поглинає більше оптичної енергії, ніж двохланцюговий (рис. 30, А).

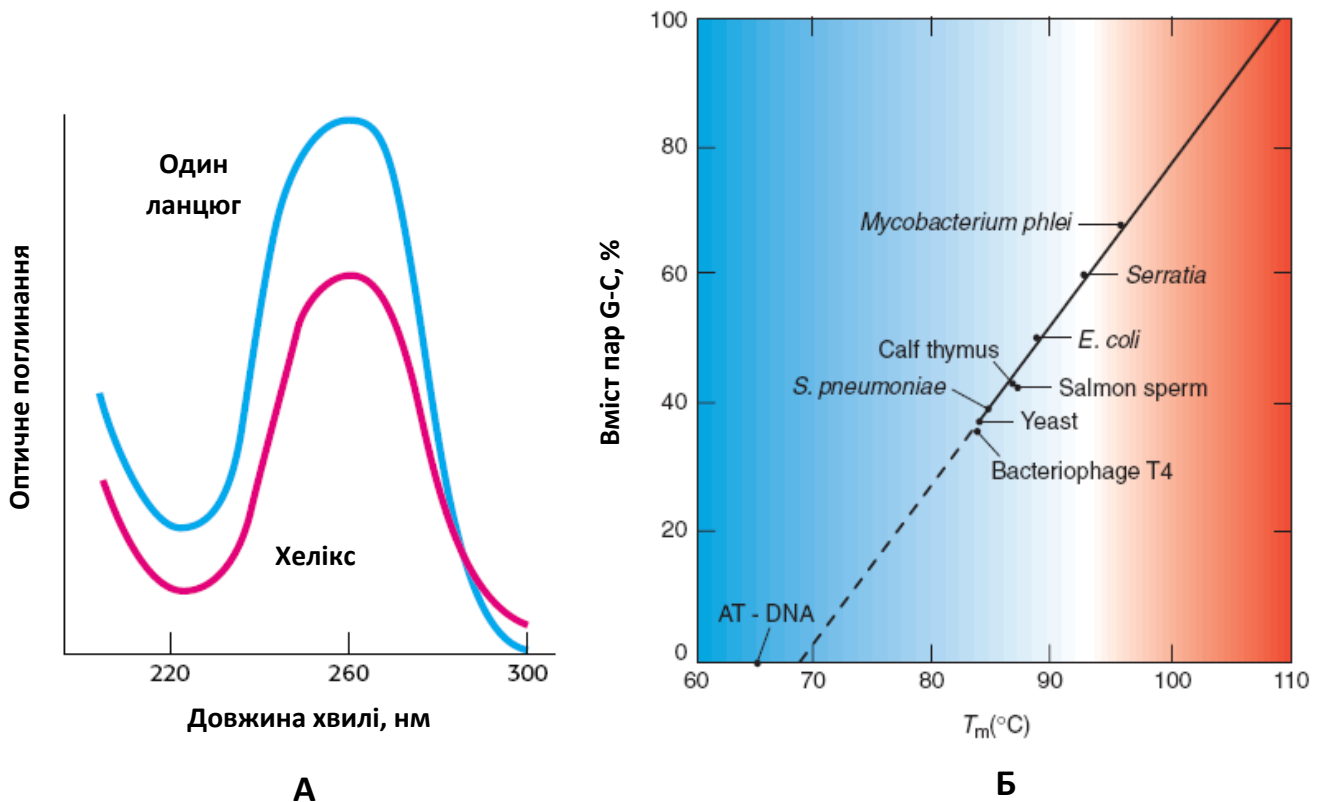


Рис. 30. Спектр поглинання одноланцюгової та двохланцюгової ДНК (А) та залежність температури плавлення ДНК від вмісту пар Г-Ц низки організмів (Б).

Вміст пар G-C в ДНК має вплив на показник T_m , а саме існує пряма залежність – чим вищим є вміст цих пар, тим вищим є значення температури плавлення. Це відбувається тому, що для розриву трьох водневих зв'язків між гуаніном та цитозином потрібно приблизно на 50% більше теплової енергії важче, ніж у випадку аденіну і тиміну. Тому збагачена парами G-C ДНК є більш стійкою до нагрівання і має вищу температуру плавлення (рис. 30, Б).

Іншими факторами, які здатні індукувати денатурацію ДНК відносять, наприклад, підвищення рН або зниження йонної сили середовища, дію органічних розчинників, такі як ДМСО або формаїд, вплив розведених лугів, концентрованих розчинів етанолу, сечовини, тощо. Дані фактори також знижують температуру плавлення.

Вміст пар G-C також впливає і на в'язкість розчинів ДНК, збільшуючи її, як видно з графіку на рис. 31.

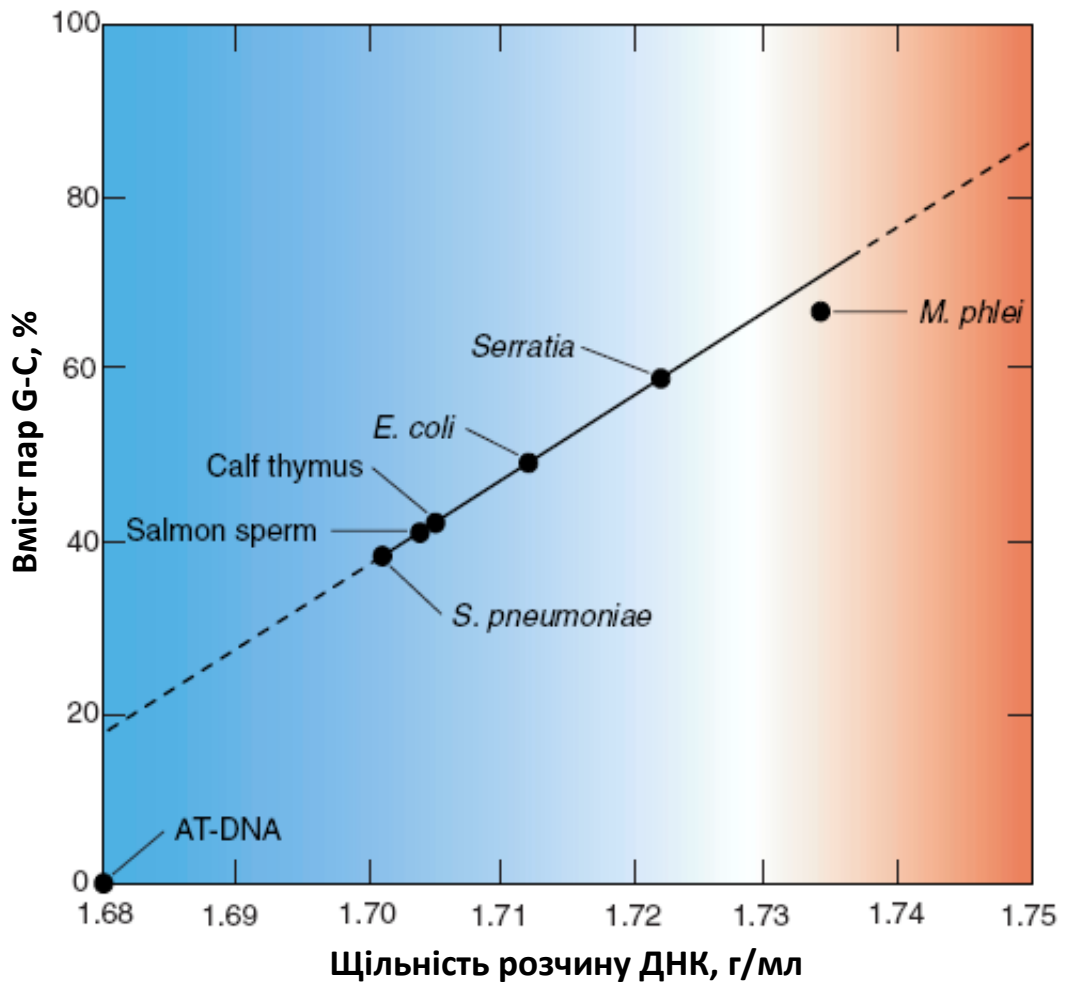


Рис. 31. Залежність в'язкості розчину ДНК від вмісту пар G-C.

3.3. Явище ренатурації ДНК та його особливості

За певних умов розділені денатурацією ланцюги ДНК можуть знову самопоєднатися. Такий процес відомий під назвою ренатурації або відпалу. Найбільш важливими факторами, які впливають на ефективність і швидкість ренатурації, є:

- 1) **Температура розчину** – найкращою для ренатурації вважається температура на **25 °C** нижче точки T_m . За даних умов денатурація ще не відбувається, в той час як стимулюється швидка дифузія ланцюгів ДНК та послаблення тимчасових зв'язків між парами основ, які не є комплементарними. З цієї причини, швидке охолодження розчину одразу після нагрівання та денатурації миттєво припиняє ренатурацію. Така процедура використовується у біохімічній практиці - нагріті проби з денатурованою ДНК занурюють у лід, тобто, відбувається так зване «гасіння» ДНК.
- 2) **Концентрація ДНК** - у певних межах, чим вищою вона є, тим з більшою швидкістю буде відбуватися процес ренатурації.

3) **Час** – збільшення цього показника підвищує ймовірність ефективної ренатурації більшого числа молекул ДНК.

Для визначення ефективності та швидкості ренатурації ДНК дослідниками Бріттеном та Конне було започатковано спеціальний параметр – C_0t , що враховує останні два з вищенаведених факторів. По суті, C_0t являє собою **добуток концентрації ДНК (C_0) у молях нуклеотидів на літр, та часу (t) у секундах**. Таким чином, розмірність цього параметру становить моль/л × сек. За умов незмінності всіх інших факторів середовища цей параметр є основним для визначення швидкості ренатурації комплементарних ланцюгів ДНК після їх денатурації, для цього будуть спеціальні криві ренатурації на основі параметра C_0t (рис. 32).

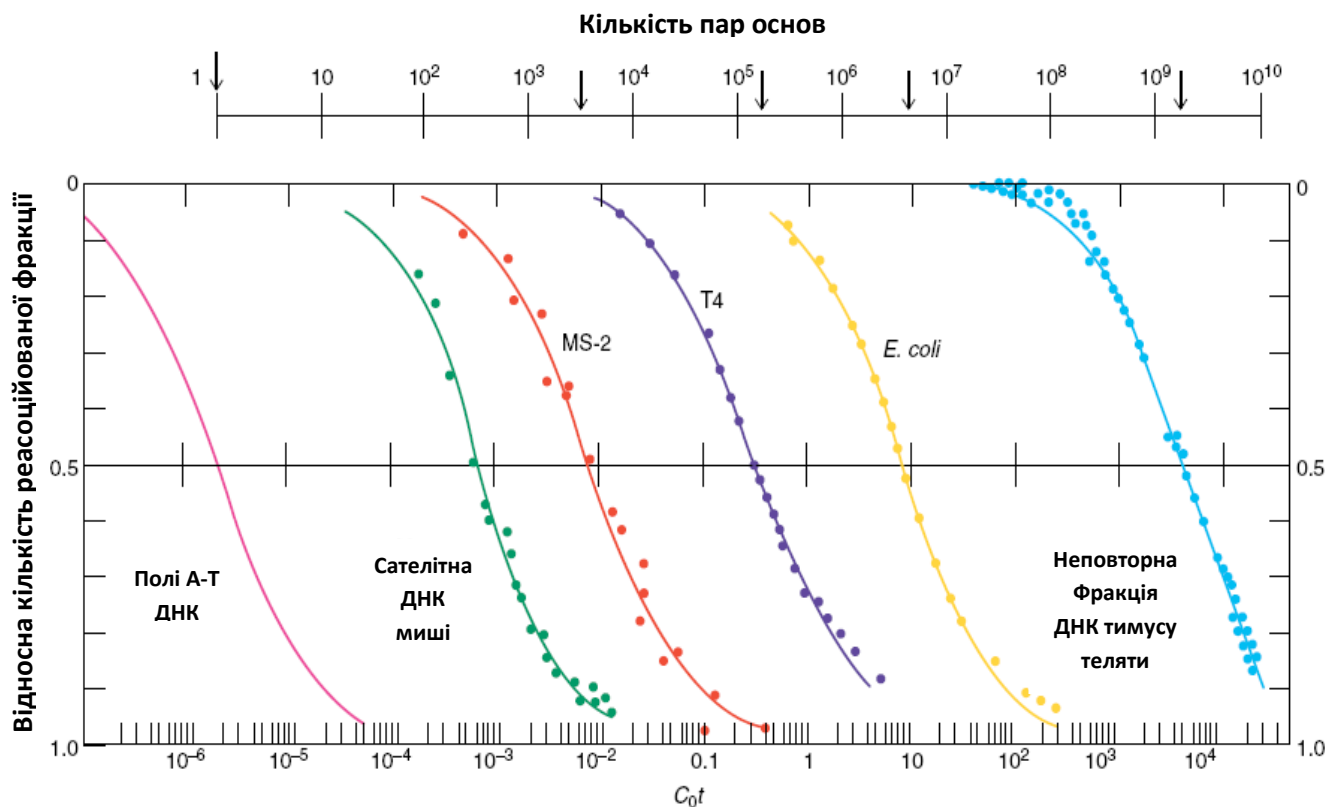


Рис. 32. Криві ренатурації різних ділянок ДНК.

Користуючись графіком, можна відмітити, що кількість реасоційованої фракції зростає зверху вниз, а, отже, падіння кожної з кривих показує збільшення рівня реасоціаційованої фракції ДНК. Поглянемо на крайню ліву криву, яка репрезентує собою синтетичну полі(А-Т)ДНК (рис. 32). Оскільки такий полінуклеотид через надзвичайну простоту структури (ідентичність пар у хеліксі) характеризується найвищим ступенем комплементарності, його ренатурація може відбутись, починаючи з будь-якого місця молекули, тому така ДНК матиме низьке значення C_0t , тобто реасоціює найшвидше. Ближче до правої сторони (рис. 32) розташована крива ренатурації ДНК бактеріофага Т4. Така молекула є складнішою за будовою, ніж полі(А-

T)-послідовність, тому має вище значення C_0t і ренатуруватиме повільніше. Нарешті, неповторювана фракція ДНК з тимусу теляти (**крайня права крива на рис. 32**), найскладнішу, дуже варіабельну структуру, до того ж є найдовшими серед представлених на графіку молекул (2×10^9 пар основ у гаплоїдному наборі хромосом). Відповідно, C_0t для такої молекули є найбільшим і перевищує відповідне значення ДНК бактеріофагу T4 вищим приблизно на чотири порядки (**рис. 32**). Іншими словами, для того, щоб пришвидшити ренатурацію ДНК тимусу теляти до характерної для ДНК T4, потрібно збільшити концентрацію першої у 10000 разів. Таким чином, існує пряма лінійна залежність між ефективною складністю (варіабельністю) і розміром структури ДНК з одного боку, та величиною показника C_0t – з іншого. Для зручності порівняння розрахунків часто використовують параметр $C_0t_{1/2}$, тобто C_0t , за якого рівно половина ланцюгів денатурованої ДНК поєднується. Тому, в цілому, чим складнішою і варіабельнішою є послідовність полідезоксирибонуклеотидів, тим вищим є $C_0t_{1/2}$. Тому, як правило, складні і довгі молекули ДНК мають багатоступінчасті криві ренатурації (**рис. 33**).

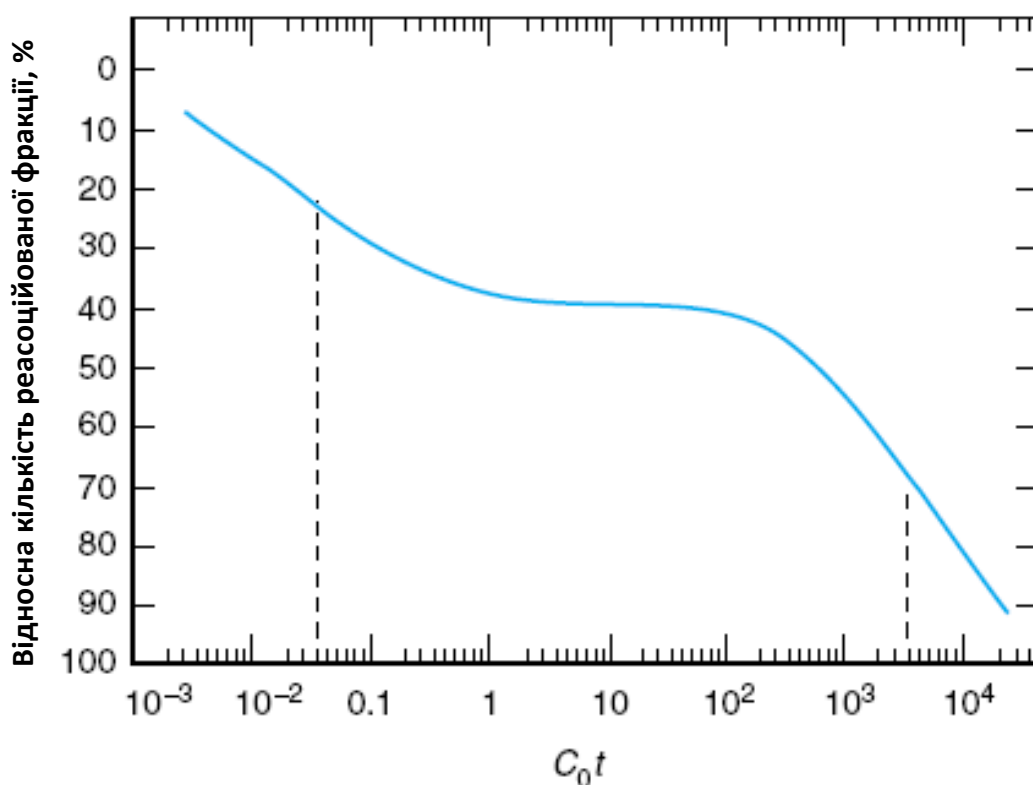


Рис. 33. Крива ренатурації ДНК гаплоїдного геному миші.

Дійсно, відомо, що принаймні половина ДНК геному більшості вищих еукаріот, незалежно від розміру (**табл. 12**) є малоповторюваною або взагалі унікальною. Так, серед ДНК хромосом миші близько 40% має повтори, у кількості від 10^2 до 10^6 на гаплоїдний геном. Ще 10% від ДНК гаплоїдного набору припадає на

високоповторювані ділянки, в яких повтори зустрічаються з частотою 10^6 разів і вище на геном (сателітна ДНК миші на **рис. 32**). Решта ДНК є унікальною. Таким чином, у масштабі гаплоїдного геному спочатку повинна ренатурувати високоповторювана фракція (перший етап, найнижче значення C_{0t}), потім - помірно-повторювана (другий етап), і, нарешті, третім етапом йде реасоціацію неповторюваної унікальної ДНК (**рис. 33**). Еукаріотична ДНК, розташована в генах білків, є, як правило, унікальною, гени рибосомальної РНК – середньоповторювані, а центромери хромосом є високоповторюваними.

Таблиця 12. Параметри гаплоїдних геномів з різних джерел

Джерело геному	Молекулярна маса, Да	Кількість пар основ	Фізична довжина, м
Субклітинні системи			
Вірус SV40	$3,5 \times 10^6$	5226	$1,7 \times 10^{-6}$
Бактеріофаг фХ174	$3,2 \times 10^6$	5386	$1,8 \times 10^{-6}$
Бактеріофаг λ	$3,3 \times 10^6$	5×10^4	$1,3 \times 10^{-5}$
Бактеріофаг Т2 або Т4	$1,3 \times 10^8$	2×10^5	5×10^{-5}
Мітохондрії ссавців	$9,5 \times 10^6$	16596	5×10^{-6}
Прокаріоти			
<i>Haemophilus influenzae</i>	$1,2 \times 10^9$	$1,83 \times 10^6$	$6,2 \times 10^{-4}$
<i>Escherichia coli</i>	$3,1 \times 10^9$	$4,65 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-3}$
<i>Salmonella typhimurium</i>	8×10^9	$1,1 \times 10^7$	$3,8 \times 10^{-3}$
Еукаріоти			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$7,9 \times 10^9$	$1,2 \times 10^7$	$4,1 \times 10^{-3}$
<i>Neurospora crassa</i>	$\sim 1,9 \times 10^{10}$	$\sim 2,7 \times 10^7$	$\sim 9,2 \times 10^{-3}$
<i>Drosophila melanogaster</i>	$\sim 1,2 \times 10^{11}$	$\sim 1,8 \times 10^8$	$\sim 0,06$
<i>Rana pipiens</i> (жаба)	$\sim 1,4 \times 10^{13}$	$\sim 2,3 \times 10^{10}$	$\sim 7,7$

Mus musculus (миша)	$\sim 1,5 \times 10^{12}$	$\sim 2,2 \times 10^9$	$\sim 0,75$
Homo sapiens	$\sim 2,3 \times 10^{12}$	$\sim 3,5 \times 10^9$	$\sim 1,2$
Zea mays (кукурудза)	$\sim 4,4 \times 10^{12}$	$\sim 6,6 \times 10^9$	$\sim 2,2$
Lilium longiflorum (лілія)	$\sim 2 \times 10^{14}$	$\sim 3 \times 10^{11}$	~ 100

РОЗДІЛ 4. Форми конденсації ДНК in vitro та конденсація генного матеріалу бактеріофагів та бактерій

У даному розділі розглядаються форми конденсованої ДНК in vitro для вивчення механізмів конденсації нуклеїнових кислот у живому організмі, фізичний зміст факторів формування, а також методи отримання таких компактних структур. Також описуються види компактизації ДНК генетичного матеріалу вірусів та бактерій, як приклади найбільш простих типів організації геному.

4.1. Поняття конденсації ДНК in vitro

Всі вищі форми структури ДНК пов'язані з конденсацією її молекул. Хоча у виділеному стані нуклеїнові кислоти існують у розчині у вигляді витягнутих ниток, і майже всі методи вивчення таких структур потребують такої форми ДНК, у біологічних системах дані полімери присутні як значно компактизовані частки. Це, в основному пов'язано з економією простору та принципами організації регуляції функціонування цих молекул. Взагалі під компактизацією або конденсацією розуміють зменшення об'єму, який займає молекула ДНК у розчині у вигляді подовженої спіралізованої структури, що є корисним у випадку запаковування великої кількості генів у складі хромосом у ядро, беручи до уваги його обмежений простір. Для вивчення механізмів та особливостей компактизації ДНК використовують різні моделі in vitro із застосуванням агентів, які індукують або сприяють конденсації.

4.2. Конденсуючі агенти

Основними факторами конденсації, які лежать в основі механізму дії компактизуючих агентів, є наступні:

- **Зменшення або нейтралізація сил відштовхування** між негативно зарядженими сегментами ДНК - наприклад, компенсація зарядів на фосфатних групах за допомогою полікатионів,
- **Зміна ступеня взаємодій між ДНК та розчинником** - наприклад, дія етанолу або інших спиртів, які є гіршим розчинником ДНК, ніж вода, або введення ще одного, більш гігроскопічного, полімеру,
- **Індукція локальних зігнутих та скривлень структури ДНК** – наприклад, за допомогою полівалентних катионів.

Перше місце серед конденсуючих агентів за частотою застосування займають полівалентні катіони. Серед них найчастіше використовують **неорганічні катіони**, такі як $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, поліаміни **спермін** та **спермідин** (рис. 34, А та Б), катіонні поліпептиди – **поліаргінін**, **полілізін** (рис. 34, В), а також позитивно заряджені білки, такі як **гістони Н1 та Н5**.

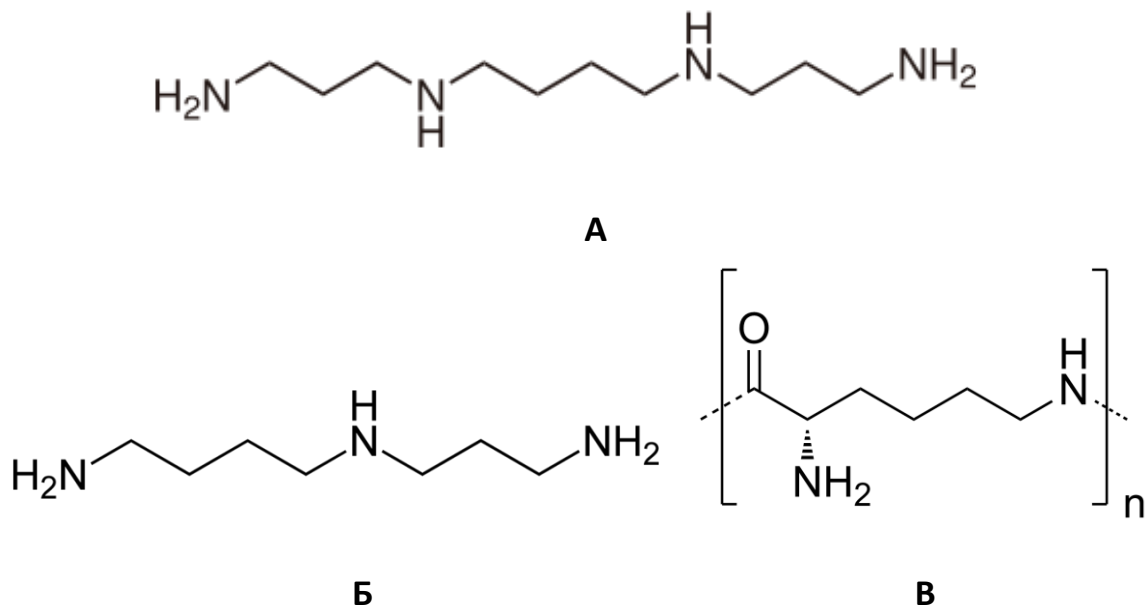


Рис. 34. Полікатіони (пояснення у тексті).

Було виявлено, що полівалентні катіони за нормальних умов не здатні повністю індукувати конденсацію ДНК у розчинах, для цього можна, наприклад, підвищити температуру та розчинити нуклеїнову кислоту у спирті. До речі, **спиртові розчини** дуже часто використовують як середовище конденсації ДНК *in vitro*. Відомо, що **етанол** у 80%-ій концентрації застосовується осадження нуклеїнових кислот під час їх отримання і пурифікації. Для конденсації, як правило, спирт розводять у три-чотири рази. Наприклад, за 20%-ої концентрації етанолу та за умови додавання $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ конденсація відбувається швидко і ефективно. Альтернативою у даному відношенні також можуть бути **метанол** або **ізопропанол**.

Серед нейтральних синтетичних полімерів, як чинників конденсації, варто відмітити **поліетиленгліколь** (рис. 35, А), який використовують за високої йонної сили розчину. Отримана таким чином конденсована структура має назву **ψ-ДНК (psi, Polymer-and-Salt-Induced)**. Ще одним фактором компактизації ДНК можуть виступати **аніонні синтетичні полімери**, наприклад, **поліаспартат** (рис. 35, Б), **поліглутамат**, а також **аніонні поліпептиди** з капсиду бактеріофагу Т4.

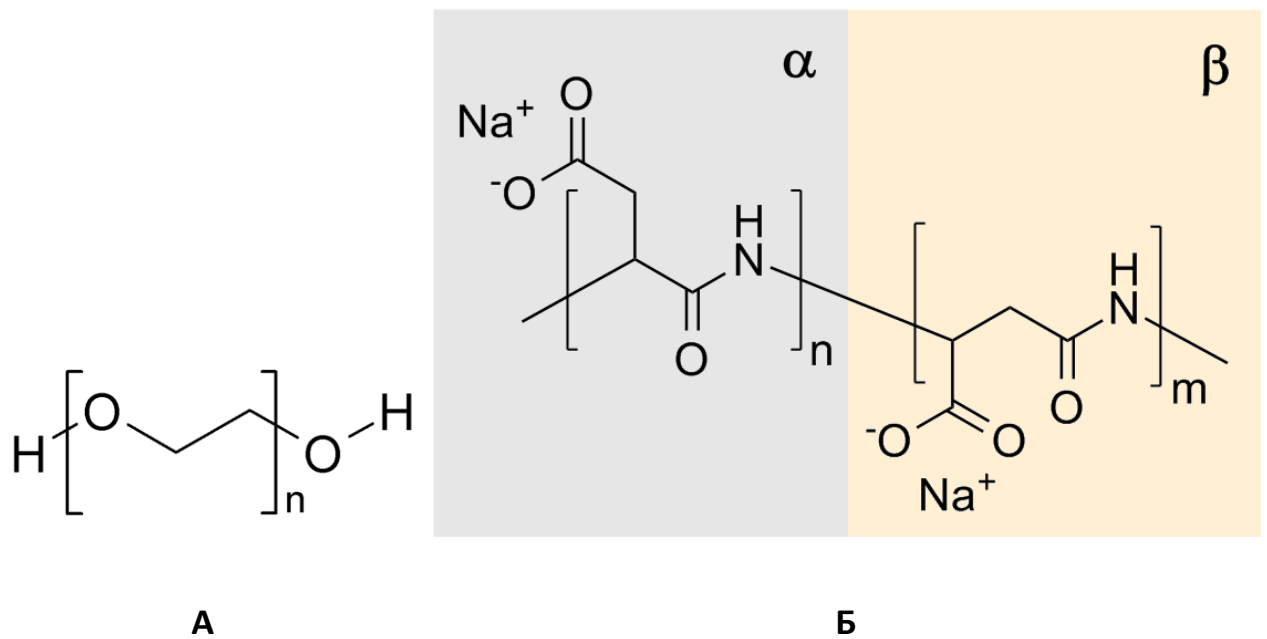


Рис. 35. Структура поліетиленгліколю (А) та поліглутамату (Б).

Нарешті, ще одним класом кондесуючих агентів є катіонні ліпосоми. У даному випадку у процесі конденсації відбувається вбудовування молекули ДНК у ліпосому, яку потім можна використати для трансфекції еукаріотичних клітин. Основними перевагами у даному випадку є захист конденсованої ДНК від дії нуклеаз, можливість мігрувати через невеликі отвори через малий розмір таких частинок, а також збільшення проникності клітинних мембран по відношенню до комплексу завдяки ліпідній оболонці ліпосоми. Існують також більш складні системи конденсації з використанням, наприклад, позитивно заряджених міцел, аніонних синтетичних поліпептидів та одониткових молекул РНК. У даному випадку ДНК неповністю інтегрується в міцелу та має вигляд компактних хоральних (Choral) структур. Сформована міцела має вигляд витягнутого циліндра, можливим є також варіант сферичних кластерів, групи яких стабілізовано аніонними полімерами. У випадку сумісного застосування такі сфери локалізуються на кінцях циліндра, що запобігає можливій елонгації міцел ДНК.

4.3. Види конденсованих структур ДНК, отримані *in vitro*

Розрізняють наступні **види конденсованої *in vitro* ДНК:**

- 1) Тороїди (toroids, donuts)** – утворюються шляхом додавання поліамінів або неорганічних полікатіонів у розведений розчин ДНК (менше 1мкг/мл). Являють собою утвори у вигляді замкнених «бубликів» або «пончиків», що

дуже нагадують агрегати ДНК, після м'якого лізису капсиду бактеріофагу Т2 або Т7. На сьогодні отримано тороїди ДНК Т7 та ДНК тимусу теляти.

- 2) **Циліндри (cylinders)** – часто виявляються разом з тороїдами, однак для їх утворення потрібне додавання 25-35%-го етанолу. Зі збільшенням концентрації етанолу циліндри «товщають» та «коротшають».
- 3) **Нитки та пластинки (threads and plates)** – як і циліндри, виникають зі збільшенням концентрації спиртів у середовищі інкубації. Наприклад, осадження коротких фрагментів ДНК сперми лосося 35%-им розчином етанолу дає гексагональні пластинки товщиною близько 150 А. Комбінація етанолу та йонів амонійного кобальту перетворює ДНК на сітку багатоланцюгових ниток, причому В-форма переходить А-ДНК.
- 4) **Ψ-ДНК (psi-DNA, Polimer and Salt induced)** – формується за умови високої концентрації солей та наявності нейтральних або аніонних синтетичних полімерів у середовищі інкубації, звідси й назва. Утворення цієї форми проходить з порушенням регулярної структури ДНК, яке викликається силами «відштовхування» між полімером та нуклеїною кислотою. Йонна сила потрібна для часткової нейтралізації такого «відштовхування».
- 5) **Пара- та псевдокристали (Liquid Pseudocrystals)** – утворюються за високих концентрацій ДНК. У даному випадку паралельні пучки циліндрів утворюють високомолекулярні подовжені нитки, що відбувається шляхом агрегації за присутності, наприклад, спермідину. Якщо ДНК є короткою та по можливості лінійною, допустимі концентрації можуть варіювати від 160 до 290 мг/мл. Саме ці псевдокристали були використані для отримання перших дифракційних картин ДНК у 1953 році.

Взагалі, розміри розглянутих форм конденсованої ДНК є пропорційними до молекулярної ваги однієї або декількох молекул. Наприклад, високомолекулярні тороїди з бактеріофагу Т7, як правило, мають у основі лише одну молекулу ДНК, в той час як у частках, сформованих з ДНК тимусу теляти або плазмід рUC) може знаходитися одразу декілька молекул, зі збереженням майже ідентичних розмірів часток у обох випадках. Типовий тороїд має внутрішній радіус біля 15-20 нм та зовнішній – від 35 до 50, що відповідає В-ДНК довжиною приблизно 40 тис. пар основ. Циліндри, як правило, є довшими – в середньому 180 нм - але не товщими (30 нм) структурами.

4.4. Сили та чинники конденсації ДНК

На прикладі **ДНК бактеріофагу фагу Т7** було підраховано, що **конденсація in vitro** зменшує об'єм до **10⁴ разів**. Така значна економія простору можлива завдяки декільком механізмам. **По-перше**, це утворення зшивок. Було показано, що ДНК під дією кондесуючих агентів у розчині високої йонної сили розташовується таким чином,

що відстань між найближчими ланцюгами сприяє формуванню зшивок, які, до того ж, допомагають стабілізувати особливо компактні типи конденсації. **По-друге**, свою роль має здійснення поступових змін конформації та взаєморозташування окремих компонентів гнучкого полімера, яким є ДНК у розчині з високою йонною силою. Даний феномен описується теоретично за постулатами полімерної теорії змішаної ентропії, за якою жорсткі полімерні структури за несприятливих умов здатні до більш раптових та кардинальних змін конформації, ніж гнучкі. Таким чином, поступова зміна структури ДНК дає достатньо часу для конденсації молекул без їх руйнування. **По-третє**, утворення зігнутостей, тобто, формування локальних зігнутих ділянок ДНК, загалом сприяє конденсації молекул. **По-четверте**, під час конденсації утворюються додаткові йонні взаємодії, що призводить до часткової нейтралізації зарядів ДНК полікатионами. Це, у свою чергу, зменшує сили «відштовхування» між сусідніми сегментами ДНК. Причому встановлено, що для щільної конденсації як мінімум 90% зарядів молекул ДНК повинні бути нейтралізовані. До того ж використання декількох типів мультивалентних катіонів полегшує формування локальних зігнутостей, а, отже, сприяє конденсації. Ще одним фактором вдалої компактизації ДНК є регуляція **сил гідратації**. В конденсуючих умовах завдяки використанню спиртів та солей відбувається перерозподіл молекул води у гідратній оболонці нуклеїнової кислоти. Цей процес призводить до переорієнтації водневих зв'язків та змін сили гідратації – загально відомого у сфері фізики біополімерів параметра. Вважається, що коливання сили гідратації індукується в основному за рахунок додаткової поляризації води за допомогою конденсуючих агентів та заряджених груп самої ДНК, що за певних умов сприяє процесу конденсації. Нарешті, у даному процесі значну роль відіграють **переходи між формами вторинних структур ДНК**. Наприклад, виявлено, що Z-форма ДНК легше конденсується у порівнянні з іншими варіантами вторинної структури. Тому припускається, що за певних умов певні послідовності в ході конденсації *in vitro* приймають конформацію Z-форми ДНК.

4.5. Особливості конденсації геному ДНК-вмісних бактеріофагів

Насьогодні існує припущення, що майже всі бактеріофаги з дволанцюговою ДНК використовують ідентичний механізм конденсації нуклеїнової кислоти для інтеграції та розміщення її у капсиді. Встановлено, що після вбудовування капсид перетворюється на дозрілу «голівку», яка морфологічно та хімічно відрізняється від тої, що поки що не містить ДНК. Так, незрілі капсиди мають у своєму складі від 5 до 30 копій так званих **білків скаффолду або «збирання»**, які втрачаються у повноцінних бактеріофагах. Ці білки локалізуються у порталному вертексі біля основи «хвоста» капсиду, і беруть участь у ініціації «збирання» та дозрівання «голівки», а також контролі конденсації та «пакування» ДНК у капсид. Для відтворення конденсації геному бактеріофага *in vitro*, безклітинна система повинна містити незрілі «голівки», молекули ДНК з потрібними послідовностями, парні копії так званих «аксесорних»

білків, що кодуються фагом та розпізнають сигнальні послідовності ДНК, а також молекули поліамінів для конденсації та АТФ для енергетичної підтримки процесу. Щільність «пакування» ДНК у капсид, як правило, є гомогенною, виключеннями можна вважати бактеріофаги Т4 (глікозильовані залишки гідроксиметилцитозину в ДНК) та λ (мутантні делеції). Підраховано, що конденсована у «голівці» вірусу ДНК на один грам своєї ваги має приблизно 1,5 грами води. Після закінчення процесу конденсації спеціальний фермент порталного вертексу, так звана терміназа або термінальна ендонуклеаза, розщеплює ДНК у наближеній до виходу з капсиду лінійній ділянці, що індукує додаткове ущільнення «пакування». Дослідження показали, що ДНК у капсиді бактеріофагу зберігає В-форму, незважаючи на щільне «пакування» та сили електростатичного «відштовхування» між близько розташованими фосфатами.

На сьогодні запропоновано три основні види «пакування» ДНК всередину капсиду (рис. 36):

- 1) модель «плоду батата» або вертикальної «катушки» (Ball of Yam),
- 2) модель «шпульки» або горизонтальної «катушки» (Spool),
- 3) спіральна модель (Spiral Fold).

Загальною особливістю для цих моделей є те, що обидва кінці молекули ДНК у ході всього процесу конденсації є наближеними один до одного у зоні порталного вертексу.

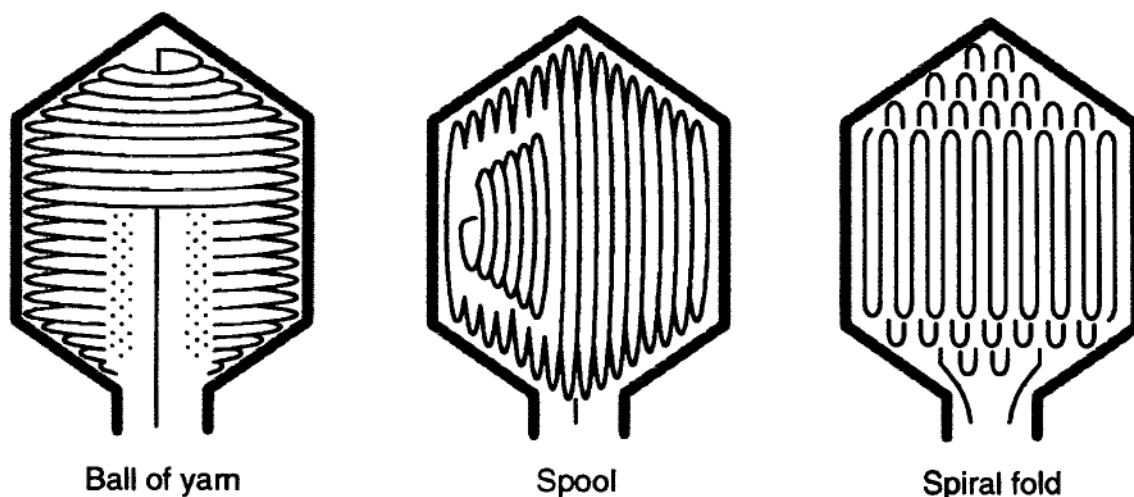


Рис. 36. Види пакування ДНК у капсид бактеріофагів

Модель «плоду батата» була найпершою із запропонованих, за нею «пакування» проходить шляхом поступого «накручування» ДНК навколо повздовжньої вісі капсиду, формуючи «катушку» навколо вертикальної вісі з відносною гомогенністю витків. Модель шпульки постулює «закручування» ДНК у вигляді горизонтальної

«катушки» навколо поперечної вісі «голівки», тобто, перпендикулярно по відношенню до першого способу (рис. 36). У даному випадку, на відміну від моделі «плоду батата», на кінцях молекули ДНК спостерігається менше витків, ніж у її центральному регіоні, тобто присутня негомогенність конденсації. Нарешті, модель спірального згортання вперше показана для бактеріофагу T4, за нею нитки ДНК йдуть паралельно з довгою віссю фагової частки. Причому лінійні ділянки молекули чергуються з різкими поворотами майже на 360° знизу та та зверху капсиду, а самі петлі розташовані радіально і пристінково вздовж довгої вісі (рис. 35).

Запроповано також **два різних механізми «пакування» ДНК у капсид**. Результатом першого з них, **тороїдного**, є «пакування» за обома видами «катушок». Другий, який відповідає моделі спірального згортання ДНК, називається **пристінковим**.

Функціонування **тороїдного механізму** на прикладі більш вивченої моделі «плоду батата» починається з того, що «ведучий» кінець ДНК контактує з порталним вертексом, після чого ДНК входить у капсид вздовж його довгої вісі і починає закручуватись, формуючи спочатку дальній кінець вертикальної «катушки». У процесі закручування утворюються рівномірно розподілені петлі проміжної щільності, які будуть розташовуватись всередині шпульки. Далі відбувається формування та ущільнення петель початкової і прикінцевої ділянок ДНК, з одночасним їх наближенням до ядра шпульки у районах вісі та на периферії. Результатом є формування супервитків та однонаправлених петель. Менш вивчений **механізм спірального згортання**, як вважають, полягає у поступовому пристінковому антипаралельному накладанні сусідніх сегментів ДНК, які формують різкі зігнутості зверху і знизу капсиду, але не досягають повного оберту на 360° . Завдяки такій зміні напрямку ланцюгів і формується спіральне розташування ДНК, конденсованої у капсиді.

4.6. Конденсація геному бактерій

Структура конденсованої ДНК нуклеоїду бактерій вивчена неповністю. Як правило, виділяють **два загальних рівні організації нуклеоїду**:

- 1) Ділянки ДНК довжиною від 60 до 120 пар основ, пов'язані з ДНК-зв'язуючими білками та розміщені у вигляді негативних супервитків,
- 2) Високомолекулярний кільцевий комплекс з приблизно 40 хромосомоподібних доменів, кожен з яких є незалежно суперспіралізованим і має довжину близько 100 тис. пар основ.

ДНК нуклеоїду у порівнянні з геномом бактеріофагів або ДНК еукаріот, є **найбільш релаксованою**, оскільки у даному випадку не відбувається регулярної суттєвої компактизації. Причиною цього можуть бути невеликий розмір геному,

відсутність регулярних структурних білків (гістонів), а також потреба у доступності послідовностей ДНК для здійснення швидкої транскрипції.

РОЗДІЛ 5. Особливості будови та функцій РНК

У даному розділі розглядаються сучасні дані про рівні структурної організації та особливості функціонування відомих на сьогодні видів РНК.

5.1. Загальна характеристика рибонуклеїнових кислот

Загалом РНК має набагато більшу варіабельність первинної, вторинної та третинної структур, ніж молекули ДНК, оскільки останні мають у своїй основі подвійні ланцюги, що зменшує їх конформаційну рухливість та різноманітність. До того ж, слугуючи інформаційним банком даних, дезоксирибонуклеїнова кислота значно обмежена у використанні модифікованих основ через високий ризик появи та небажаність мутацій. Особливо великою є кількість варіантів третинної структури РНК, коли як у випадку ДНК такі варіанти обмежуються існуванням лише подвійних, потрійних, або квадр-петель. Варто відмітити, що варіабельність третинної структури РНК багато вчених вважають основою каталітичної активності самими молекулами.

Ідея існування месенджера між ДНК та білком виникла майже одразу після відкриття структури ДНК. Однак, довгий час вивчення у цій області гальмувалося фактом існування подвійних хеліксів РНК у вірусах. **Месенджерна функція** була першою серед усіх виявлених функцій РНК. Існування тРНК також було виявлено відносно рано у історії вивчення НК, як перекладача «мови» ДНК на «мову» білкових молекул. Таким чином була виявлена **адапторна функція** РНК та встановлено існування як мінімум 20 видів тРНК, що відповідало 20 відомим протеїногенним амінокислотам. Хронологічно третьою виявленою функцією РНК, стала **каталітична**, особливо це стосувалося розщеплення РНК та ДНК. Таке розщеплення може бути внутрішньомолекулярним, наприклад, за аутосплайсингу інтронів у дозріванні РНК, або, за більш популярним останнім часом гідролітичним механізмом розщеплення інших молекул РНК, яке пов'язане з феноменом існування так званих **рибозимів (ribozymes)**. Пізніше було виявлено не лише **нуклеазну**, але й **трансферазну функцію** рибозимів. Було також припущено, що саме каталітичні одиниці РНК відігравали важливу роль у передачі генетичного матеріалу до появи еволюційної появи ДНК. Рибозимна активність також виявляється у рибосомі під час формування пептидних зв'язків у синтезі білку. Вона, поряд з визначенням та збереженням структури рибосоми, характерна для рибосомальних РНК (рРНК). Загалом, рибозими виявилися дуже перспективними у плані генної терапії, для розщеплення специфічних послідовностей ДНК, тощо. Ще однією недавно відкритою важливою функцією РНК стало існування так званих **рибосвітців (riboswitch)** – послідовностей РНК, що можуть згортатися певним чином і формувати структури, які відіграють роль молекулярних перемикачів шляхом приєднання до них певних регуляторних молекул. Нарешті,

найбільш незвичним стало відкриття коротких подвійноланцюгових послідовностей РНК довжиною в 20-25 нуклеотидів - **малих інтерферуючих РНК або міРНК**, здатних інгібувати еукаріотичну експресію генів через так званий шлях **інтерференції РНК**. Класичні функції РНК представлені на **рис. 37**.

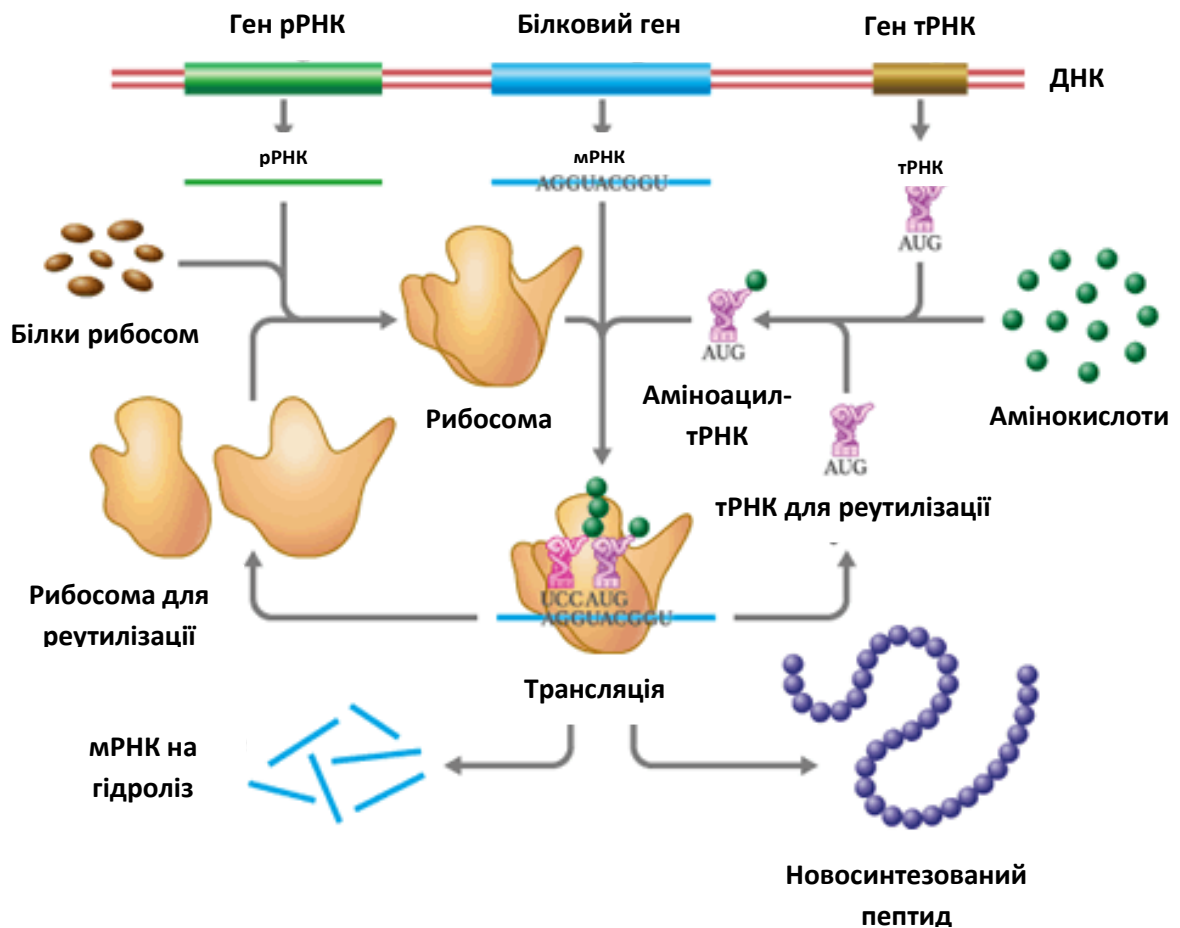


Рис. 37. Класичне тріо функцій молекул РНК.

На сьогодні розрізняють наступні види РНК:

- 1) **мРНК або іРНК** – месенджерна або інформаційна,
- 2) **тРНК** - транспортна,
- 3) **рРНК** - рибосомальна,
- 4) **гяРНК** – гетерогенноядерна (недозріла матрична, пре-мРНК),
- 5) **мцРНК** - мала цитоплазматична,
- 6) **мяРНК** - мала ядерна,
- 7) **мяцРНК** - мала ядерцева,
- 8) **мхРНК** - мітохондріальна,
- 9) **міРНК** - мала інтерферуюча.

Останні 5 типів представленого списку часто об'єднують під загальною назвою - **мікроРНК**.

5.2. Методи отримання та вивчення структури РНК.

Наразі для вивчення структурних аспектів РНК використовується низка чутливих та ефективних методів. Так, **твердофазний хімічний синтез** та очистка застосовується для відтворення коротких послідовностей РНК (15-20 нуклеотидів), за допомогою даного методу отримують декілька міліграм продукту. **Транскрипція in vitro** за допомогою полімерази фага Т7 використовується у випадку потреби у довгих послідовностях. Такий метод, хоча і потребує пуринової послідовності на 5'-кінці для оптимального проходження процесу, застосовується достатньо часто. Далі, стохастичне включення нуклеотидів до 3'-кінця за допомогою полімерази фага Т7 потрібне для отримання випадкових послідовностей з посттрансляційним вирізанням непотрібної ділянки. На сьогодні існують набори реактивів (kits), за допомогою яких можна отримати декілька міліграм РНК довжиною у 100-300 нуклеотидів. Нарешті, широкого застосування набули **кристалізація РНК** та її **рентгеноструктурний аналіз**. До недавнього часу ці методи були доволі складними процедурами до тих пір, поки не були впроваджені методики використанням **рідкої матриці (Liquid Matrix)**, поєднані з комп'ютерними технологіями. Це дозволяє створювати середовища з різними умовами кристалізації, використовуючи відносно невеликі за довжиною зразки РНК. Однак, малі хеліксні РНК зручніше отримувати методами молекулярного заміщення з використанням у якості стартового матеріалу канонічний хелікс РНК.

5.3. Структура та конформації дуплексних ділянок РНК

Загалом, як вже відмічалось, РНК відрізняється від ДНК у **двох хімічних аспектах (рис. 38)**:

- 1) Структурою вуглеводних залишків** – всі форми РНК мають ОН-групу у положенні С2', тобто, містять рибофуранозу,
- 2) Набором піримідинових основ** – замість тиміну присутній урацил, причому, за умови утворення дуплексу, пара А-У має ідентичні з парою А-Т у складі ДНК водневі зв'язки.

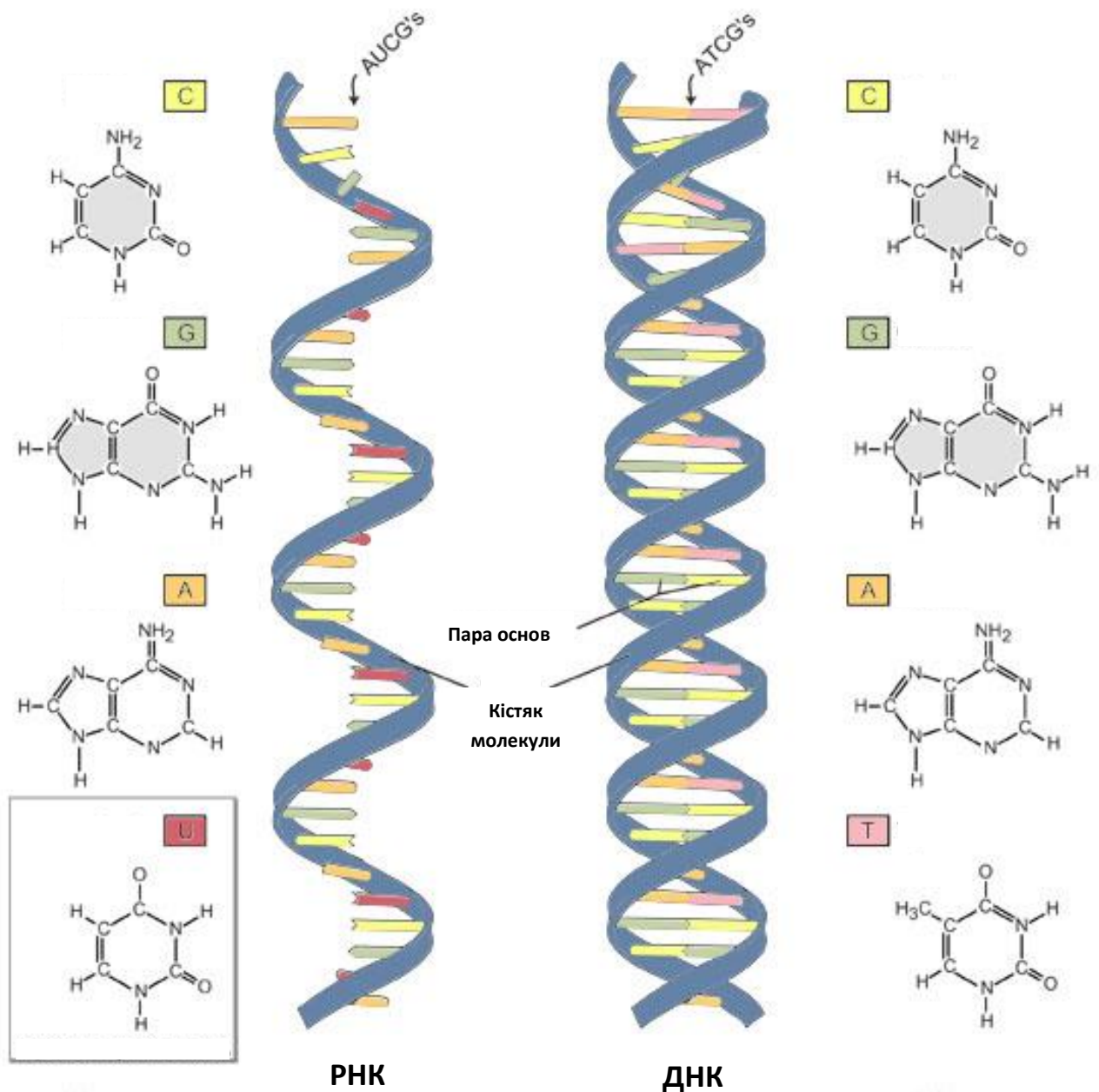


Рис. 38. Хімічні відмінності між РНК та ДНК.

Існування додаткової гідроксильної групи у вуглеводі РНК має значний ефект – **рибоза** є більш конформаційно-жорсткою, ніж дезоксирибоза, і набуває, в принципі, лише конформації **С3'-ендо** (рис. 39). Такий тип складчості дуже добре стабілізується. У всіх інших можливих конфігураціях ОН-група у С2'-положенні нашоувалася б на атом С8 пурину або С6 піримідину основи. Таким чином, 2'-ОН-група може орієнтуватися лише у декількох дискретних позиціях через взаємодію з атомами О3' або О4', або ж доступними акцепторами водневого зв'язку на основах.

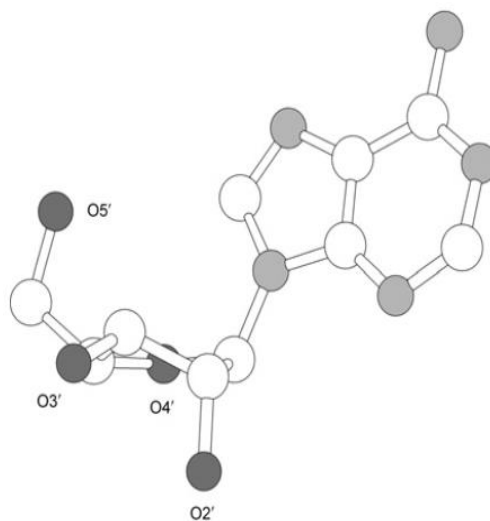


Рис. 39. С3'-ендо - єдина вигідна конформація пентози у рибонуклеозидах.

Одноланцюгові РНК, на відміну від дуплексів, не набувають сильно жорстких конформаційних форм, однаке за певних умов можливе формування антипаралельних подвійно ланцюгових РНК, схожих на дуплекс ДНК. При цьому урацил утворює пару з аденіном, яка є повністю ізоморфною з парою А-Т в ДНК. В цілому, дуплекс РНК є більш жорстким і за кількістю форм контрастує з поліморфізмом дволанцюгових ДНК. На сьогодні виявлено лише одну форму РНК-дуплексу, яка має багато спільного з А-ДНК, і тому має відповідну назву - **А-РНК**. У такій РНК, яку ще називають канонічним дуплексом, важливою стабілізуючою взаємодією є контакт між атомами Н2' попереднього та О4' наступного нуклеотиду, який недоступний для зв'язків з водою. **Конформаційні параметри** А-форми РНК були виявлені за допомогою кристалографічних досліджень дуплексних РНК вірусного та синтетичного походження (**табл. 13-15**). А-РНК має 11 пар основ на виток, вузьку та глибоку велику борозенку і широку та неглибоку велику (**табл. 15**), причому пари основ стоять зміщеними по відношенню до вісі хеліксу. Встановлено, що схожа конформація існує для природних полінуклеотидів або ділянок полі(А)–полі(Т) ДНК за умови низької йонної сили. Якщо ж її підвищити, тоді утворюється підвид А'-РНК, яка має 12 пар основ на виток та ширшу, у порівнянні з А-РНК велику борозенку.

Таблиця 13. Конформаційні параметри дуплексів РНК

Форма РНК	Зсув, γ , нм	Підйом, d , нм	Кут вигину, Ω	Пропелерний вигин, ω	Обертання, ρ	Уклін, η
А-РНК	0,044	0,28	32,7	-2,1	-0,8	-15,5
А'-РНК	0,051	0,30	30,0	2,3	0,0	-10,6

Як уже відмічалось, було виявлено, що обидва види дуплексів РНК мають складчастість СЗ'-ендо. Подвійноланцюгові РНК трохи краще згинаються у порівнянні з ДНК - в середньому на 15° більше – але в природі такі зігнутості не були помічені.

Таблиця 14. Значення торсійних кутів у дуплексах РНК

РНК	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
А(А)	-69	179	55	82	-154	-71	-161
А(Т)	-64	178	51	83	-152	-173	-161
А'	-70	177	61	77	-153	-70	-163

Оскільки у чистих дуплексах РНК практично не відбувається неправильного поєднання основ та мало екстрахеліксних структур, будова їх є більш консервативною та регулярною, ніж у ДНК. Через жорсткість структури дуплексу вона менше залежить від виду локальних послідовностей. В цілому, на сьогодні відкрито лише **2 типи конформацій дуплексної РНК**, хоча для **одноланцюгових РНК** існує **18 типів**.

Таблиця 15. Розміри борозенок у дуплексах РНК, нм

РНК	Велика борозенка		Маленька борозенка	
	Ширина	Глибина	Ширина	Глибина
А	0,47	1,29	1,08	0,33
А'	0,89	1,44	1,05	0,34

Першим кристалізованим дуплексом РНК були самокомплементарні **динуклеозиди r(AU) та r(GC)**, отримані у 1976 році незалежно Сіманом та Розенбергом. Було показано, що навіть малі динуклеотидні послідовності зберігають будову А-РНК та можуть паруватися. Пізніше було кристалізовано октамер структури **r(CCCCGGGG)**, на якому вперше визначено конформаційні параметри А-РНК: ширину малої борозенки (0,97-0,98 нм). Перший повний оберт А-РНК було отримано шляхом кристалізації структури **r(UUAUAUAUAUAUA)** у вигляді класичної А-РНК, було визначено кут закручування (вигину) – $32,7^{\circ}$, а також довжину однієї пари основ (підйом), яка склала 0,28 нм (**табл. 13**).

Нарешті, у 1996 році Еглі, Портманом та Усманом за роздільної здатності 0,18 нм на прикладі кристалічної структури дуплекса РНК з послідовністю **r(CCCCGGGG)** було показано, що бічні сторони основ та фосфатні групи є більш гідратованими, порівняно з ДНК. Такий феномен в основному пояснюється існуванням 2'-ОН-груп, 16 з яких у цьому дуплексі мали додаткові 33 водневі зв'язки з молекулами води. Особливо гідратування було наявним у районі малої борозенки (**рис. 40**).

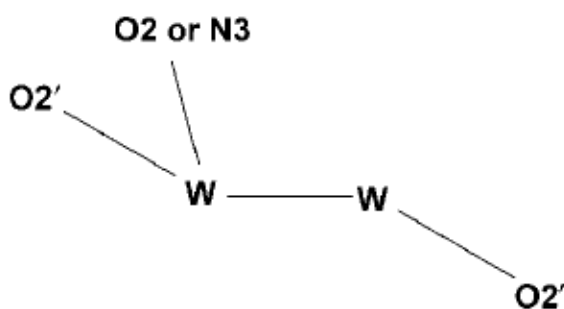


Рис. 40. Схема гідратованості у молекулах РНК (W – молекула води).

Взагалі, **РНК є більш гідратованою**, маючи 21,4 молекули води на кожну пару G-C, у порівнянні з 19,8 молекул для В-ДНК. Це, у свою чергу, призводить до кращої акумуляції контр-йонів, таких як калій та натрій, у малій борозенці РНК-дуплексів у порівнянні з В-формою ДНК.

5.4. Унікальні екстрахеліксні структури РНК

Було виявлено, що дуплексна РНК, хоча і в меншому ступені, ніж ДНК, здатна формувати **неправильні пари або навіть триплети основ**, а також так звані екстрахеліксні неспарені регіони – **петлі (Stem) та опуклості (Bulge) дуплексів** (**рис. 41**).

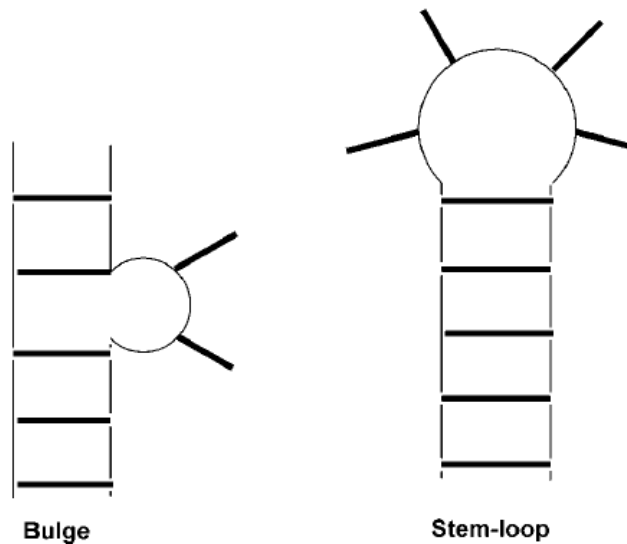


Рис. 41. Екстрахеліксні структури А-РНК (пояснення у тексті).

Такі екстрахеліксні регіони РНК є важливим стабілізуючим фактором третинної структури та обов'язковим компонентом майже всіх спеціальних форм та послідовностей РНК - тРНК, мРНК, рРНК, рибозимів, рибосвітців, тощо.

Приклади експериментально встановлених екстрахеліксних структур РНК:

- 1) **Тетра-петля UUCG** - найбільш розповсюджена і стабільна структура, здатна формуватися у розчині за різних умов.
- 2) **Послідовність r(GCUUCGGC)d_{Br}U** – формує дуплекс з неспареними ділянками G-U та U-U, який має менше 10 пар основ на виток.
- 3) **Додекамер з послідовністю r(GGACUUCGGUCC)** - існує у вигляді петлі всередині дуплексу через неспарені регіони з основами U-C та G-U, має більш широку велику борозенку, ніж у класичній А-РНК, що пояснюється взаємодією додаткових молекул води з неспареними основами.
- 4) **Послідовність r(GGCCGAAAGGCC)**, - формується у центрі хеліксу завдяки 4 неканонічним парам основ, що призводить до появи внутрішньої петлі з неспареними основами G-A та A-A. В результаті структура має вигляд значно зкритої дуплексу А-форми РНК зі стиснутою великою та розширеною до 1,35 нм малою борозенками.

Відомо, що **найбільш стабільною неканонічною парою основ** у дуплексних РНК є **G-U (рис. 42)**, оскільки вона присутня майже у всіх великих молекулах РНК та має два водневих зв'язки. Таку пару називають «коливальною», оскільки G у першій позиції кодону може приймати на себе або C, або U у якості третього антикодону.

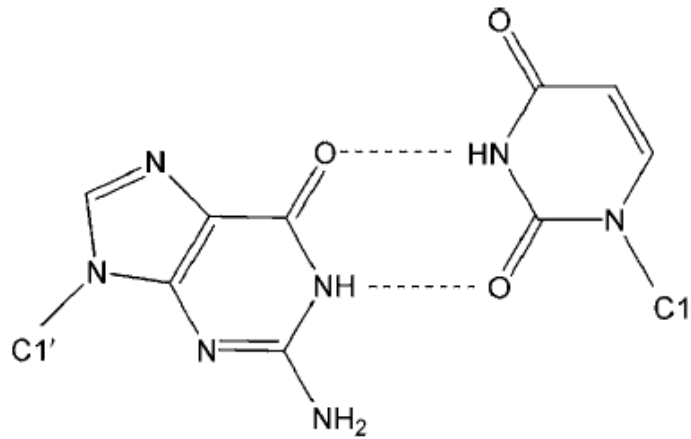


Рис. 42. Структура неканонічної пари G-U в А-РНК.

Серед прикладів екстрахелікських структур РНК варто відмітити, в першу чергу, «поцілунковий» комплекс (Kissing Complex). Ця комбінація петель виявляється у геномі ретровірусу **HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus)**, у сайті ініціації димеризації для «пакування» РНК у капсид. Такий комплекс являє собою дуплекс РНК з двома неканонічними парами А-Г, кожна з яких локалізується біля неспареного аденозину у петлях (рис. 43, А). Як було показано Енніфаром у 2001 році, у даному комплексі відбувається наближення та взаємодія петель різних ланцюгів у складі комплексу через контакт неспарених основи одного ланцюга з канонічними парами А-У та G-С екстрахелікського регіону іншого. Саме тому така структура і була названа «поцілунковим» комплексом (рис. 43, Б).

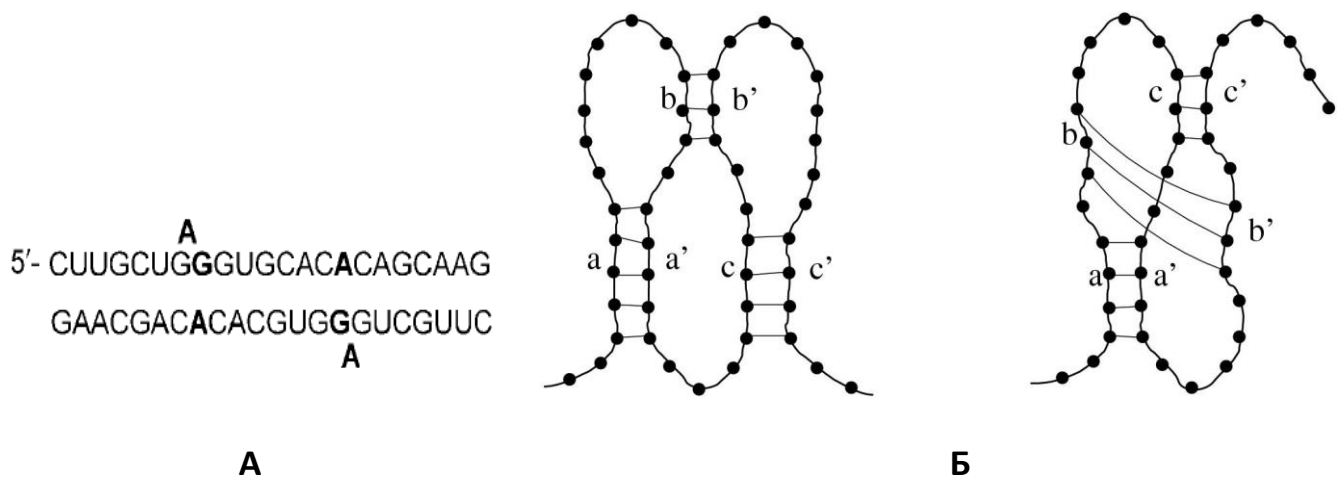


Рис. 43. Послідовність (А) та схема взаємодій нуклеотидів (Б) у складі «поцілункового» комплексу А-РНК.

Наступним прикладом екстрахеліксної структури А-РНК є **28-мерний гетеродуплексна «шпилька»**, яка виявляється у складі **сигнал-розпізнаючої частки SRP (Signal Recognition Particle)**. Така структура має неспарені регіони, наприклад, **пуринову опуклість (Purine Bulge)** з послідовністю **5'-GGAG/3'-GGAG**, яка призводить до зменшення ширини великої борозенки та до появи локальних недокручених ділянок поруч з неканонічними парами А-С та G-U.

Високоспецифічний сайт зв'язування білку Rev з HIV-1, (Rev Recognition Element - RRE) може слугувати ще одним прикладом екстрахеліксних структур. Виявлено, що після приєднання білку Rev конформація сайту сильно змінюється, а сам RRE, як відомо з даних кристалографії та ЯМР, являє собою сильно зкритлений хелікс через присутність у ньому двох екстрахеліксних основ на одному ланцюзі, аденіну та урацилу. Ці основи існують у складі опуклості та петлі відповідно, які формуються також через наявність двох неправильних пар пурин-пурин, між якими розташовано неспарений урацил. В результаті дуплекс згинається на 30°, а велика борозенка значно звужується (**рис. 44**).

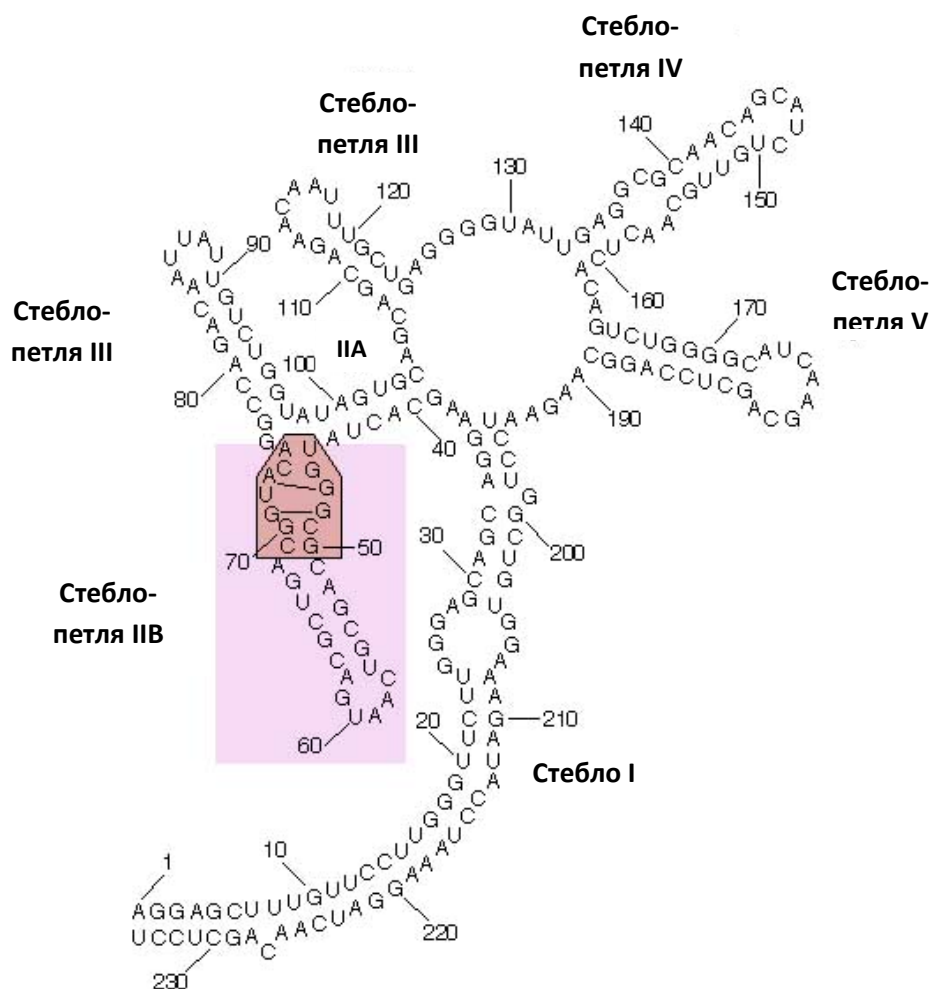


Рис. 44. Структура елемента відповіді на білок Rev (RRE).

Уваги також заслуговує вже згадана раніше **тетра-петля UUCG (рис. 45, А)**, яка характеризується незвичними конформаціями нуклеозидів пари G-C - син та анти відповідно (**рис. 45, Б**), існуванням водневого зв'язку між 2'-ОН-групою урацилу та атомом О6 гуаніну у цій парі, а також стекінг-контактом між наближеними цитозином та урацилом.

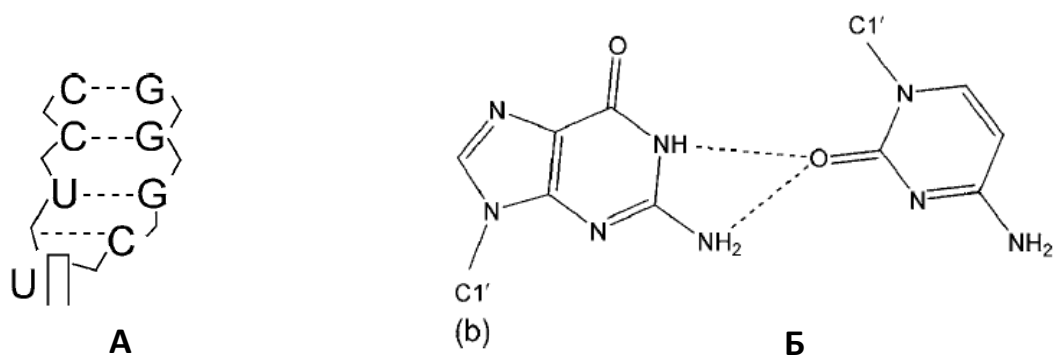


Рис. 45. Схема тетра-петлі UUGC (**А**) та неканонічної пари основ G-C (**Б**).

Серед інших тетра-петель можна відмітити **AGAA**, яка є членом родини **петель AGNN**. Її структура була виявлена в у 2004 році у комплексі з доменом білку Rnt1. Встановлено, що приєднання білку здійснювалося шляхом проникнення α -хеліксу білка у малу борозенку РНК поблизу цієї тетра-петлі.

Псевдо-вузли (Pseudo Knots) - ще один приклад екстрахеліксних структур РНК, є доволі поширеними структурами, особливо у РНК складної будови, наприклад, рибозимах (**рис. 46**).

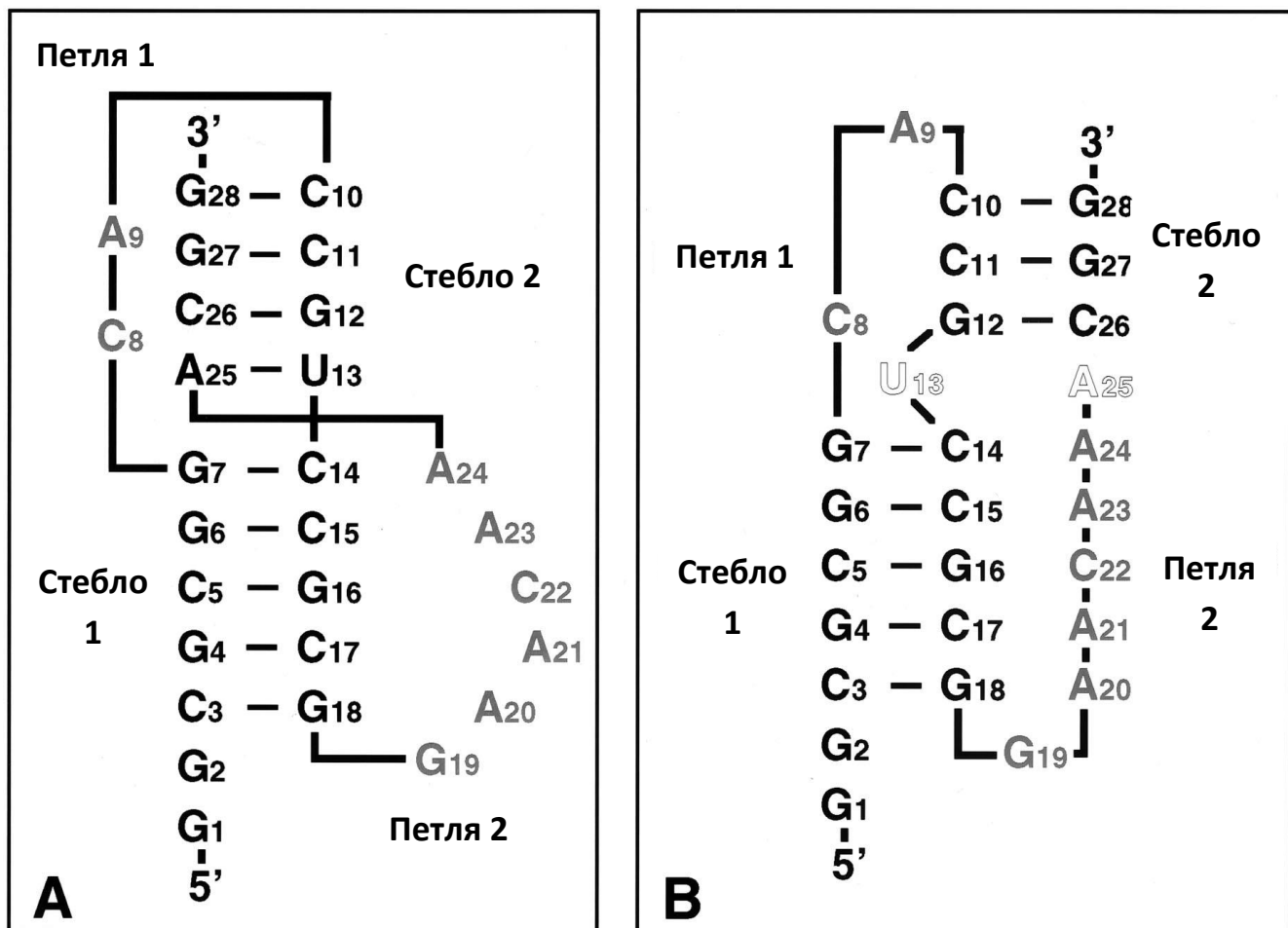


Рис. 46. Варіанти «псевдовузлів» дуплексів РНК.

Найбільш відомим псевдо-вузловим компонентом є **РНК-домен теломерази** (КФ 2.7.7.49), досліджений за допомогою ЯМР Теймером, Блуа та Фейгоном у 2005 році. Така структура характеризується довгим потрійним хеліксом, який розташований близько до висококонсервативної послідовності псевдо-вузлового типу, де також існує декілька триплетів Хугстіна. Відомо, що РНК-домен теломерази може існувати у двох основних конформаціях – **стабільній (рис. 47, А)** та **молекулярного «перемикача» (рис. 47, Б)**.

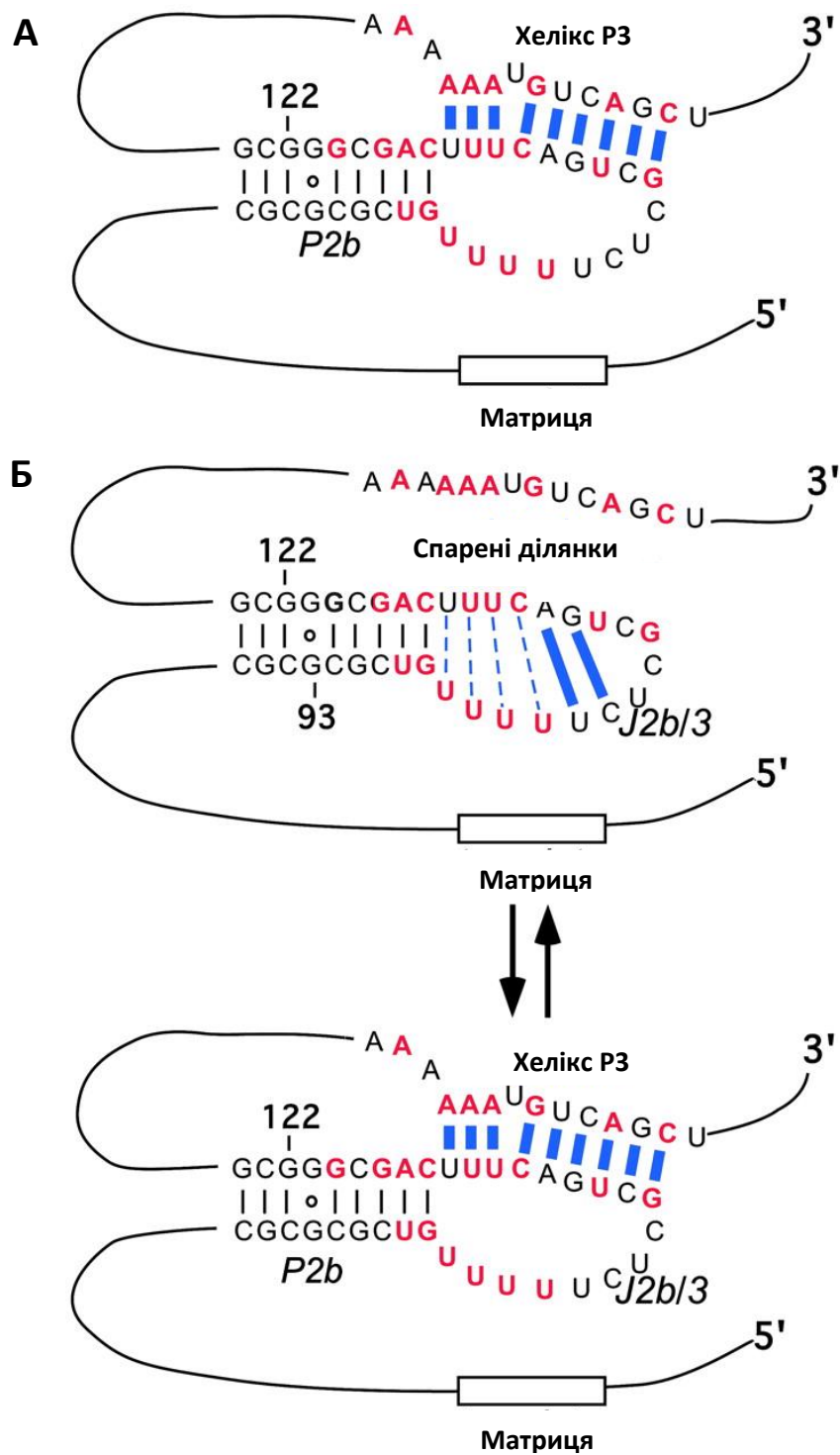


Рис. 47. Два режими існування РНК-домену теломерази (пояснення у тексті).

Пізніше схожу структуру були охарактеризовано в геномах вірусу жовтяниці буряка Еглі у 2002 році та вірусу згортання листків картоплі Палланом у 2005 році кристалографічно за роздільної здатності 0,125 та 0,135 нм відповідно. В цілому, найбільш розповсюдженими варіантами конфігурацій пар основ за Хугстіном (дослідник, який вперше відкрив парування нуклеотидів, конформації яких

відрізняються від канонічних) в більшості з розглянутих екстрахелікських структур РНК є різні форми пар G-A та триплетів G-G-A. На **рис. 48** представлені варіанти неканонічних пар та триплетів основ за Хугстіном та Уотсоном-Криком.

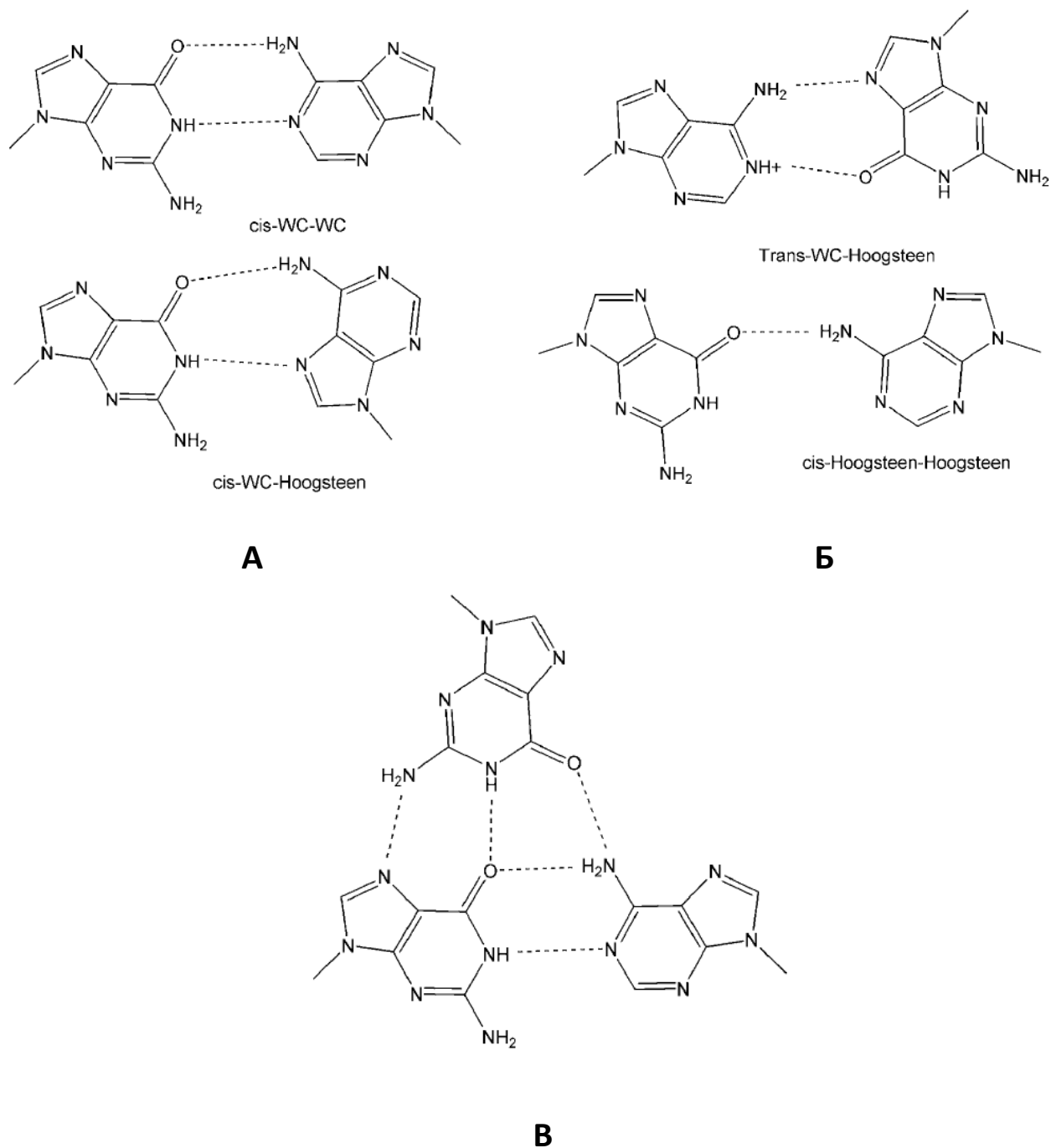


Рис. 48. Порівняння структур пар **G-A (А та Б)** за Хугстіном (**Hoogsteen**) та Уотсоном-Криком (**WC**), а також будова триплету **G-A-A (В)** за Хугстіном.

Нарешті, у **табл. 16** представлено варіанти кристалізованих на сьогодні екстрахелікських послідовностей А-РНК.

Таблиця 16. Кристалізовані екстрахеліксні послідовності дуплексів РНК

Послідовність	Особливість	Номер бази PDB	Номер бази NDB
r(GGACUUCGGUCC)	Пари U-C, G-U	255D	ARL037
r(GGCCGAAAGGCC)	Пари G-A, A-A	283D	URL051
29-nucl. SRP	Пуринова опуклість	1D4R	AR0024
27-nucl. Pseudo-Knot	Псевдо-вузол	437D	UR0004
HIV-1 RRE site	Пари G-G, A-G; A, U	1CSL	AR0023
Telomerase RNA-domain	Псевдо-вузол	1YMO	-
Viral ribosomal frameshift RNA	Псевдо-вузол	1L2X	UR0020
HIV-1 RNA dimerization site	Kissing complex	1K9W	UR0017

5.5. Структура мРНК

Матричні РНК (мРНК) являють собою велику родину молекул РНК, які забезпечують передачу інформації від ДНК до рибосоми, де вони слугують у якості матриці для вибору потрібних амінокислот, призначених до синтезу продуктів генної експресії. Таким чином, мРНК синтезується за допомогою процесу транскрипції, каталізованого РНК-полімеразою, а потім піддається трансляції, результатом чого є поява нових білків згідно потреб клітини. Тобто, мРНК є основним компонентом ланцюга передачі і реалізації генетичної інформації згідно центральній догмі молекулярної біології.

Так само, як і у ДНК, генетична інформація мРНК закодована у нуклеотидах, причому на кожен амінокислоту припадає по три нуклеотиди, що відомо під назвою кодону (**рис. 49, А**). Кількість комбінацій з трьох нуклеотидів чотирьох різних типів складає 64 позиції, які являють собою генетичний код. Таким чином 61 варіант, у тому числі й старт-кодон AUG (Start), відповідають кожен конкретній амінокислоті. Три залишкові кодони – UAG, UGA та UAA - не є кодонами у буквальному сенсі, оскільки не співвідносяться з жодною амінокислотою. Натомість, вони розпізнаються специфічними факторами термінації трансляції, тому називаються стоп-кодонами (Stop). На **рис. 49, Б** представлений генетичний код. Синтез білку, окрім мРНК,

потребує двох інших видів молекул – тРНК та рРНК (рис. 37), про які мова піде дещо пізніше.

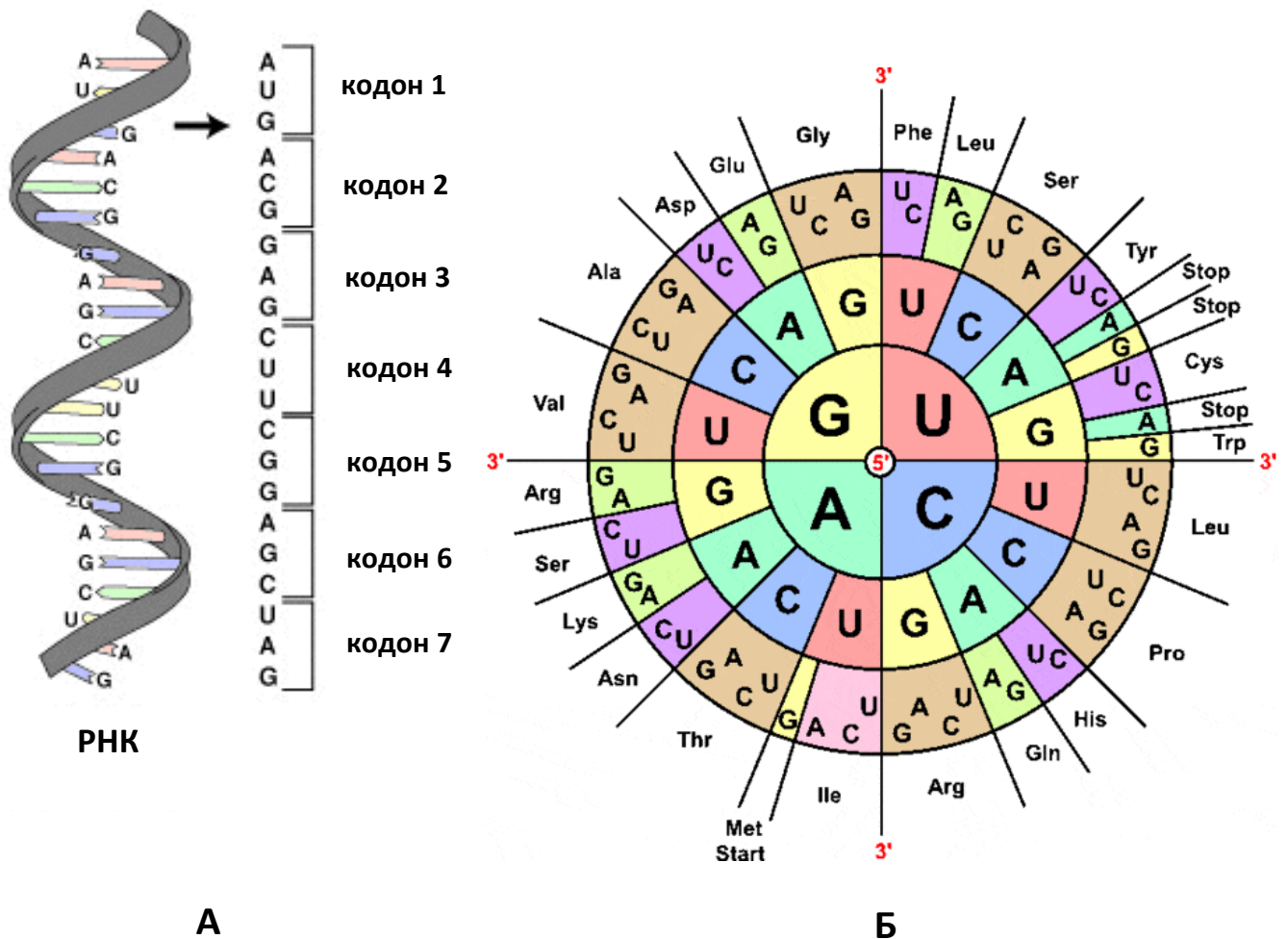


Рис. 49. Схема розподілу кодонів в мРНК (А) та діаграма генетичного коду (Б).

Серед функціональних частин «зрілої» мРНК, починаючи з 5'-кінця у напрямку 3'-кінця (рис. 50), розрізняють:

- 1) **Кеп (5'-Cap)** – являє собою 5'-термінальний модифікований гуаніновий нуклеозид – 7-метилгуанозин, який приєднаний до наступного нуклеозиду нетиповим трифосфатним зв'язком, що поєднує положення 5'-5'. Така модифікація є критичною для впізнавання та правильної орієнтації мРНК по відношенню до рибосоми. Крім того, кеп захищає мРНК від атаки 5'-екзонуклеаз, а також потрібен для сплайсингу та транспорту мРНК до ЕПР (структуру та подробиці див. в темі про дозрівання).

- 2) Некодуєчі послідовності 5' – та 3'-UTR (Untranslated Regions)** – секції мРНК, які розташовані перед старт-кодоном (Start) і після стоп-кодону (Stop) відповідно, тобто, безпосередньо оточують кодуєчу послідовність. Трансляції не піддаються, однак транскрибуються і зберігаються після процесингу. Відомо, що дані регіони забезпечують стабільність структури мРНК, контролюють її стабільність структури, клітинну локалізацію та ефективність трансляції, причому сила прояву цих ефектів залежать від виду мРНК та складу UTR. Так, на ефективність трансляції може впливати приєднання у обох цих ділянках певних білків, які, наприклад, регулюють процес приєднання мРНК до рибосоми. Також відомо, що мікроРНК, приєднуючись до 3'-UTR, також можуть контролювати структурну стабільність та ефективність функціонування мРНК.
- 3) Кодуюча послідовність CDS (Coding Sequence)** – містить основні кодони, які є матрицею для синтезу білку (або декількох у випадку еукаріот) на рибосомі. Кодуюча послідовність починається зі старт-кодону і закінчується стоп-кодоном включно. Як правило, деякі регіони цієї послідовності стабілізуються внутрішніми хеліксними ділянками або стеблами, що затруднює деградацію мРНК. Також під час дозрівання певні елементи кодуєчої послідовності слугують у якості сигналів для альтернативного сплайсингу гяРНК як енхансери або сайленсери цього процесу.
- 4) Поліаденіловий «хвіст» (3'-poly-A Tail)** – представляє собою довгу 3'-термінальну ділянку зрілої молекули мРНК. Така ділянка складається виключно з аденілових нуклеозидів, кількість яких може коливатися від 50 до 250. В гетерогенно-ядерній РНК поліаденіловий «хвіст» відсутній, оскільки приєднується у процесі поліаденілювання, яке є інтегральною частиною дозрівання мРНК, про що мова піде пізніше. Крім участі в процесингу, цей «хвіст» забезпечує експорт мРНК з ядра до ЕПР, фіксацію матриці на рибосомах, захист від 3'-екзонуклеаз, а також визначає тривалість життя мРНК, оскільки з кожним циклом трансляції певна кількість аденозинів втрачається. мРНК з остаточно вкороченими «хвостами» піддаються нуклеолітичній деградації.



Рис. 50. Схема структурних ділянок зрілої мРНК (пояснення у тексті).

5.6. Особливості структури тРНК

Як уже відмічалось, **транспортна або адапторна РНК** виконує важливу роль молекулярного «перекладача», забезпечуючи відповідність кодонів мРНК та амінокислот у складі майбутнього поліпептиду. Виконуючи свою функцію, тРНК діє синхронізовано з мРНК та рРНК, контактуючи з кодонами першої за допомогою відповідних антикодонів, і формуючи зв'язки з другою у складі малої субодиноці рибосоми для правильної своєї координації відносно матриці у сайтах синтезу білку. Також у процесі активації амінокислоти тРНК контактує з відповідними **аміноацил-тРНК-синтетазами (АРС-азами, КФ 6.1.1.х)**.

Вперше **первинна структура тРНК** була визначена у 1964 році, і одразу ж з'явилися передумови для визначення її вторинної структури, яка наразі відома під назвою «листка конюшини». Така структура є результатом формування водневих зв'язків між віддаленими регіонами РНК, що призводить до низки **подвійно-ланцюгових ділянок**, що чергуються з **одноланцюговими петлями**. Таким чином, у структурі тРНК виділяють **наступні елементи (рис. 51)**:

- **Акцепторне стебло (1)** – для приєднання відповідної амінокислоти до 3'- або (рідше) 2'-гідроксилу рибози кінцевого аденозину у складі 3'-термінальної консервативної послідовності ССА,
- **Антикодонове стебло (4),**
- **D-стебло (дигідродуридинове, 2),**
- **T(ψ)-стебло (псевдоуридинове, 7),**
- **Антикодонова петля (5)** – містить антикодон для впізнавання кодону,
- **Дигідродуридинова петля (3)** – для зв'язку з АРСазами,
- **Псевдоуридинова петля (8)** – для зв'язку з 16S-/18S-рРНК,
- **Варіабельна або додаткова петля (6).**

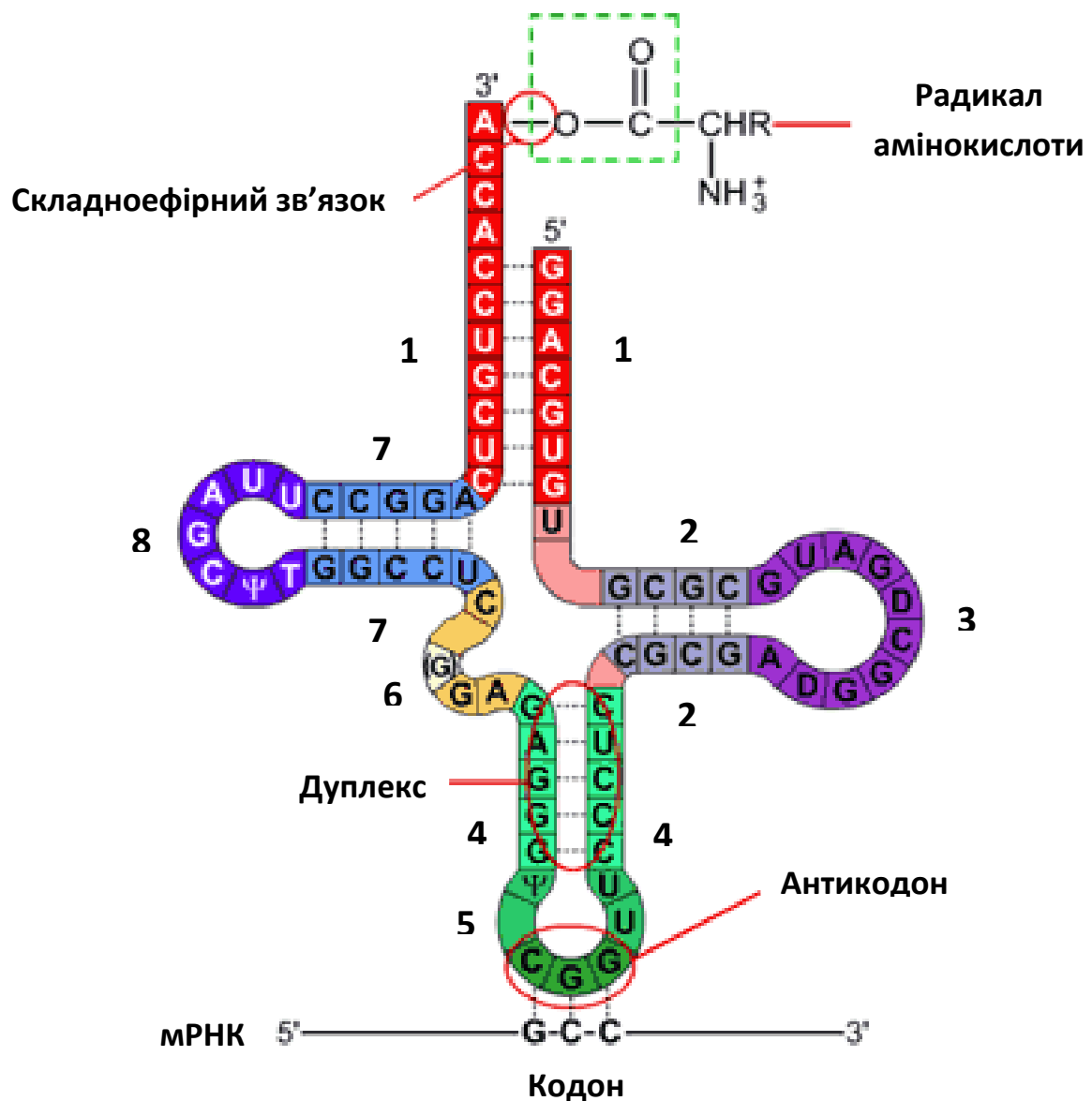


Рис. 51. Схема вторинної структури тРНК (пояснення у тексті).

Всі тРНК мають від 70 до 95 нуклеотидів, точна кількість залежить від числа нуклеотидів, що формують варіабельну петлю. Також вони містять цілий ряд модифікованих нуклеозидів (кількістю 10-12 на одну молекулу). Найбільш відомими модифікованими нуклеозидами РНК є, наприклад, **N1-метиладенозин**, **N7-метилгуанозин**, **N2-диметилгуанозин**, **N3-метилцитидин**, **N4-ацетилцитидин**, **інозин**, **риботимідин**, **псевдоуридин** (позначається як ψ), **дигідроуридин** (позначається, як D), **4-тіоуридин** або **2,4-дитіоуридин**, тощо (рис. 52 та 53).

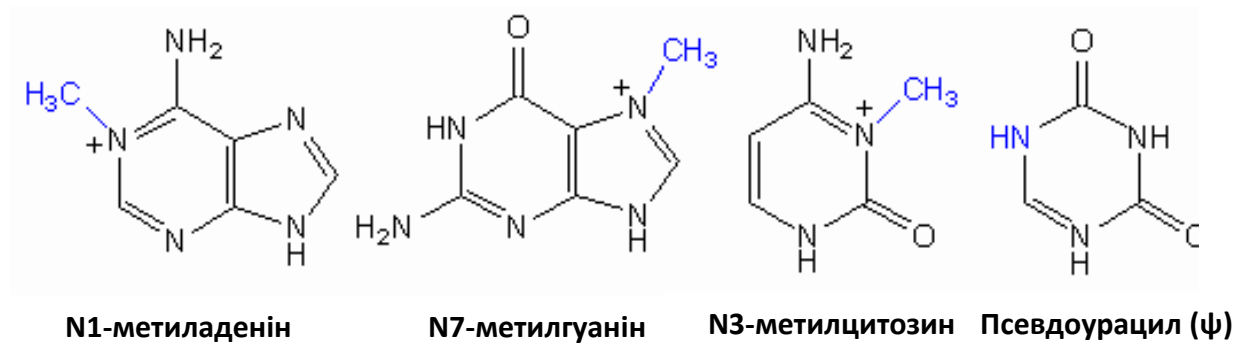


Рис. 52. Структурні формули мінорних основ тРНК.

Перша кристалічна структура тРНК, а саме фенілаланін-тРНК була отримана в незалежних лабораторії Робертуса та Кіма у 1974 році. Після того за 20 років було отримано низку кристалічних молекул тРНК (**табл. 17**).

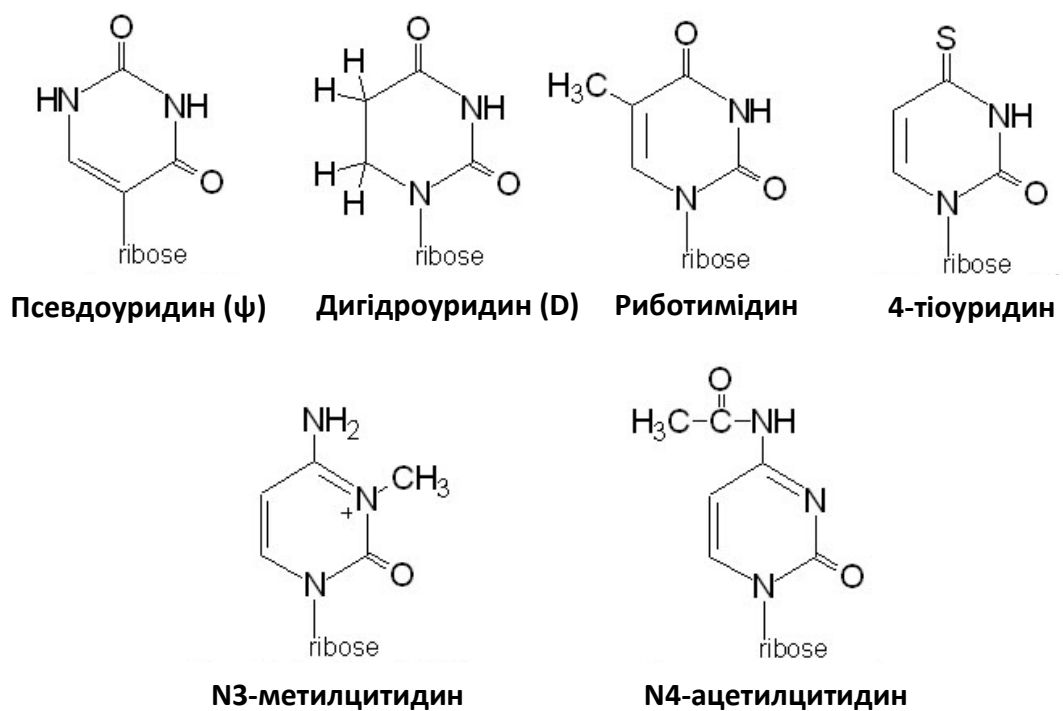


Рис. 53. Структурні формули мінорних нуклеозидів тРНК.

Робертус та Кім також показали, що молекула тРНК має **третинну структуру у формі літери «L»**, причому на кожну перетинку літери потрапляє по 2 стебла, і ці дві

пари розташовані під прямим кутом одна відносно одної. Конформація «листка конюшини» при цьому зберігається, але додаються зв'язки між віддаленими регіонами молекули (рис. 54, А).

Таблиця 17. Кристалізовані зразки тРНК

Зразок	Умови дослідження	Номер бази PDB	Номер бази NDB
Дріжджова Фен-тРНК	роздільна здатність 0,2 нм моноклінальні кристали	1EW	TR002
Дріжджова Фен-тРНК	роздільна здатність 0,193 нм моноклінальні кристали	1EHZ	TR0001
Дріжджова Фен-тРНК	орторомбічні кристали	6TNA	TRNA04
Дріжджова Асп-тРНК	-	2TRA	TRNA07
Дріжджова Мет-тРНК	-	1YFG	TRNA12

Стебла тРНК у своїй основі мають хелікси А-РНК та тримаються попарно завдяки зв'язкам між основами, у результаті і формується третинна структура тРНК (рис. 54, Б). При цьому довше **антикодонове стебло накладається у пару з коротшим D-стеблом**, яке у своєму складі має лише 4 пари основ. Так формується **перша перекладаина**. **Друга перекладаина** - перпендикулярна першій - утворюється **дуплексом акцепторного стебла у поєднанні з псевдоуридиновим стеблом**, яке має п'ять пар основ.

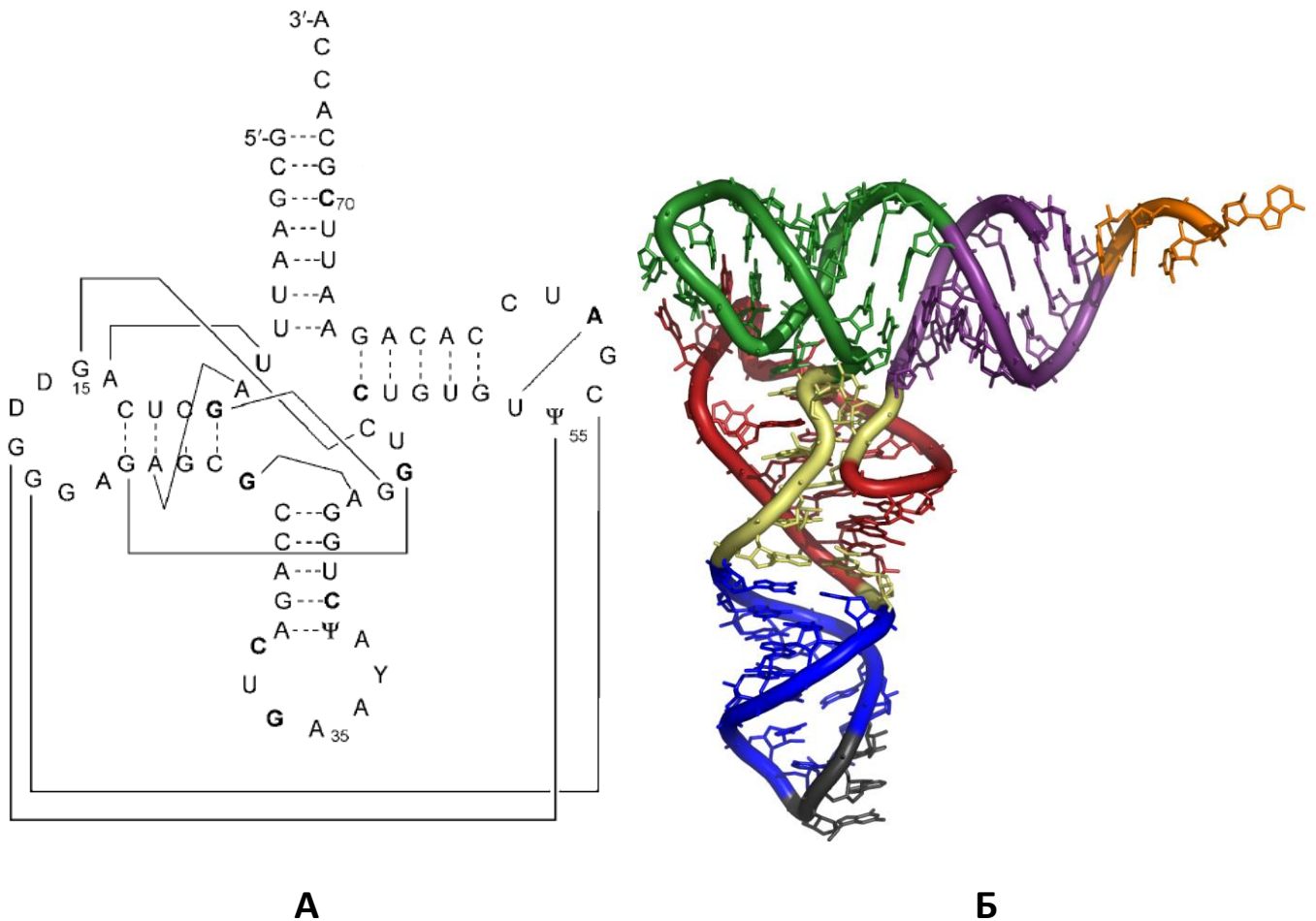


Рис. 54. Схема розташування водневих зв'язків, які формують третинну структуру тРНК (А) та загальний вигляд цієї структури (Б).

Основні зв'язки між основами у кількості дев'яти, які стабілізують структуру у формі літери «L», знаходяться у районі перпендикулярного поєднання двох «плечей» молекули, тобто в районі прямого кута. Майже всі з них є неканонічними парами основ за Хугстіном, а деякі існують навіть у формі триплетів (рис. 55).

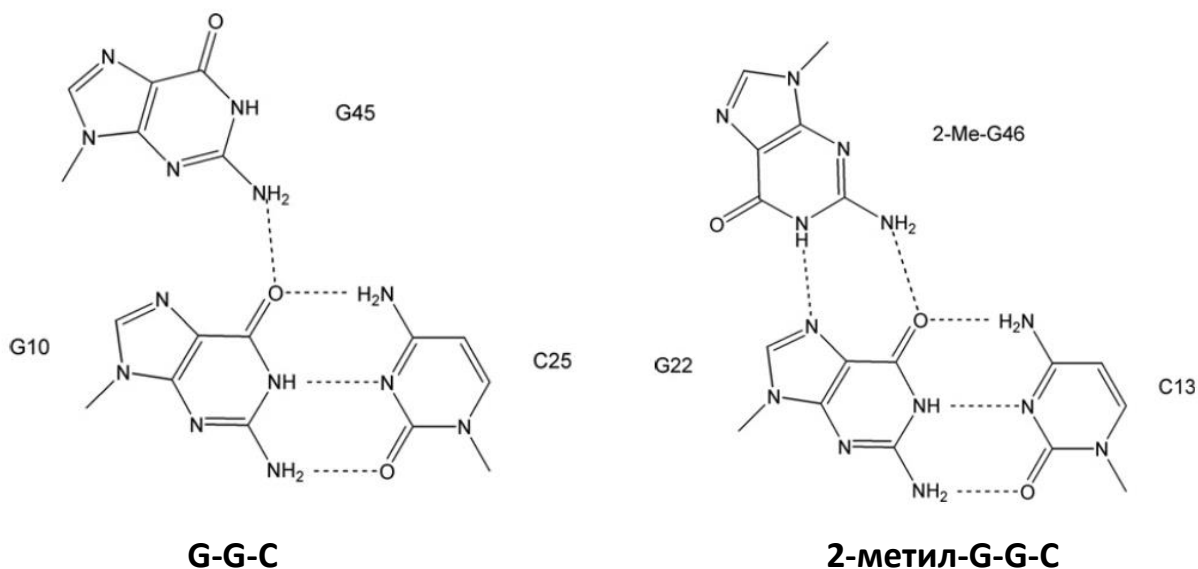


Рис. 55. Варіанти триплетів основ за Хугстіном, які стабілізують структуру тРНК.

Наразі одним з найновіших досліджень структури тРНК є проведене Ші та Муром у 2000 році за роздільної здатності 0,193-0,2 нм на кристалічних формах, отриманих методом швидкого заморожування (Rapid Freeze). В ході експерименту було виявлено нові сайти приєднання йонів магнію, а також додаткові водневі зв'язки основ з водою (табл. 17).

5.7. Рибосомальні РНК та структура рибосом

Відомо, що третій класичний тип РНК - **рибосомальні або рРНК** - у своєму функціонуванні нерозривно пов'язаний з молекулярною машинерією біосинтезу білку – рибосомальним апаратом клітини. Рибосоми представляють собою універсальні високомолекулярні нуклеопротейдні комплекси, присутні як у про-, так і у еукаріотичних клітинах. Типова рибосома складається з двох субодиниць, у кожній з яких є білкова та нуклеотидна частина, що представлена рРНК. Тому, як правило, усі особливості будови та функціонування цього класу молекул РНК визначаються функціональними потребами білок-синтетичного апарату.

Прокаріотична рибосома 70S (рис. 56) має молекулярну вагу біля $2,7 \times 10^6$ Да та складається з **двох субодиниць**:

1. **Малої 30S** – має 20 різних білків та єдину молекулу **16S рРНК** довжиною до 1500 нуклеотидів,
2. **Великої 50S** – складається з 30 різних білків та двох молекул **рРНК** – **23S** з 3000 нуклеотидів та **5S**, що містить всього лише 120 нуклеотидів.

Еукаріотична рибосома 80S (рис. 56) важить близько 5×10^6 Да та також має дві субодиниці:

- 1) **Малу 40S** – формується з 30 білків та **18S рРНК** довжиною 1900 нуклеотидів,
- 2) **Велику 60S** – складається з 50 білків та трьох молекул **рРНК** – **5S**, яка містить 120 нуклеотидів, **5,8S**, що складається з 160 нуклеотидів, та **28S**, яка нараховує 4800 нуклеотидів.

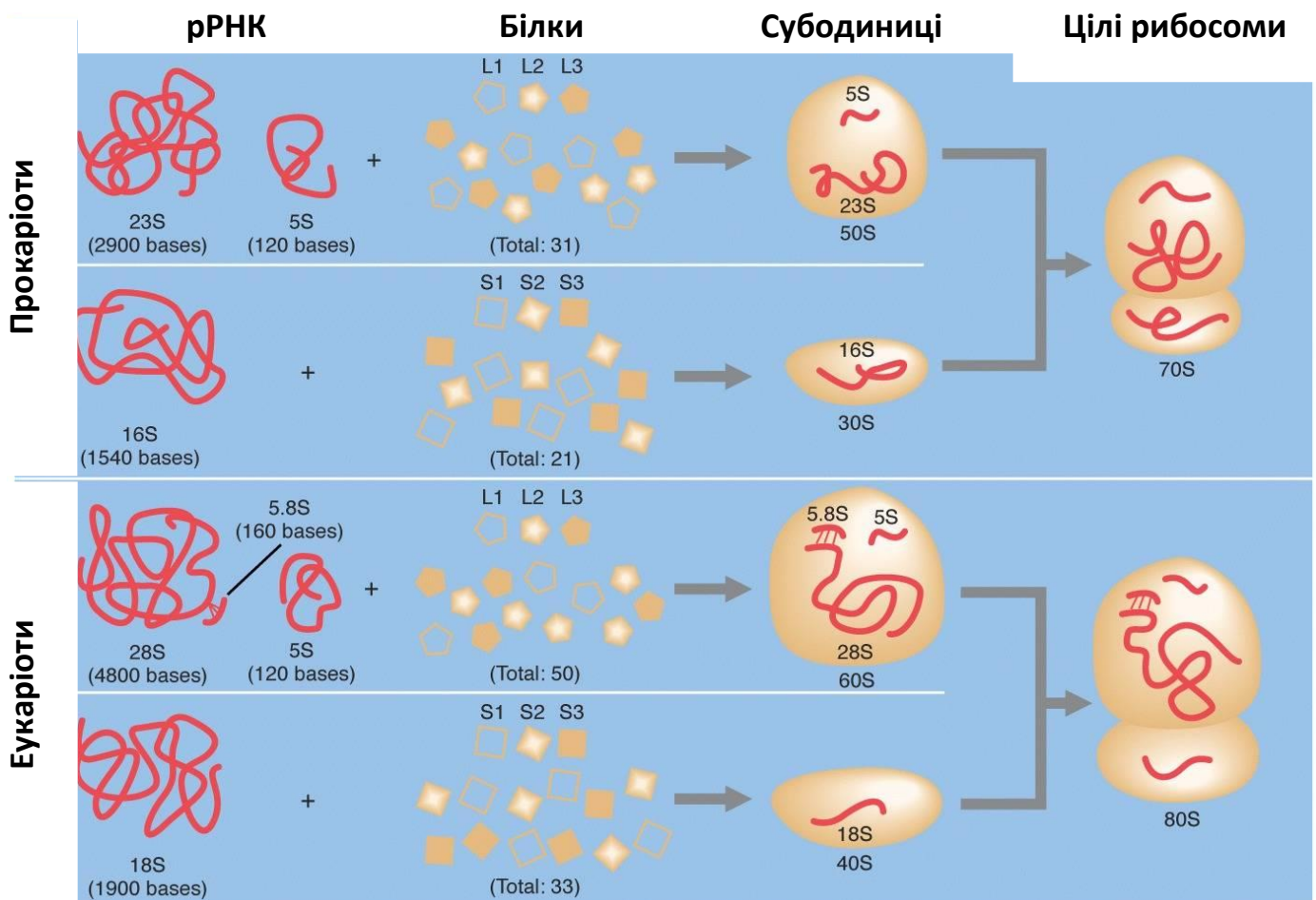


Рис. 56. Складові про- та еукаріотичних рибосом. Total – загальна кількість, bases – пари основ.

Головними функціями субодиниць є:

- 1) **Малої** - контроль взаємодії тРНК з мРНК,
- 2) **Великої** - регуляція пептидилтрансферазної реакції та участь у каталізі утворення пептидного зв'язку.

Вперше кристалічні компоненти рибосоми прокаріот (деякі білки) були отримані близьок 20 років тому, взагалі ж вивчення структури рибосом ведеться вже більше 50

років. За допомогою кристалографії було отримано цілу низку кристалічних структур як окремих субодиниць, так і цілих рибосом (**табл. 18**).

Таблиця 18. Кристалізовані зразки рибосомальних субодиниць та рибосом

Зразок	Джерело	Роздільна здатність, нм	Дослідник
50S	Haloarcula marismortui	0,9	Бен, 1998
50S	Haloarcula marismortui	0,5	Бен, 1999
30S	Thermus thermophilus	0,55	Клемонс, 1999
70S	Thermus thermophilus	0,78	Кейт, 1999
30S	Thermus thermophilus	0,45	Тосіджа, 1999
30S	Thermus thermophilus	0,3	Уімберлі, 2000
30S	Thermus thermophilus	0,33	Бен, 2000
50S	Haloarcula marismortui	0,24	Юсупов, 2001
70S	Thermus thermophilus	0,55	Картер, 2000
70S	Thermus thermophilus	0,37	Коростильов, 2006
70S	Thermus thermophilus	0,28	Селмер, 2006
70S	Escherichia coli	0,35	Шавірт, 2005

Навіть на перших кристалічних структурах цілих рибосом у комплексі з тРНК, отриманих Юсуповим у 2001 році, незважаючи на низьку роздільну здатність картин електронної щільності, можна виявити, **що тРНК мала численні контакти з рРНК у складі рибосоми**. Далі третинна структура рРНК буде розглядатися на прикладі більш вивчених прокаріотичних рибосом.

5.8. Складові субодиниці 30S

Як уже відмічалось мала субодиниця 30S прокариотичної рибосоми містить лише одну 16S рРНК. Згідно даних кристалографічних досліджень, отриманих Уімберлі у 2000 році за роздільної здатності 0,3 нм (**табл. 18**), **16S рРНК** має у своєму складі 1511 нуклеотидів та являє собою основу малої субодиниці. Навколо цієї молекули згруповано близько 20 білків, формуючи повний нуклеопротейд, який складається з **чотирьох основних доменів**. Домени можуть змінювати розташування один відносно одного, що робить структуру малої субодиниці конформаційно гнучкою. Це дуже важливо, оскільки зміни положень месенджерної та транспортної РНК відносно субодиниці. Таким чином, основним формотворчим фактором для малої субодиниці є згорнута у третинну структуру молекула рРНК, а білки потрібні лише для заповнення проміжків та підтримання стабільності всієї структури. Третинна структура 16S рРНК представлена на **рис. 57**.

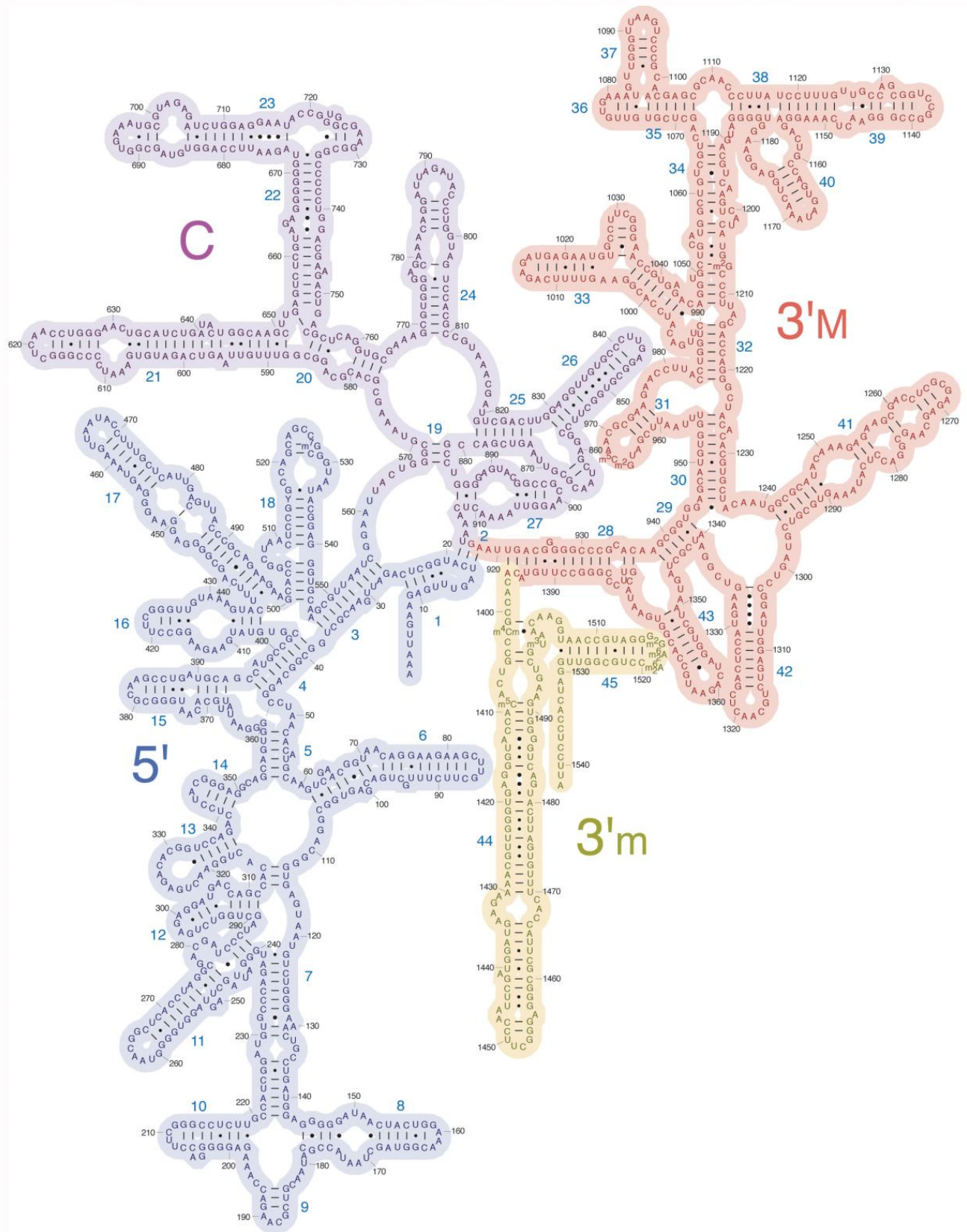


Рис. 57. Третинна структура 16S рРНК з *Escherichia coli*.

Особливості будови 16S-rРНК:

- Третинна структура містить більше **50 дуплексних регіонів**.
- Між хеліксами присутні відносно невеликі петлі.
- Дуплекси тісно взаємодіють між собою, в основному, за рахунок **коаксіального стекінгу** через малі борозенки наближених однонаправлених спіралей. Іноді це призводить до порушення структури А-РНК, наприклад, коли дві малі борозенки «впираються» одна в одну.
- Регіони з відхиленнями структури від А-форми РНК, як правило, включають у себе послідовності, збагачені на аденін, та характеризуються наявністю **екстрахеліксних опуклостей та неканонічних пар основ**.
- У декількох випадках спостерігається так зване **перпендикулярне «пакування» двох хеліксів** один відносно одного через малі борозенки, яке опосередковується **неспареним пуриновим нуклеозидом**. Це є характерним для функціонально значимих дуплексів малої субодиниці.
- Спостерігаються **триплети основ та тетра-петлі**.

Більшість з білків малої субодиниці мають подібну будову - складаються з **глобулярного регіону та довгого гнучкого домену**, який відіграє важливу роль стабілізації рРНК, оскільки саме такі домени «заповнюють» проміжки у третинній структурі рРНК.

Саме мала субодиниця містить **три основні сайти**, в яких відбувається основна робота з приєднання аміноацил-tРНК та переміщення пептидил-tРНК, а також проофрідинг помилок трансляції:

1. **Аміноацильний або акцепторний (А) сайт** – регіон, де формуються ковалентні пептидні зв'язки у ході пептидил-трансферазної реакції, в ході якої відбувається періодичне перенесення пептиду з Р-сайту на нову амінокислоту, яка фіксується до tРНК у цьому сайті. Однак сама пептидил-трансферазна реакція з утворенням пептидного зв'язку каталізується за рахунок нуклеотидного компоненту субодиниці 50S.
2. **Пептидильний (Р) сайт** – ділянка, яка забезпечує взаємодію антикодону tРНК з відповідним кодоном мРНК, тут розміщується пептидний ланцюг, фіксований на tРНК.
3. **Вихідний (Е) сайт**– призначений для короткочасного приєднання позбавленої амінокислоти tРНК, витісненої у процесі реакції транслокації з Р-сайту та її вивільнення з білок-синтезуючого комплексу рибосоми (рис. 58).

Встановлено, що tРНК взаємодіє з малою субодиницею рибосоми та відповідною рРНК в основному через поверхні малих борозенок за участю рибосомальних білків та цукрово-фосфатний кістяк обох молекул. Цікавим є той факт,

що найбільше контактів з білками має саме Е-сайт, тому тут було зареєстровано переважну більшість контактів тРНК з білками. У інших двох сайтах тРНК зв'язувалася, в основному, з 16S рРНК. Це слугує ще одним доказом того, що саме рРНК, а не білки, є основним посередником функціональної активності малої субодиниці рибосоми.

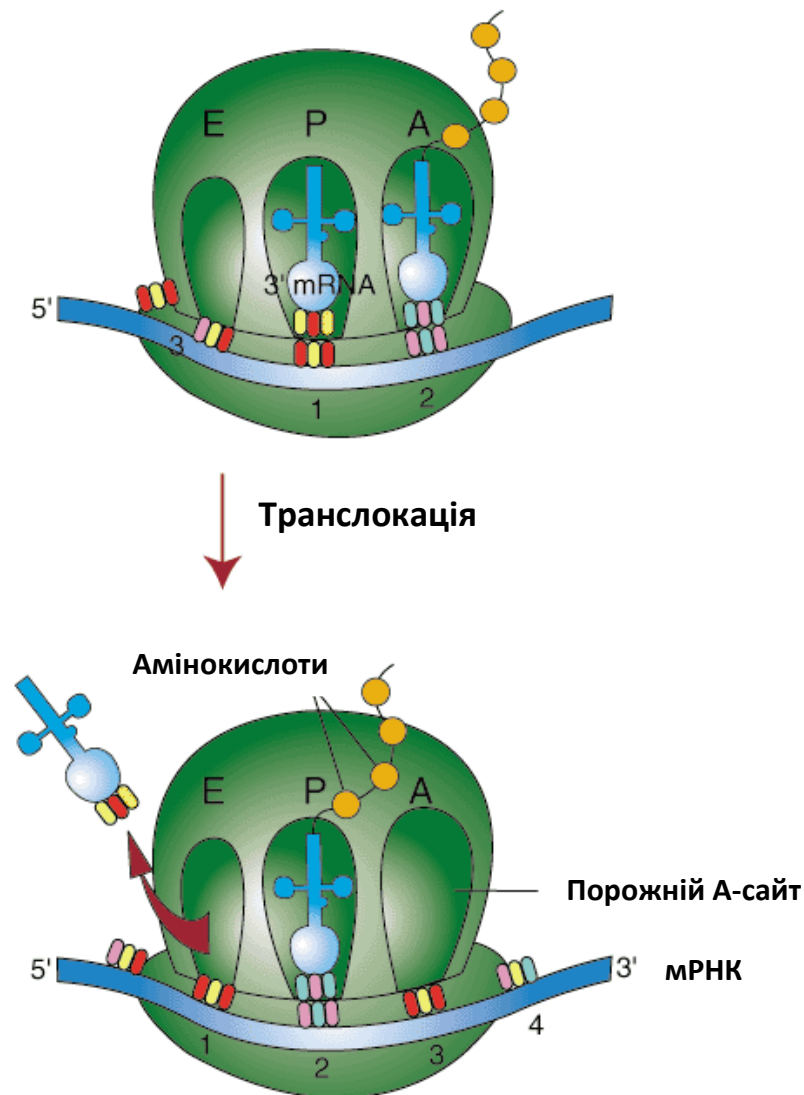


Рис. 58. Схема функціонування сайтів рибосоми під час транслокації.

Визначення тривимірної кристалічної структури повної 30S-субодиниці з включеними антикодоновими стеблом та петлею тРНК та коротким фрагментом мРНК, яке було проведене Огле у 2001 році за роздільної здатності 0,33 нм, дозволило виявити основні особливості впізнавання кодона антикодоном. Встановлено, що ключову роль у такому впізнаванні відіграють два прилеглі один до одного аденілові нуклеотиди 16S-рРНК. Вони контактують з малою борозенкою антикодонового стебла тРНК, тим самим забезпечуючи стеричну відповідність перших двох нуклеотидів

триплету кодона з відповідними нуклеотидами антикодону, тобто, приймають участь у селекції необхідного кодону згідно правилу комплементарності. Третя позиція кодону та антикодону, яку називають «**коливальною**» (**wobble**), не залучена до взаємодій з 16S-rРНК, цим можна пояснити виродженість генетичного коду та ізоакцепторність тРНК, тобто існування декількох форм цих молекул для однієї і тієї ж амінокислоти. Таким чином, існування варіацій водневих зв'язків у районі цієї позиції, забезпечує вибір з декількох основ з діапазону можливих.

Нарешті, на кристалічній структурі субодиниці 30S разом з тРНК, отримана за роздільної здатності 0,33 нм групою Шланзена у 2000 році, було показано, що регіони 16S рРНК, які прилягають до функціональних сайтів рибосоми, відрізняються високою консервативністю. Більше того, молекули тРНК зв'язані у ділянках А- та Р-сайтів, так само, як і регіон мРНК поблизу кодонів, не взаємодіють з жодним з рибосомних білків. Це, знову ж таки, вказує на фундаментальну роль 16S рРНК у забезпеченні структури та функціонування малої субодиниці рибосоми прокариот.

5.9. Субодиниця 50S

Як уже згадувалося, **велика субодиниця 50S** прокариотичної рибосоми містить найбільшу та найменшу з діапазону молекул рРНК - **5S та 23S рРНК** відповідно. У 2000 році Беном зі співробітниками за допомогою кристалографії за роздільної здатності 0,24 нм було визначено структуру ділянки довжиною 2711 нуклеотидів з повної послідовності **23S рРНК** (2923 нуклеотидів). Також було виявлено 27 рибосомних білків та встановлено структуру **5S-РНК (122 нуклеотиди)**, яка є **найменшою**. Встановлено також, що велика субодиниця має діаметр близько 25 нм. Білки у складі субодиниці 50S також слугують лише для стабілізації будови нуклеопротеїдної частки та для підтримання третинної структури рРНК. Третинна структура 23S рРНК організована у вигляді **6 доменів (рис. 59)**. Завдяки більшій кількості нуклеотидного матеріалу велика субодиниця є менш вільною у конформаційному плані, ніж 30S.

Принциповою функцією великої субодиниці є **формування пептидних зв'язків**, а саме – забезпечення каталізу **пептидилтрансферазної реакції** та її регуляції. **Каталітичний сайт** даної реакції розташований у **домені V 23S рРНК (рис. 59)**. Локалізація активного сайту була визначена кристалографічно з використанням пуроміцину – інгібітора синтезу білка прокариот. Цікавим є той факт, що в області 0,18 нм навколо активного сайту не виявлено жодної молекули білку, що підтверджує висновок про здійснення пептидил-трансферазної реакції виключно за рахунок 23SpРНК.

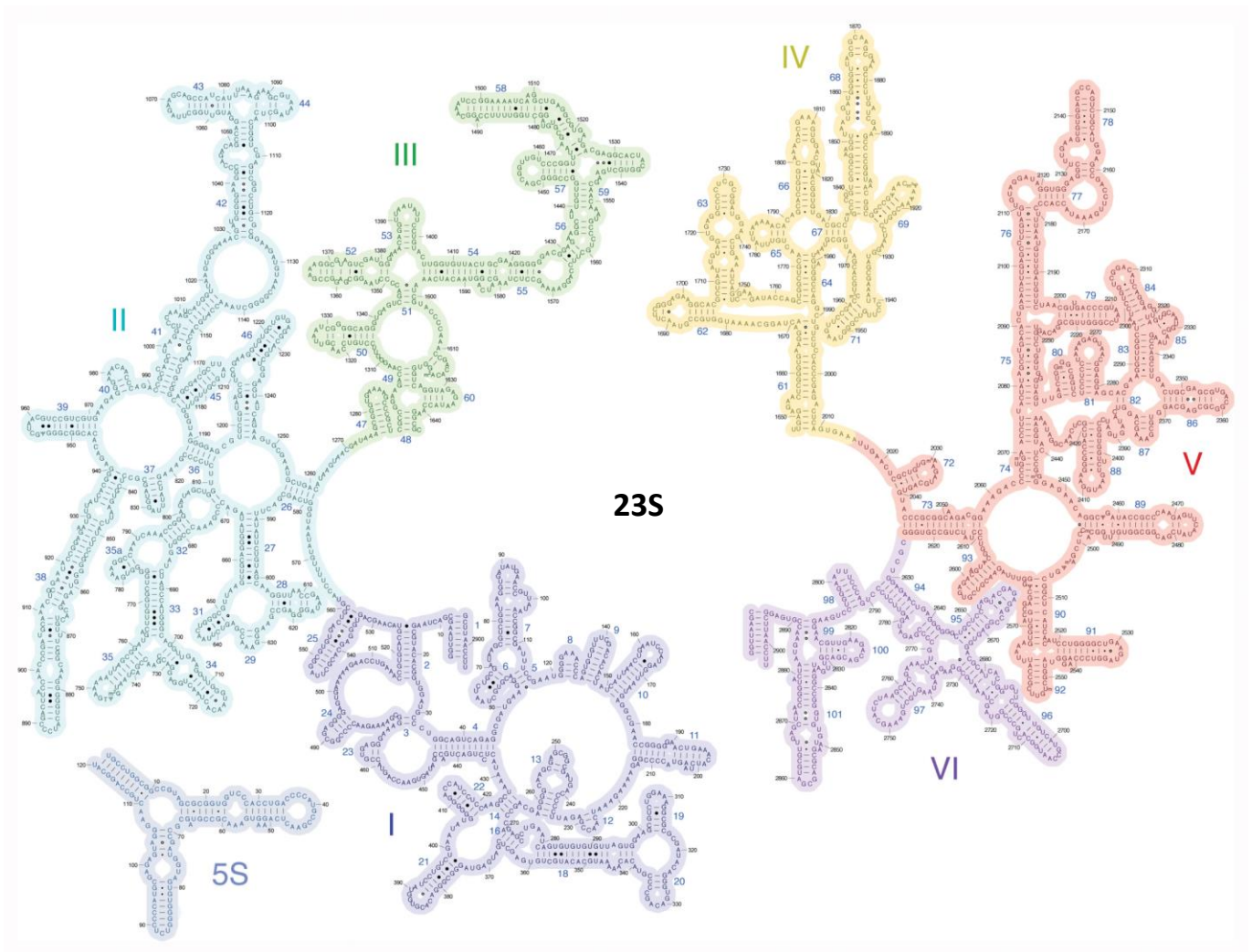


Рис. 59. Структура 5S та 23S рРНК з великої субодиниці *Escherichia coli*.

Каталізована рибозимом пептидилтрансферазна реакція являє собою кислотно/основний каталіз з перенесенням протону (**рис. 60**). Ключовим для такого перенесення є залишок аденозину, який приймає на себе атом водню з аміноацил-тРНК. У кінцевому рахунку протон приєднується до карбонільної групи естерифікованої пептидил-тРНК. Всі нуклеозиди, залучені до функціонування активного сайту 23S рРНК, формують висококонсервативні послідовності, що є доказом фундаментальності механізму утворення пептидних зв'язків.

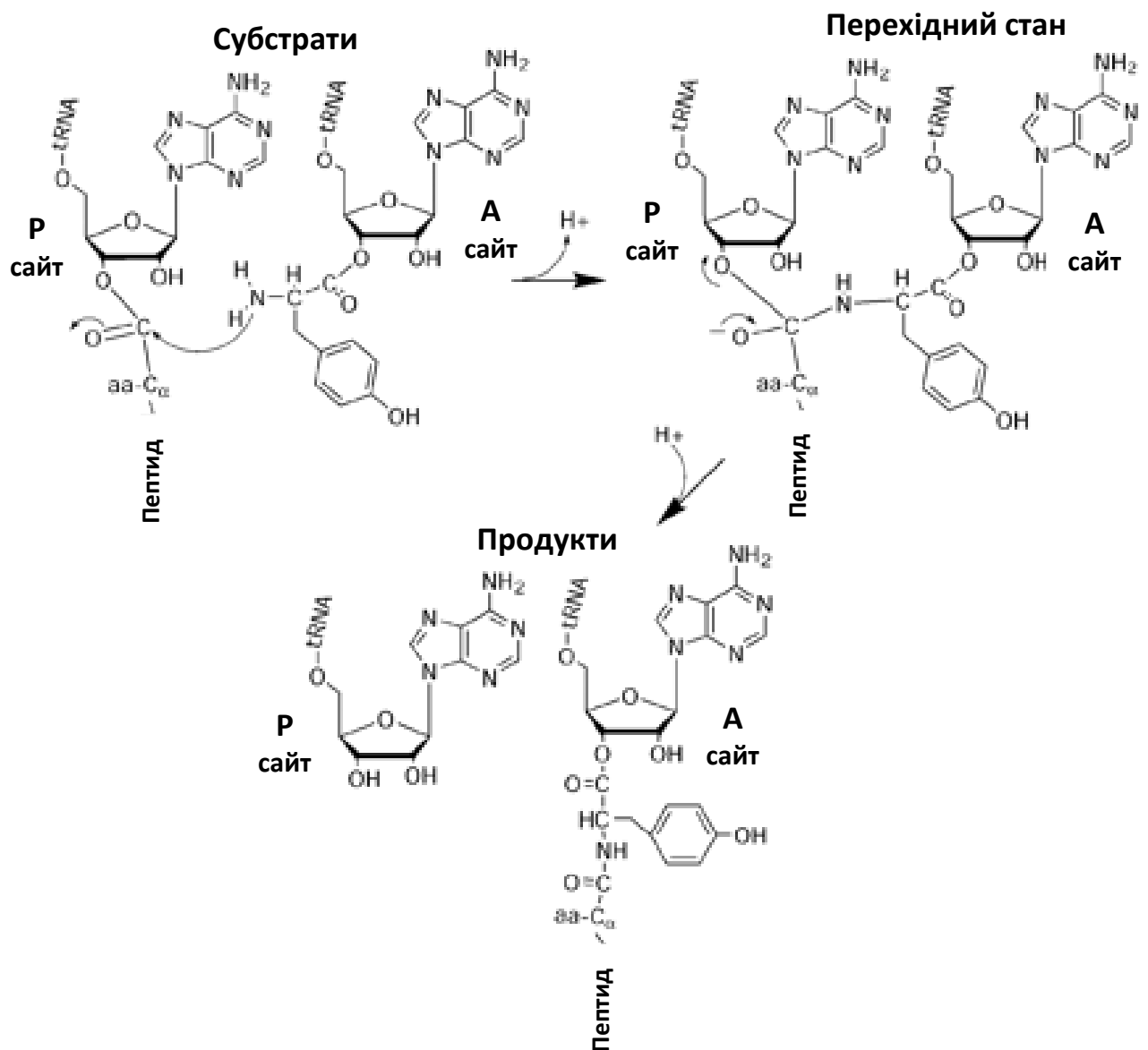


Рис. 60. Схема пептидилтрансферазної реакції.

5.10. Визначення структури цілих рибосом

У 2005 році групою Шавірта була отримана повна кристалічна структура 70S рибосоми з *Escherichia coli* (табл. 18). Оскільки кристалографічно було виявлено дві незалежні форми рибосомальних субодиниць, на основі цих результатів запропоновано два основних плани будови рибосоми. Ці плани між собою відрізняються незначно, наприклад, у першій моделі мала субодиниця обернена на 6⁰ навколо так званого «шийного» регіону, що поєднує малу та велику субодиниці рибосоми, коли у другій такого оберту не виявлялося. Обидві з вищезазначених структур відрізнялись від кристалічної 70S рибосоми з бактерії *Thermus thermophilus*, отриманої Селмером у 2006 році за роздільної здатності 0,28 нм (табл. 18), яка була отримана у комплексі з тРНК та частиною мРНК.

5.11. Рибозими та особливості їх структури

Здатність певних послідовностей молекул РНК до каталізу нуклеазної реакції, що і визначило активність рибозимів, як таку, і поклало початок їх активному вивченню, спершу була виявлена для **наступних категорій РНК**:

- 1) **Перша група інтронів аутосплайсингу** – найперша група рибозимів, отримана зі джгутикових протистів роду *Tetrahymena* та охарактеризована Чехом, Зангом і Градовськи ще у 1981 році. Ці інтрони містять чотири консервативних послідовності, що формують унікальну вторинну структуру. Гідроліз, як правило, починається з нуклеофільної атаки на фосфодиефірний зв'язок з боку гуанозинового залишку консервативної послідовності у складі інтрону. Реакція відбувається у межах однієї молекули, звідси й назва.
- 2) **Друга група інтронів аутосплайсингу** – також має консервативні послідовності, які, однак, характеризуються відмінностями вторинної структури і мають свої особливості механізму каталізу, який також включає нуклеофільну атаку з боку аденозину, що розташований всередині консервативної послідовності інтрону.
- 3) **Нуклеотидна частина рибонуклеази Р (КФ 3.1.26.5)** – унікальний фермент, який за допомогою рибозимної активності приймає участь у обмеженому нуклеолітичному процесингу попередників тРНК (**рис. 61**).
- 4) **Ділянки аутогідролізу сателітних РНК рослинних вірусів** – коротші, ніж групи інтронів I та II, мають унікальну вторинну структуру. Найбільш відомим представником є **хамерхед (Hummerhead)**, розглянутий нижче.
- 5) **Рибосомальна РНК (рРНК)** у складі рибосом, а саме – **домен V (пептидилтрансферазний)** у складі нуклеотидного компоненту великої субодиноці, про що мова вже йшла в одному з попередніх підрозділів.

Хамерхед був виявлений двома незалежними групами вчених – Плеєм, Флаєрті та МакКеем у 1994 році, та Скоттом, Фінчем та Клагом у 1995 році. Хронологічно перша з цих структур була заблокована ланцюгом ДНК з псевдо-сайтом розщеплення. Оскільки рибозими не розщеплюють ДНК, така послідовність відіграє роль ефективного інгібітора. Тому перший приклад хамерхеду був отриманий в якості комплексу рибозиму з інгібітором. Друга структура хамерхеду не мала ДНК, а в активному сайті містила цитидин з метильною групою у положенні C2' замість гідроксильної. Взагалі ж дані структури мають вигляд трьох дуплексів в А-формі з центральним регіоном, який складається з двох функціональних доменів з консервативними послідовностями. В цілому третинна структура хамерхеду нагадує невеличку «двозубу вилочку» (**рис. 62**).

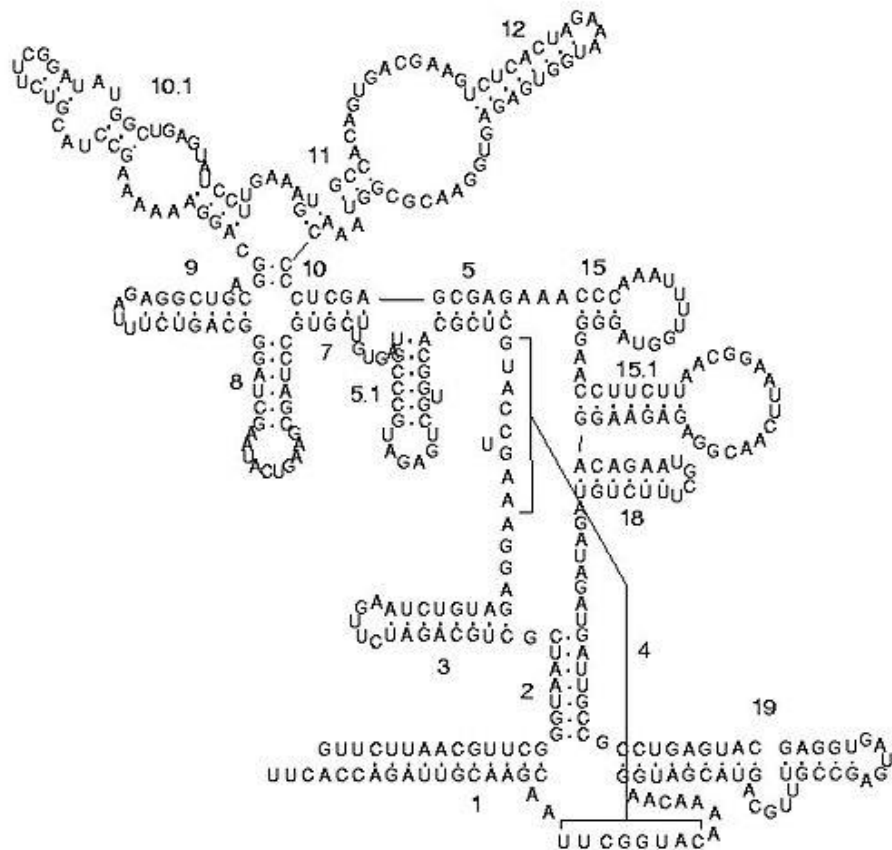


Рис. 61. Структура нуклеотидної частини РНКазы Р класу В з *Bacillus subtilis*.

Послідовність з двох нуклеотидів **СА** у складі рибозиму є сайтом аутокаталітичного розщеплення та розташована на верхівці двох стебел, що пересікаються під прямим кутом, у місці різкого повороту кістяка, якраз навпроти уридину у першому домені, який сформований консервативною тетрануклеотидною послідовністю **CUGA**. Така **U-подібна конформація** є схожою на конфігурацію антикодонової та псевдоуридинової петель тРНК. Другий домен хаммерхеда розташований навпроти першого, на з'єднанні двох стебел та містить скорочений тандем некласичних пуринових пар А-Г. Цей домен потрібен для підтримання правильного розташування каталітичного домену (першого) по відношенню до субстрату, тобто іншої прилеглої ділянки самого рибозиму.

Загальний механізм каталізу хаммерхеда включає у себе **нуклеофільну атаку з боку 2'-ОН-групи цитидину на атом фосфору** найближчого прилеглого фосфодієфірного зв'язку у цукровофосфатному кістяку. Було також виявлено, що у даному процесі важливу роль відіграють йони металів, а саме –магній. Цей йон

розташовується близько до неканонічних пар A-G, що дозволяє припустити роль магнію у якості стабілізуючого фактора конформації, потрібної для аутокаталізу.

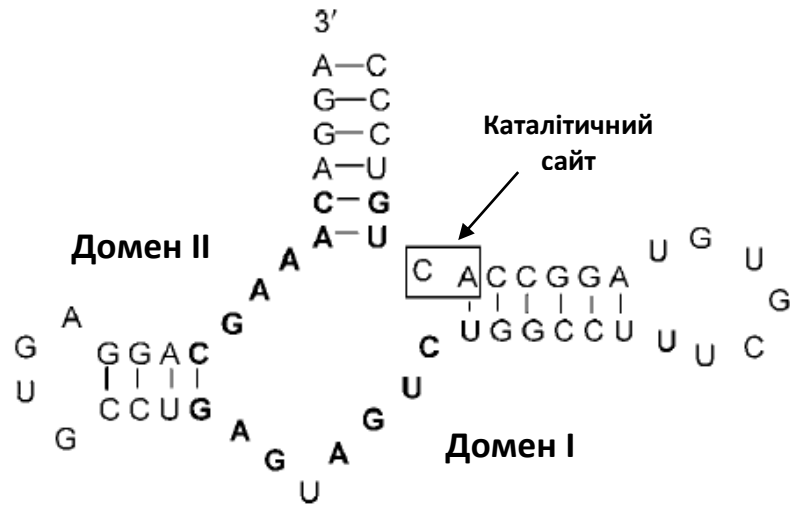


Рис. 62. Схематична будова хамерхеда.

Гіпотеза, висловлена Ліллі у 1999 році, передбачає безпосередню участь йонів магнію у процесі нуклеолітичного каталізу хамерхедом. Виявилось, що чотири йони Mg розташовані у декількох варіабельних позиціях всередині активного сайту. Це дозволяє припустити, що Mg^{2+} відіграє роль допоміжного йону у русі електронів, можливо, за рахунок стабілізації груп, що приймають участь у розщепленні (рис. 63).

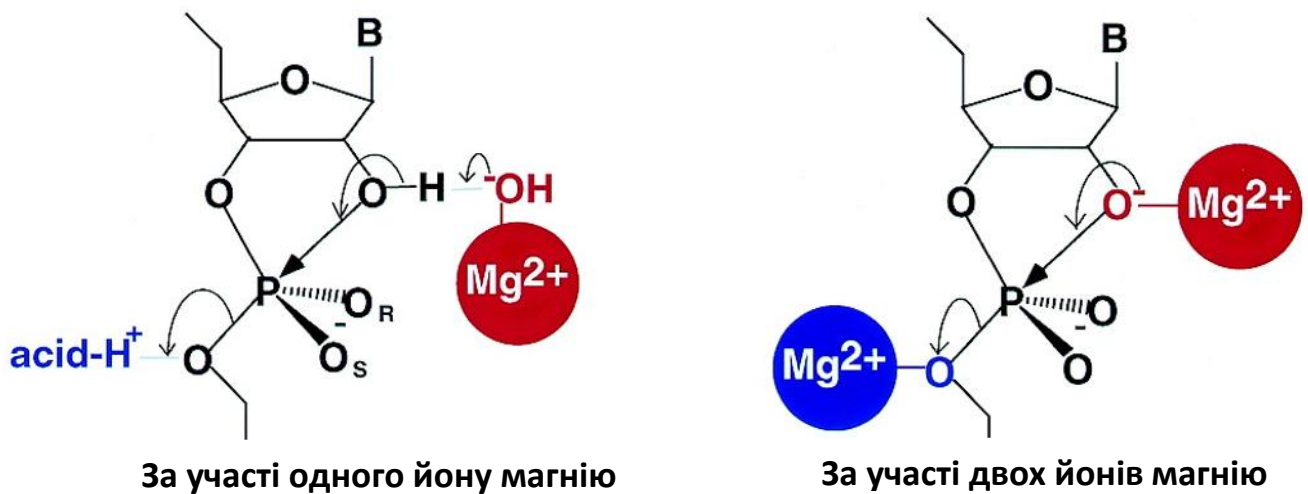


Рис. 63. Схеми участі йонів магнію у каталізі за участі хамерхеда.

У ході досліджень, проведених Фейгом, Скоттом та Уленбеком у 1998 році, виявилося, що йони тербію інгібують каталітичне розщеплення за участю рибозиму. Структура комплексу хамерхеду з цими йонами показала, що Tb^{3+} локалізований наближено до активного сайту, біля залишків G5 та A6, а не у самому каталітичному центрі сайті, як Mg^{2+} .

На **рис. 64** представлені структури здатних до аутоноклеолітичного розщеплення інших форм рибозимів з групи сателітних РНК.

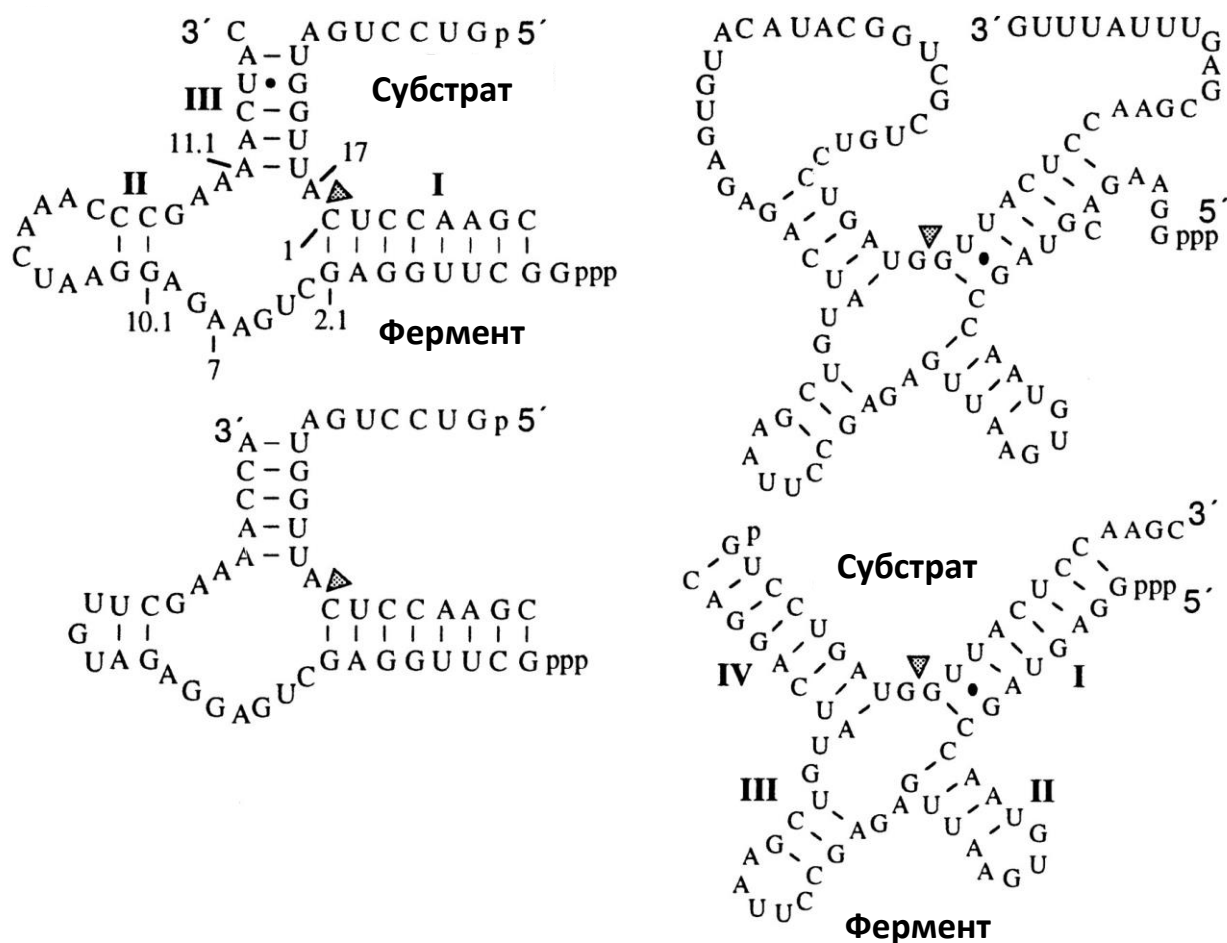


Рис. 64. Варіанти структури рибозимів, споріднених з типом хамерхед. Темним трикутником позначені сайти розщеплення.

Регуляція активності хамерхеду та подібних йому відносно простих рибозимів є достатньо перспективним у плані вивчення функціонування нуклеїнових кислот. Підходи для здійснення такого контролю можна розбити на декілька типів. Стратегія **алостеричного контролю (рис. 65, А)** передбачає застосування аптамеру для приєднання позитивного або негативного ефектора активності рибозиму.

Інгібіторний контроль (рис. 65, Б) включає в себе застосування певної білкової сполуки для переключення між активним і заблокованим станом хамерхеду. Пригнічення знімається за рахунок взаємодії цього білку з інгібіторною послідовністю рибозиму, яка за умов інгібування стерично блокує субстрат. **Стратегія «захоплення» атенюатора (TRAP Strategy, рис. 65, В)** полягає у використанні спеціальної ефекторної олігонуклеотидної послідовності, яка змінює конформацію хамерхеду за рахунок комплементарної взаємодії з атенюаторним ланцюгом, що призводить до посилення активності рибозиму. І, нарешті, метод **розширеної регуляції (Expansive Regulation, рис. 65, Г)** включає в себе комплементарну безпосередню взаємодію олігонуклеотидного ефектора з субстратним ланцюгом, що підвищує активність хамерхеду. Всі типи контролю здійснюються зворотно.

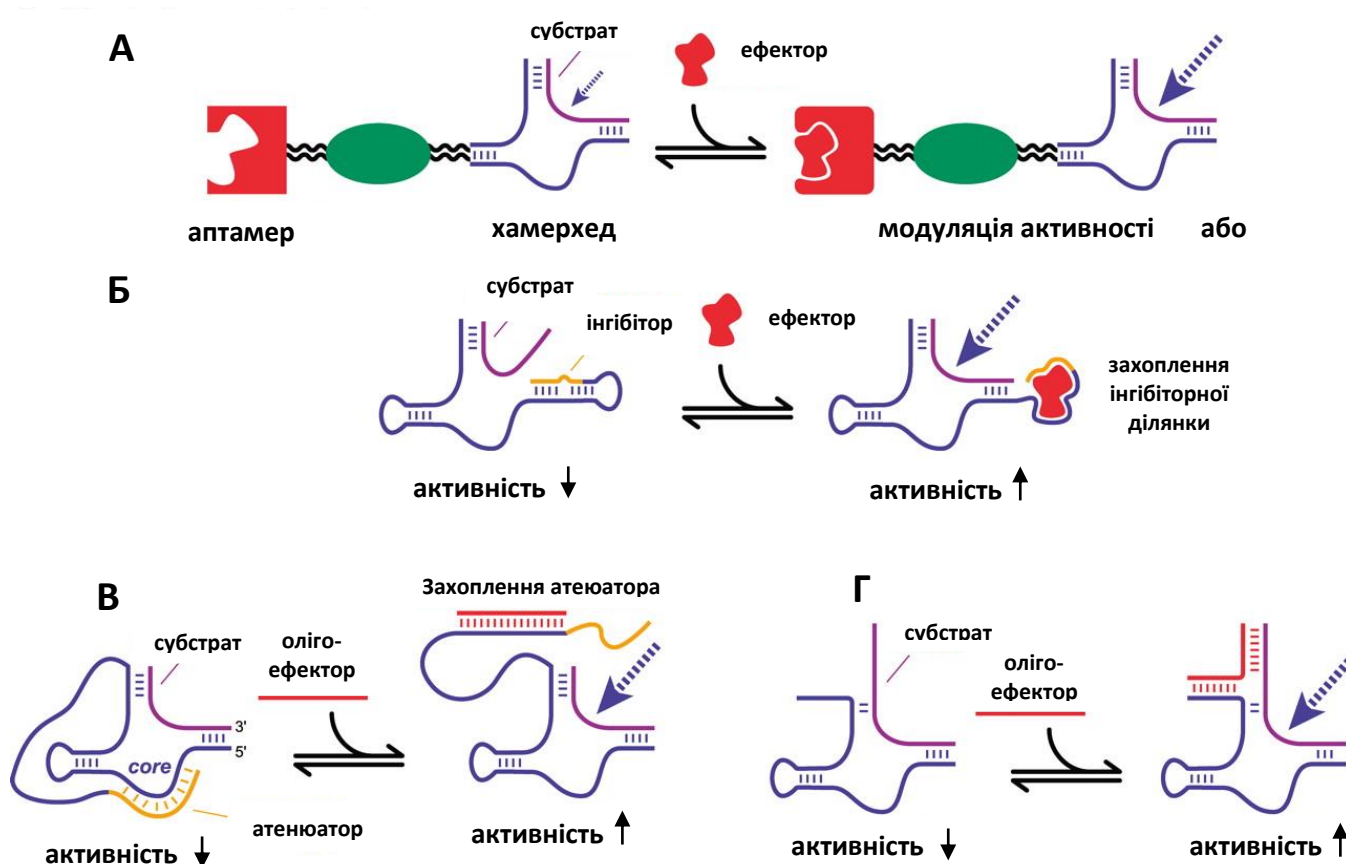


Рис. 65. Типи контролю нуклеолітичної активності рибозимів типу хамерхед (пояснення у тексті).

Вивчення структури складних рибозимів, як уже згадувалося, почалося у 1996 році з кристалізації **першої групи інтронів автосплайсингу**, яка відповідає **доменам P4-P6 інтрону Tetrahymena (рис. 66)**. Такий домен має у своєму складі десять хеліксів, стабілізованих петлями та сполученнями. Віценсом та Чехом у 2005 році було

показано, що каталітичний сайт є наближеним до одного псевдовузлового та двох сполучних регіонів. В цілому, інтрон Р4-Р6 складається з 160 нуклеотидів та має вигляд двох колінарних хеліксних регіонів. Також він має декілька унікальних ділянок РНК, серед яких варто відмітити збагачену аденозином опуклість, триланцюгове сполучення, а також тетра-петлю GAAA. Наближена організація «пакування» дуплексів РНК в Р4-Р6 та подібних йому складних рибозимах існує завдяки взаємодії між неспареними залишками аденіну, що приєднані одночасно до одного з дуплексів та до малої борозенки прилеглого, але розміщуються назовні хеліксу. Взагалі для переважної більшості великих складних рибозимів даного типу характерною є певна кількість неспарених залишків аденіну.

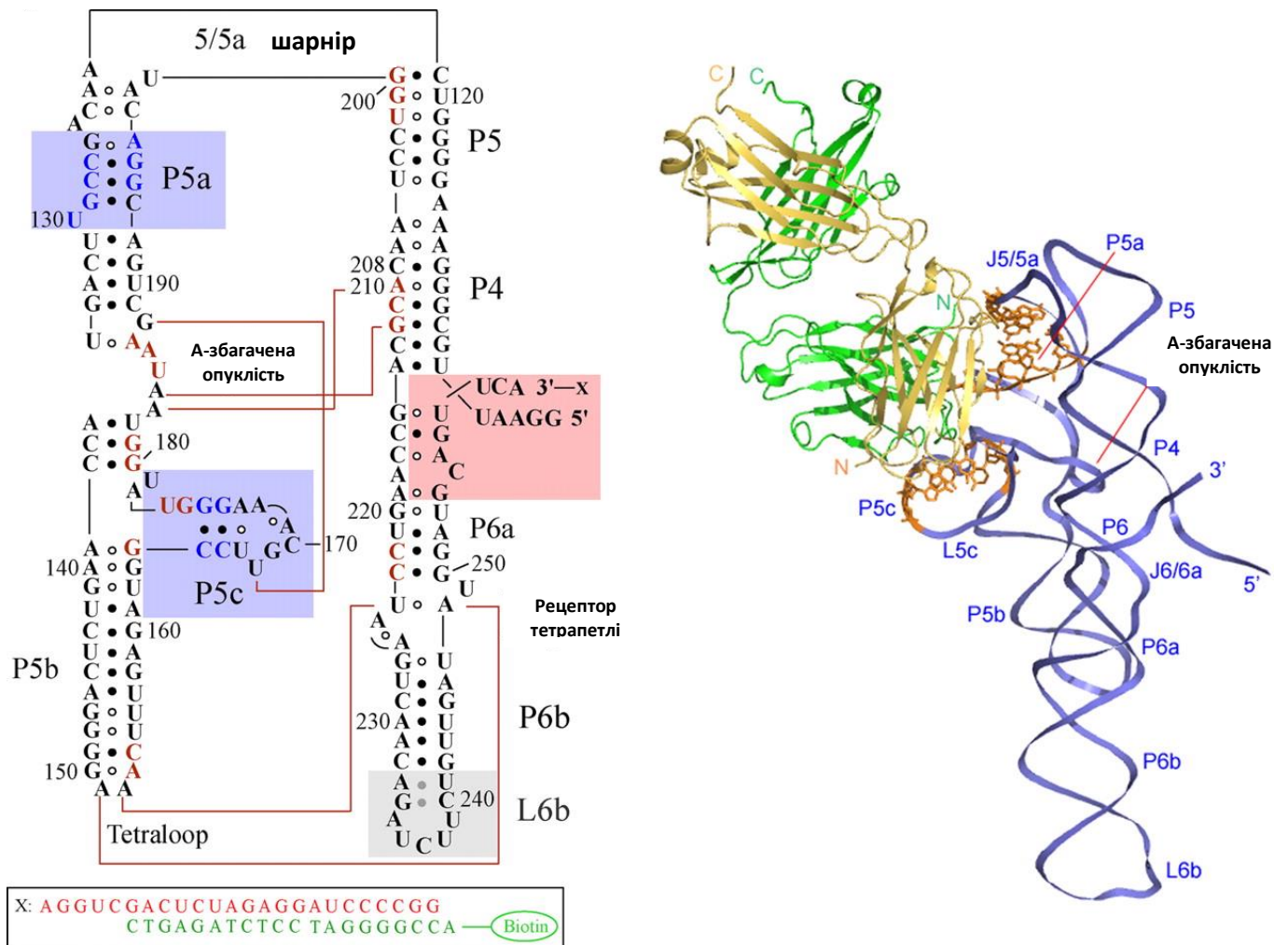


Рис. 66. Будова інтрону Р4-Р6 аутосплайсингу з *Tetrahymena*.

Ще одним варіантом складного рибозиму для каталізу розщеплення РНК виступає **ділянка геному вірусу гепатиту D HDV (Hepatitis D Virus)**. Ця дуже складна структура утворена п'ятьма дуплексними регіонами, які разом формують великий подвійний псевдо-вузол (**рис. 67**). Така псевдовузлова ділянка являє собою повторюваний регіон РНК, що включає в себе одноланцюговий сектор та петлю, які взаємодіють між собою водневими зв'язками, утвореними двома сусідніми хеліксами. Така будова є унікальною навіть серед для рибозимів, оскільки активний сайт знаходиться глибоко всередині корової частини, утвореної п'ятьма дуплексами.

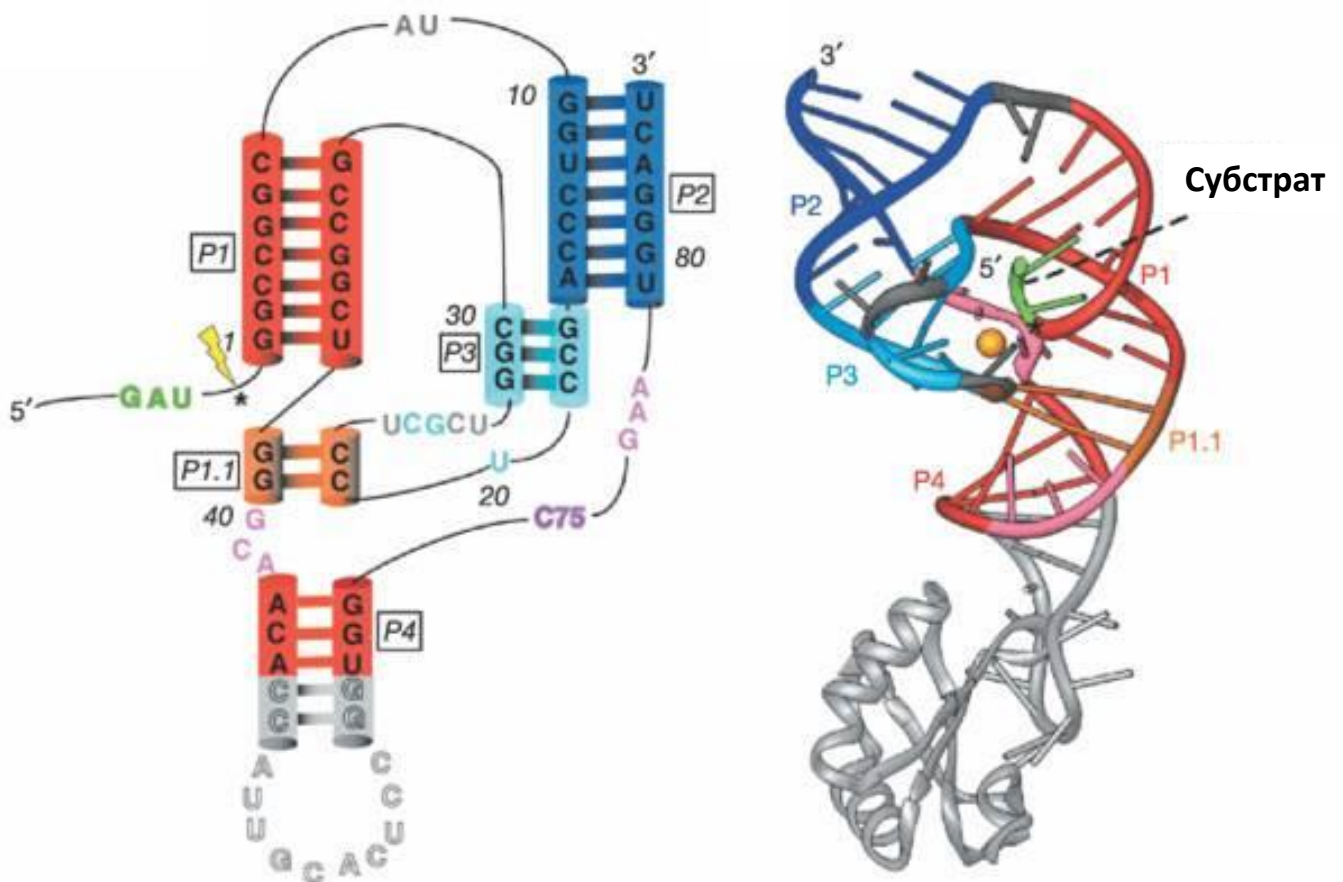


Рис. 67. Будова рибозимної ділянки РНК-геному вірусу гепатиту D.

Нарешті ще одним яскравим прикладом складного рибозиму є **«шпильковий» рибозим**. Цей комплекс за властивостями схожий на ферменти, що використовують активовані фосфатні групи, наприклад, на рибонуклеазу. «Шпильковий» рибозим складається з чотирьох-стеблового сполучення, яке формує центр структури. Будова його дуплексів на сьогодні вивчена недостатньо, хоча виявлено, що у процесі організації таких ділянок у зрілий рибозим вони значно змінюються конформаційно.

У **табл. 19** представлені отримані у кристалічній формі рибозими, про які мова йшла вище.

Таблиця 19. Отримані на сьогодні кристалічні форми рибозимів.

Рибозим	Номер у базі PDB	Номер у базі NDB
Хамерхед	299D	URX057
Інтрон Р4-Р6	1GID	URX053
Рибозим з Tetrahymena	1GRZ	UR0003
Ділянка геному HDV	1DRZ	PR0005
Шпильковий рибозим	1M5K	PR0038
РНКаза Р	2A2E, 2A64	UR0064, UR0065
Інтрон першої групи	1ZZN	PR0170
Рибозим-лігаза	2OIU	UR0110

5.12. Рибосвітчі

Відкриття того факту, що послідовності у 5'-UTR (нетрансльовані регіони) певних бактеріальних мРНК здатні **регулювати експресію генів за механізмом «on/off»** навіть за відсутності білків, мало велике функціональне та потенційне терапевтичне значення і започаткувало напрямок дослідження так званих **рибосвітчів (riboswitch)** або молекулярних «перемикачів» стану генної і білкової експресії (**рис. 68**).

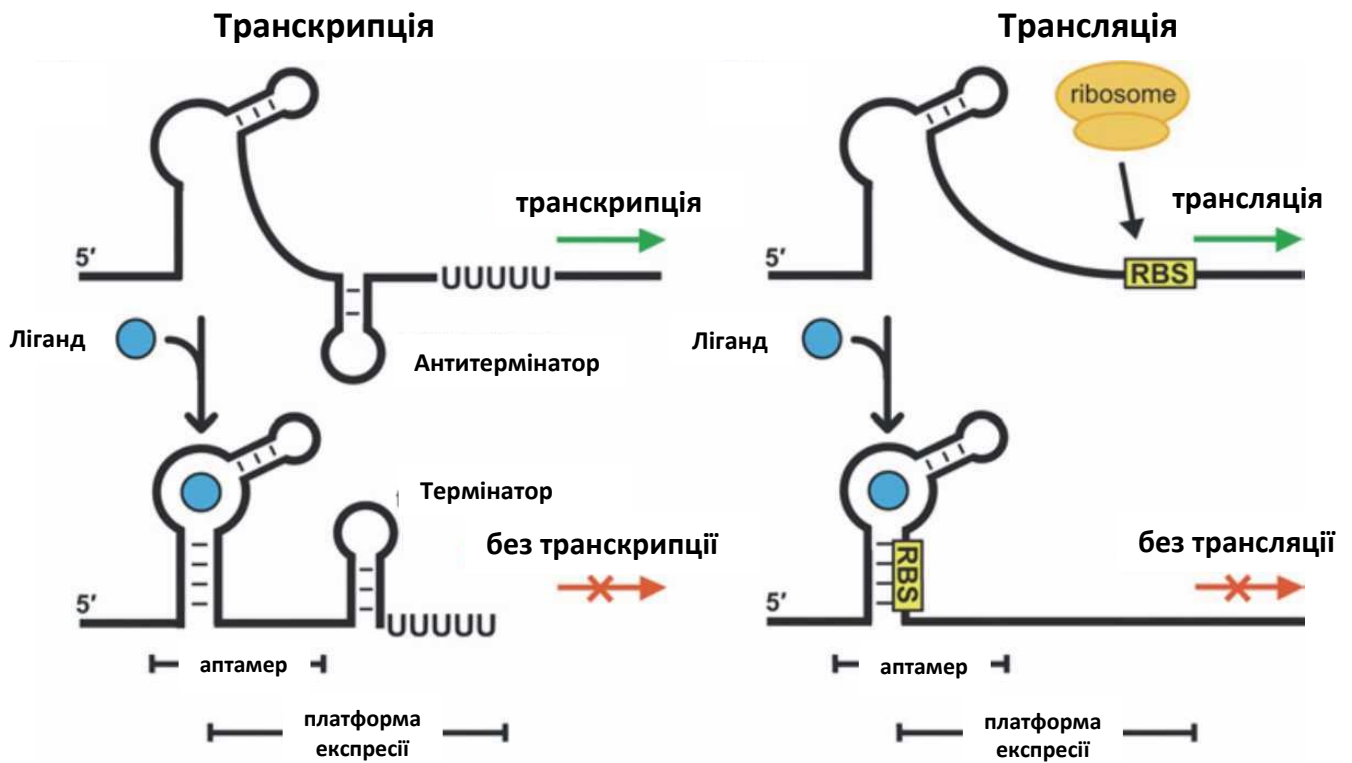


Рис. 68. Механізм регуляції транскрипції та трансляції рибосвітчами.

Вінклером зі співробітниками у 2004 році було виявлено, що рибосвітчі здатні регулювати експресію генів бактерій через суттєві зміни власної конформації. Індуковані певними ендогенними низькомолекулярними метаболітами. У 2007 році Чеєм з колегами було показано існування рибосвітчів у клітинах еукаріот, де їх можливою функцією вважається регуляція механізмів сплайсингу РНК.

Низькомолекулярними активаторами рибосвітчів вважаються пуринові основи, кофактори (тіамінпірофосфат), похідні амінокислот (S-аденозилметіонін), тощо. Як видно з **рис. 68**, переважна більшість рибосвітчів містить **два ключових домени:**

- **Аптамерний компонент** – для зв'язування з лігандами,
- **Платформа експресії** - ділянка, яка функціонально і просторово пов'язує індуковані лігандом конформаційні зміни з модуляцією експресії генів.

На **рис. 69** представлена структура достатньо розповсюджених рибосвітчів, контрольованих з боку SAM (S-аденозилметіоніну).

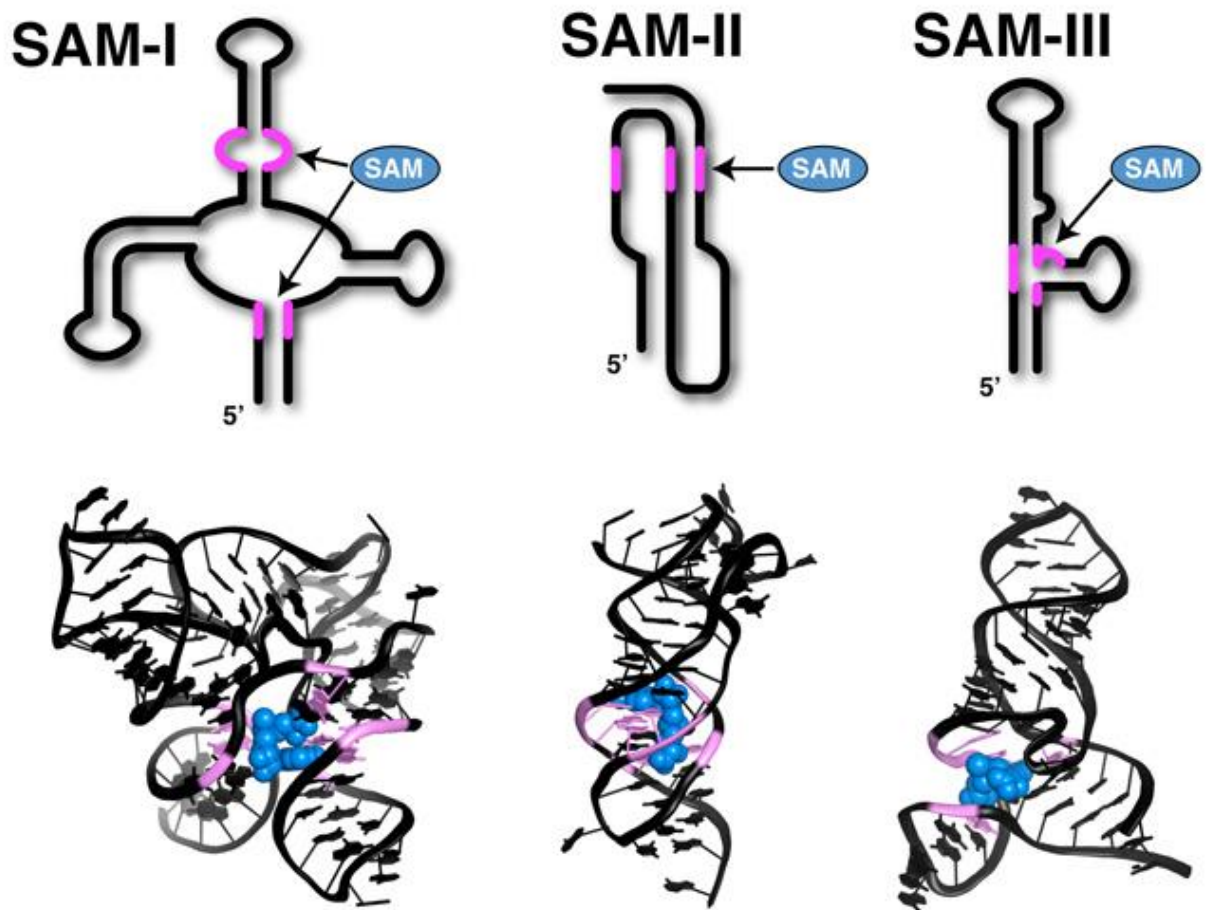


Рис. 69. Схематична будова рибосвітців, модульованих S-аденозилметіоном.

Будова рибосвітців вперше була показана на прикладі кристалічної структури **гуанін-чутливого рибосвітча оперону *xptpbx* бактерії *Bacillus subtilis***. Цей рибосвітч був отриманий Бейті, Джилбертом та Монтагом у 2004 році, причому він був зв'язаний з гіпоксантином - похідним гуаніну. Рибосвітч у своїй основі мав два паралельні хеліксів, названі P1 та P2, які були поєднані між собою за допомогою водневих зв'язків і на верхньому боці сполучалися петлями. На нижньому боці структури рибосвітча розміщувався аптамер у вигляді «кишені» для ліганду (G), яка формувалася за рахунок тристеблого сполучення вже згаданих дуплексів P1 та P2 з третім елементом структури - хеліксом P3 (**рис. 70**).

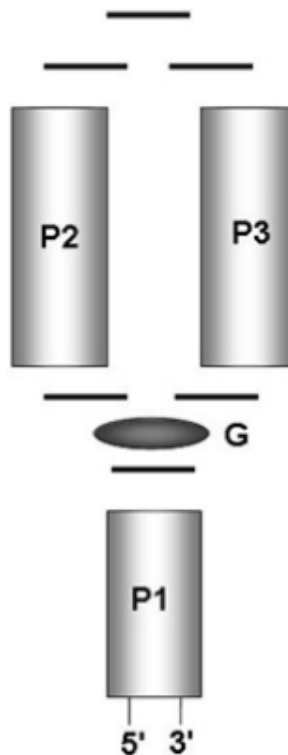


Рис. 70. Схематична структура гуанін-залежного рибосвітча з *B. subtilis*.

Загалом, рибосвітчі можна поділити на **дві групи**:

- 1) **Негативні («on-off») рибосвітчі** - «вимикають» експресію геному після приєднання ліганду. Тобто, такий рибосвітч є негативним регулятором експресії. Яскравим прикладом є розглянутий вище гуанін-чутливий рибосвітч. Згідно даних Серганова з колегами, отриманих у 2004 році, ліганд (G) у такому рибосвітчі повністю «закритий» усередині структури та формує велику кількість водневих зв'язків з оточуючими основами РНК, що належать до висококонсервативних послідовностей.
- 2) **Позитивні («off-on») рибосвітчі** – навпаки, «вмикають» експресію генів у відповідь на зв'язування з лігандом. Це може відбуватися, наприклад, шляхом інгібування формування термінаторного стебла транскрипції за присутності ліганду. Відповідно, у відсутності ліганду термінаторне стебло утворюється без перешкод (**рис. 68**). Такі рибосвітчі, більшість з яких реагує на аденін, є позитивними регуляторами експресії геному.

Варто відмітити, що обидва типи рибосвітчів формують подібну третинну структуру навіть за умови ідентичності нуклеотидних послідовностей лише на 59%.

Ще одним особливим варіантом рибосвітчів є залежні від коферментів, наприклад, тіамініпрофосфату (ТПФ), через це вони отримали назву **thi-боксів (thi-box)**. У 2006 році трьома незалежними групами дослідників - Едвардсом та

Ферре-Д'Амаре, Сергановим з колегами, та Торе, Лейбандгустом та Бенном - було отримано кристалічних структури такого thi-боксу. За винятком невеликих варіацій послідовностей у неконсервативних регіонах всі вони виявилися дуже схожими, тобто, являли собою Y-подібну молекулу, яка складається з двох нерегулярних хеліксів з петлями. Ці два хелікси поєднані між собою та приєднані до третього, формуючи тристеблове сполучення (**рис. 71**).



Рис. 71. Схема будови ТПФ-залежного рибосвітча типу «thi-box».

ТПФ у такій структурі приєднується у **спеціальній аптамерній «кишені»**, яка оточена консервативними послідовностями основ, та тримається у даному сайті за допомогою водневих зв'язків з основами та через взаємодії з катіонами металів, в основному, магнію, з боку пірофосфатного хвоста ліганду.

У **таблиці 20** представлено кристалічні структури рибосвітчів, отримані до останнього часу.

Таблиця 20. Кристалізовані рибосвітчі.

Рибосвітч	Номер у базі PDB	Номер у базі NDB
SAM-залежний	2GIS	UR0082
Гуанін-залежний + гуанін	1Y27	UR0052
Гуанін-залежний + гіпоксантин	1U8D	UR0039
ТПФ-залежний + ТПФ	2CKY, 2H0J	UR0098, UR0099

РОЗДІЛ 6. Взаємодія нуклеїнових кислот з білками

Нуклеїнові кислоти у своїй будові та функціях майже нерозривно пов'язані з білками, прикладом чого можуть слугувати **наступні процеси:**

- **Формування третинних та вищих порядків** структури ДНК (хроматин) та РНК (рибосоми) – здійснюється через взаємодію зі структурними та регуляторними білками.
- **Реплікація ДНК, транскрипція та трансляція РНК, дозрівання** цих молекул – потребує спеціалізованих ферментів та інших видів білків окремо або у комплексах.
- **Регуляція експресії генів на молекулярному рівні** – необхідною є взаємодія ДНК з широким спектром специфічних та неспецифічних регуляторів, переважна більшість з яких – білкові сполуки.
- **Репарація ДНК** - також проходить із залученням великої кількості білків, які взаємодіють з пошкодженими регіонами молекули, здійснюючи розпізнавання та елімінацію помилок.

За останні роки вивчення механізмів розпізнавання та взаємодії білків з нуклеїновими кислотами зазнало потужного поштовху, в основному, за рахунок активних досліджень структури нуклеопротеїнів методами ЯМР та кристаллографії. Наприклад, у 1997 році у базі даних PDB існував 241 комплекс ДНК з білками, а станом на червень 2007 року - вже 1789. У 2006 році Куммерфельдом та Тейхманом було виявлено, що на 22983 гени геному людини (станом на кінець повної розшифровки у 2001 році) приходить лише 1489 відомих транскрипційних факторів, що також піднімає питання про особливості регуляції механізмів регуляції генної експресії білками.

У даному розділі механізми взаємодії нуклеїнових кислот будуть розглянуті на прикладі ДНК.

6.1. Функціональна класифікація білків, що приєднуються до ДНК

Білки, що приєднуються до ДНК, можна класифікувати як за структурними, так і за функціональними ознаками. Перший тип класифікації заснований на присутності спеціальних доменів для зв'язування, про які мова піде дещо пізніше, **функціонально** ж виділяють наступні **шість груп:**

- 1) **Регуляторні білки** – як правило, приєднуються до високо специфічних послідовностей у складі ДНК для контролю транскрипції певного гену або

групи генів. Можуть також зв'язуватися з загально відомими сигнальними ділянками, такими як 5'-ТАТА для більш широкої індукції транскрипції.

- 2) **Білки розщеплення (нуклеази)** - деякі з них (наприклад, ДНК-аза I) є низькоспецифічними до послідовності нуклеотидів, хоча характеризуються певною структурною селективністю по відношенню до ДНК. Інші, відомі під назвою рестриктаз, розщеплюють молекули лише за паліндромами або іншими специфічними ділянками.
- 3) **Репаративні білки** – відповідають за впізнавання, вилучення та нейтралізацію різноманітних пошкоджень ДНК, а також за поєднання розривів у ланцюгах.
- 4) **Топологічні ферменти** – білки, які здійснюють внесення або вилучення супервитків структури ДНК, що є особливо важливим для початкових етапів реплікації та транскрипції. Останнім часом з цієї групи білків особливу цікавість викликають топоізомерази ДНК у якості потенційних мішеней антипухлинної терапії.
- 5) **Структурні білки** – підтримують цілісність згорнутої або запакованої у хроматин ДНК, а також рибонуклеопротейдів, наприклад, рибосом; яскравим прикладом є гістони, а також ряд негістонових білків.
- 6) **Білки синтезу і процесингу** – відповідають за синтез дозрівання нових молекул ДНК та РНК. Сюди відносяться ДНК- та РНК-полімерази, які використовують нуклеїнові кислоти у якості матриці для синтезу нових полінуклеотидів. Специфічність послідовності для даної категорії білків практично не має значення, важливішим є тип матриці.

6.2. «Зчитування» ДНК білками

Більшість з груп білків, наведених у попередньому підрозділі, є специфічними до послідовності. Потрібна послідовність зчитується ними, в основному, через формування додаткових водневих зв'язків бічних радикалів амінокислот білку з бічними групами основ у парах в складі ДНК (**рис. 72**). Грані кілець та замісники основ є найбільш доступними у борозенках ДНК. Саме тому переважна більшість білків зв'язується саме з поверхнею борозенок - частіше великою, рідше - малою.

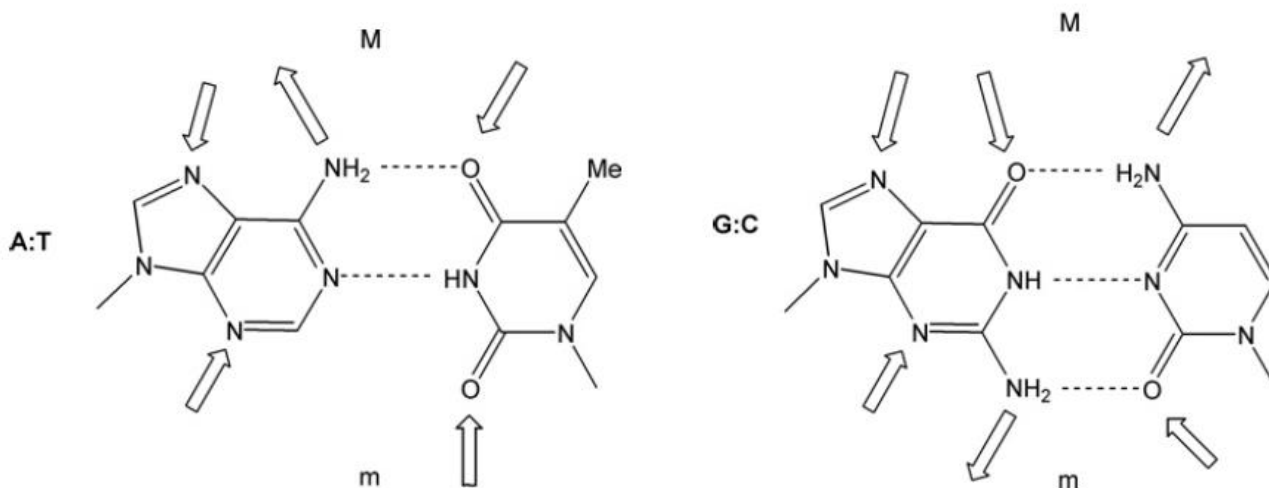


Рис. 72. Схема формування водневих зв'язків з парами основ у процесі зчитування ДНК білками. Стрілки показують напрямок «донор-акцептор» зв'язку. М та m – велика та мала борозенки відповідно

Загалом, існує **два основних варіанти «зчитування»** послідовності ДНК білком:

- 1) **Пряме** – здійснюється **за гранями основ** з формування **водневих зв'язків бічних груп цих основ з радикалами амінокислот білку**. При цьому велике значення має вид послідовності. Переважним місцем взаємодії білків з ДНК у цьому випадку є **велика борозенка**, яка є універсальним сайтом специфічного зчитування та розпізнавання послідовностей ДНК різними молекулами. Вона ж виступає у якості мішені для регуляторних та структурних білків, особливо тих, які індукують зігнутості або деформації ДНК, щоб забезпечити доступ до малої борозенки.
- 2) **Непряме** – відбувається **через цукрово-фосфатний кістяк**, або просто через фосфатні групи шляхом індукції **електростатичних взаємодій**. Наприклад, аніонна природа фосфатних груп дозволяє їм контактувати з поліпептидними ланцюгами, збагаченими на позитивнозаряджені амінокислоти з утворенням йонних зв'язків. При цьому послідовність основ не має основного значення, тому така взаємодія, на відміну від прямого зчитування, є неспецифічною.

Варто відмітити, що розпізнавання послідовності ДНК відбувається не лише по відношенню до класичних комплементарних пар основ за Уотсоном-Криком. У більшості випадків це дійсно так, але існують випадки зчитування неканонічних пар основ за Хугстіном. Прикладами **комплексів ДНК з білками**, в основі яких лежить взаємодія з неканонічними парами, можуть слугувати **наступні**:

- **Гомодоменний комплекс ДНК** з транскрипційним фактором **МАТ α 2** - отриманий у кристалічній формі Айшімою у 2002 році. Одна з пар основ А-Т у складі комплексу сформована за типом Хугстіна. Однак, пізніше з використанням ЯМР було показано, що у розчині з нативною ДНК такий комплекс не існує. Було зроблено висновок, що пара за Хугстіном стабілізувалася саме за рахунок короткочасного контакту ДНК з білком.
- **Комплекс еукаріотичної ДНК-полімерази з праймерною ділянкою ДНК** - отриманий Наїром з колегами у 2006 році. У цій структурі приєднання субстратного нуклеозидтрифосфату із зовнішнього середовища індукувало перехід аденозину та декількох прилеглих до нього гуанозинів поблизу активного сайту ферменту з анти- у син-конформацію, що перетворювало звичайну пару А-Т на пару за Хугстіном.

6.3. Особливості прямих контактів ДНК з білками

Пряме зчитування ДНК з білками, як уже відмічалось, обов'язково включає в себе водневі зв'язки між бічними ланцюгами амінокислот у складі білку та бічними радикалами основ, причому обидва види структур можуть виступати як донорами, так і акцепторами водневих зв'язків. У **табл. 21** вказано найбільш розповсюджені амінокислоти, радикали яких формують водневі зв'язки з основами ДНК.

Таблиця 21. Розподіл водневих зв'язків між основами ДНК і амінокислотами

Амінокислота	Гуанін	Цитозин	Аденін	Тимін
Аргінін	98	8	19	24
Лізін	30	6	4	9
Серин	12	2	1	3
Аспарагін	7	10	18	7
Глутамін	6	2	16	2
Глутамат	1	10	1	0

Іноді навіть групи, залучені до пептидного зв'язку безпосередньо контактують з фосфатними групами або основами ДНК, але такі контакти слугують, скоріше, для стабілізації комплексів і не є специфічними.

Переважає більшість контактів між білком та ДНК у ході прямого зчитування здійснюється через **атоми O6 та/або N7 гуанінів** у складі **пари G-C**. У цьому випадку водневі зв'язки основ формуються переважно з позитивно зарядженими групами довгих та гнучких бічних ланцюгів аргініну та лізину, амідними групами **аспарагіну та глютаміну**, або гідроксильною групою **серину** (рис. 73 та 74).

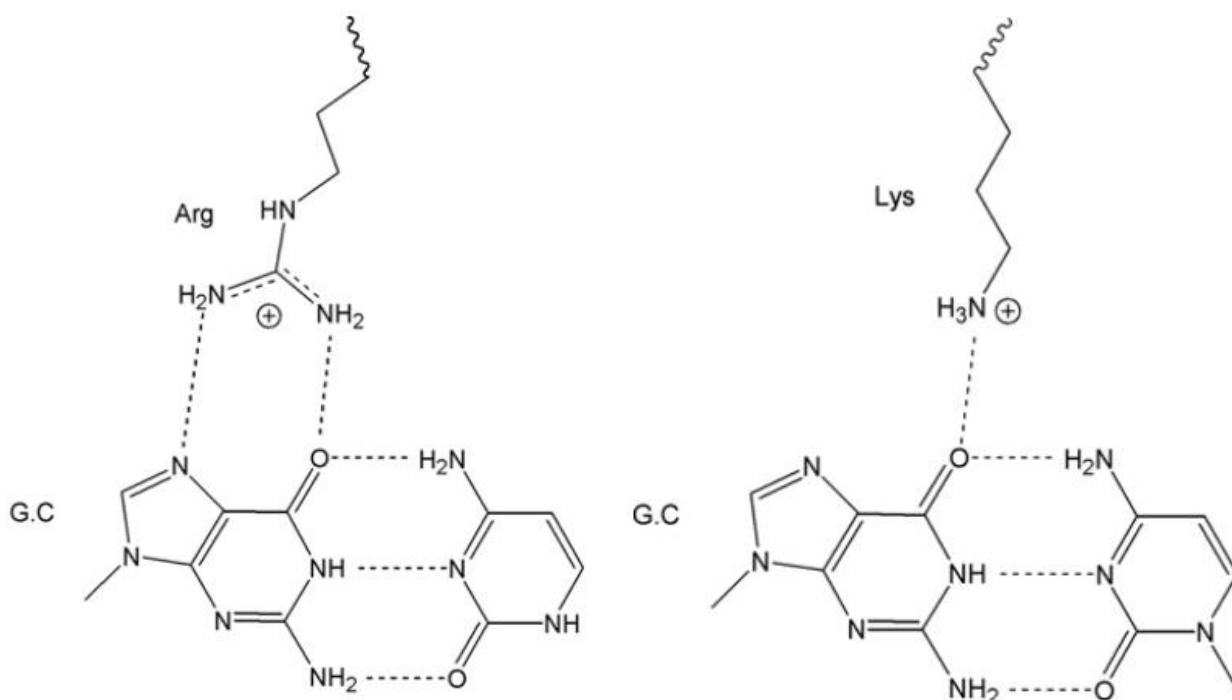


Рис. 73. Схема водневих зв'язків між парою G-C та аргініном або лізином.

Аденінові нуклеозиди впізнаються через **атоми N6 та/або N7** відповідної основи, хоча таке впізнавання відбувається рідше, ніж у випадку гуаніну (рис. 75). Також відомо, що піримідинові основи в цілому впізнаються менше, ніж пуринові.

Варто також відмітити, що **стехіометрія зв'язування** амінокислот з основами **не завжди дорівнює 1:1**, не виключенням є **бідентантні варіанти**, а також більш складні **полідентантні** (рис. 75 та 76). У цьому випадку формування водневих зв'язків одночасно з обома членами пари основ за Уотсоном-Криком не є поширеним. Як правило, лише один з нуклеотидів пари залучений до впізнавання. Також можливим є варіант приєднання бічного ланцюга амінокислоти одночасно до двох сусідніх основ у парах. Такий варіант демонструє селективність білків по відношенню до послідовності на рівні динуклеотиду. Наприклад, послідовність **TG** може розпізнаватися бічним ланцюгом **лізину** через приєднання до обох карбонільних груп у складі тиміну та гуаніну (рис. 76).

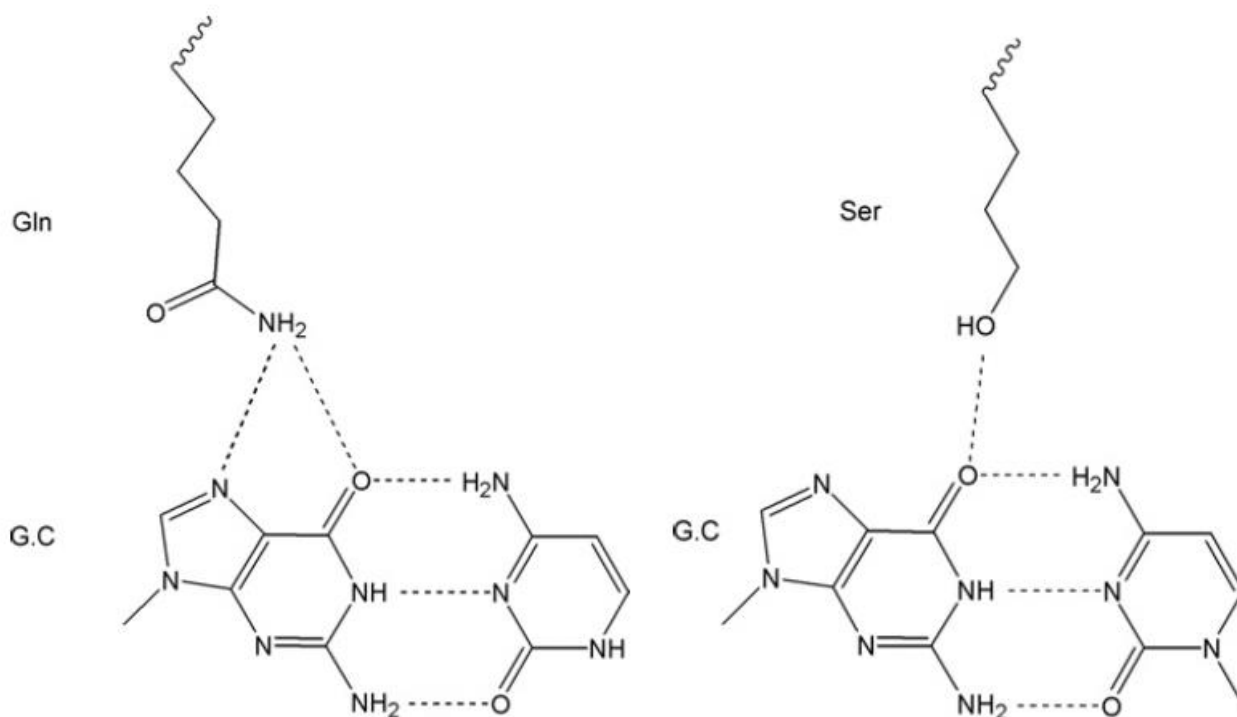


Рис. 74. Схема водневих зв'язків між парою G-C та глютаміном та серином.

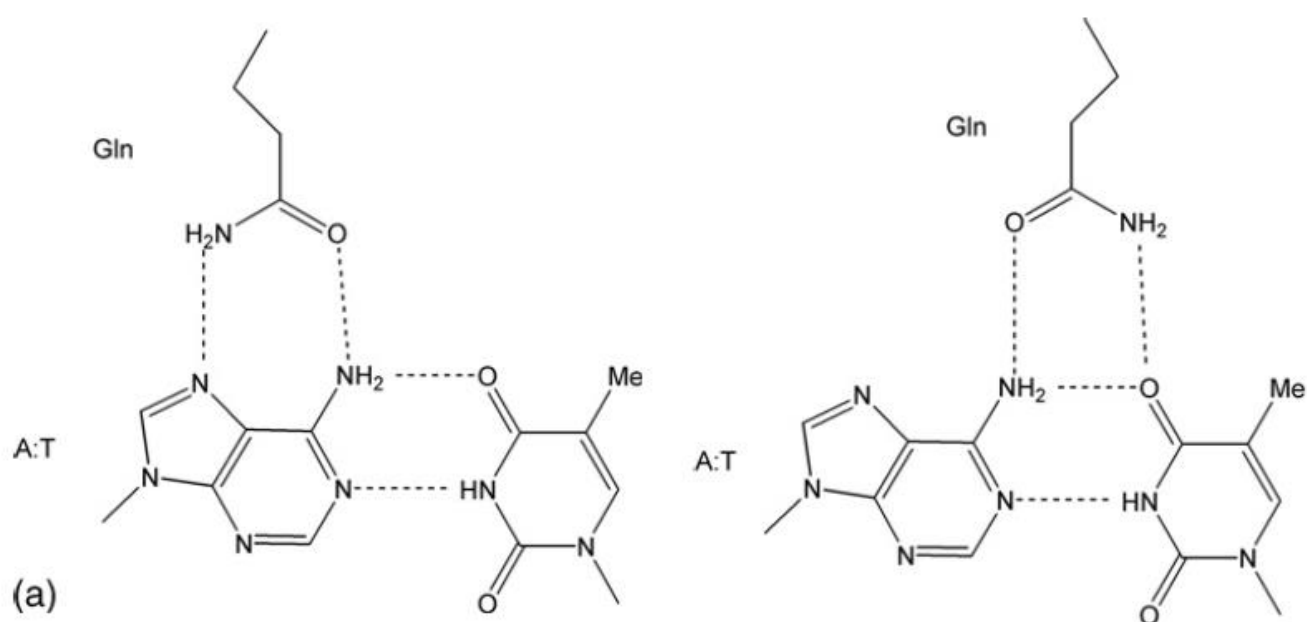


Рис. 75. Варіанти водневих зв'язків між парою A-T та глютаміном.

За умов формування полідентатних лігандів основи велике значення має послідовність. Так, заміна **TG** з останнього прикладу на **TA** або **TC** призвела до неправильного розташування карбонілів та до неможливості формування бідентатних зв'язків з лізином.

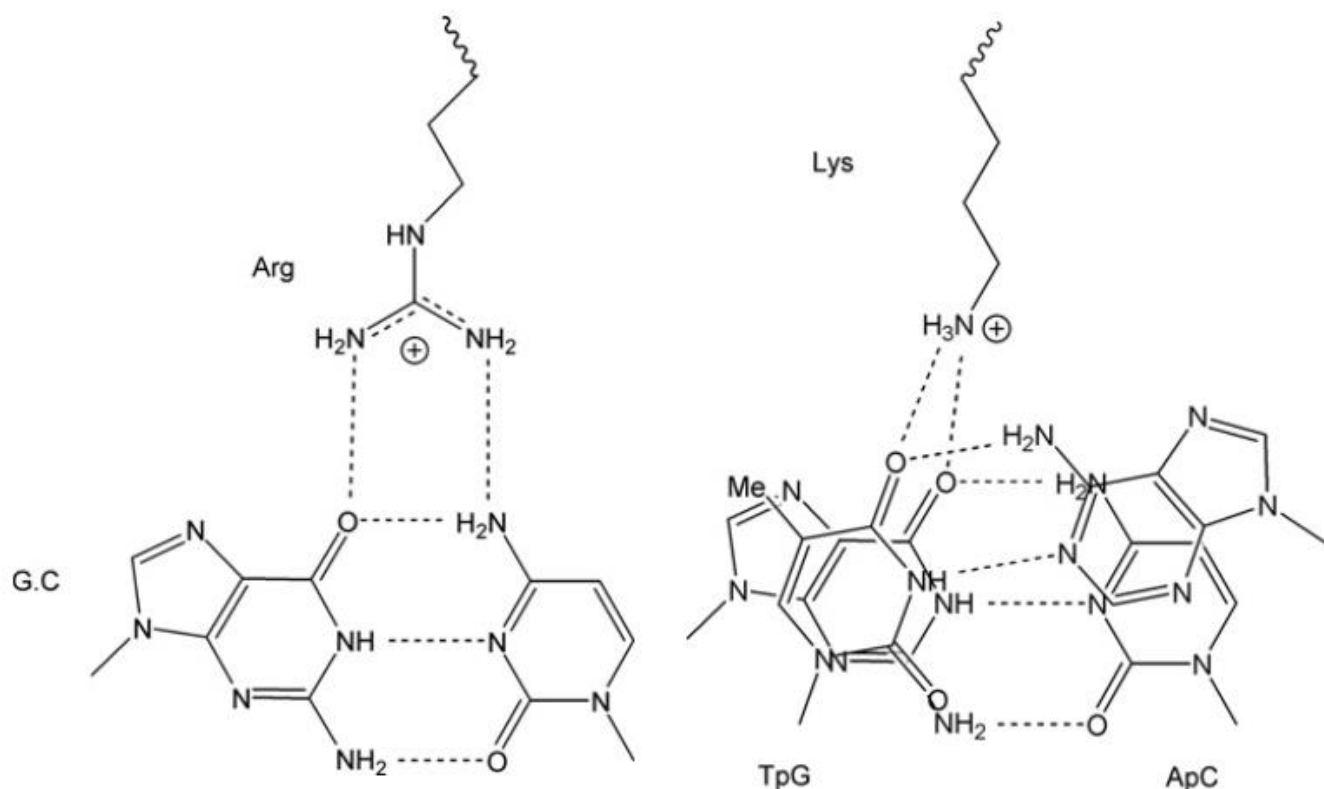


Рис. 76. Приклади бідентатного та тридентатного утворення водневих зв'язків.

Іноді учасниками прямого контакту між білками та ДНК виступають **молекули води**, які **опосередковують зв'язування**. Це можна спостерігати на прикладі комплексу **репресора-оператора trp з ДНК E.coli**, в якому було знайдено два звичайні контакти між основами ДНК та **аргініном і гуаніном**, а також три за посередництвом **молекул води**. Ще одним прикладом є інший комплекс - **репресора/оператора з бактеріофага λ**. В ньому **гідроксильна група Ser-45** прямо контактувала з атомами **Об та N7 гуаніну**, в той час як **карбонільний атом кисню** цього ж серину у складі пептидного зв'язку через одну молекулу води взаємодіяв як з **атомом N4 цитозину**, що був у парі як із гуаніном, так і з прилеглим до пари G-C залишком тиміну. Нарешті, як показали Сем зі співробітниками у 2004 році, у складі білкової частини **ексцизійного комплексу ДНК з бактеріофага λ (ексцизіонази)** існує унікальний регіон у вигляді так званого «**крилатого**» **хеліксу**, що містить **α-хелікс та β-«шпильку»**, і взаємодіє з великою борозенкою ДНК через густу сітку водневих зв'язків, опосередкованих молекулами води.

Існує декілька факторів, які не дозволяють жорстко співвіднести певні послідовності нуклеотидів до відповідних залишків амінокислот у комплексах ДНК з білками. Серед них можна відмітити **різну структуру ДНК** у таких комплексах, **різноманітність типів білків та білкових ділянок**, залучених до впізнавання

послідовностей ДНК, здатність метильних груп тиміну до **формування ван-дер-ваальсових взаємодій** з гідрофобними радикалами амінокислот, а також випадки розпізнавання однієї основи декількома амінокислотами в **полідентатних взаємодіях**.

6.4. Білкові сайти розпізнавання ДНК

Існує лише обмежена кількість спеціальних типів білкових доменів для контакту з ДНК. Частково це пов'язано з тим, що приєднання білку до ДНК у більшості випадків призводить до зміни конформації останньої, в той час як ДНК *in vivo* існує переважно у конформаційно-жорсткій В-формі.

Найбільш поширеними сайтами розпізнавання ДНК у складі білків, є:

- 1) Домен « α -хелікс-поворот- α -хелікс» або ділянка НТН (Helix-Turn-Helix),**
- 2) Ділянка «цинкових пальців» з наближеними петлями,**
- 3) Регіон лейцинового та ізoleyцинового «зіпперів»,**
- 4) β -складчастості різної будови,**
- 5) β -шпильки у різних комбінаціях.**

6.5. Домен НТН

Як доводять результати структурних досліджень, **α -хелікс білку** легко поміщається всередині **великої борозенки В-ДНК**. Тому по відношенню до великої борозенки він виступає основним впізнавальним елементом вважається саме α -хелікс. Вперше ділянку α -хеліксу впізнавального фактора послідовності ДНК був охарактеризований Андерсоном у 1981 році у складі так званого **домену НТН** у бактеріальному репресорі Cro. Згодом за допомогою кристалографії та ЯМР було встановлено, що НТН присутня у великій кількості транскрипційних регуляторних та споріднених до них білків як про-, так і еукаріотичних організмів. Будова та схема взаємодії домену НТН з ДНК представлені на **рис. 77**.

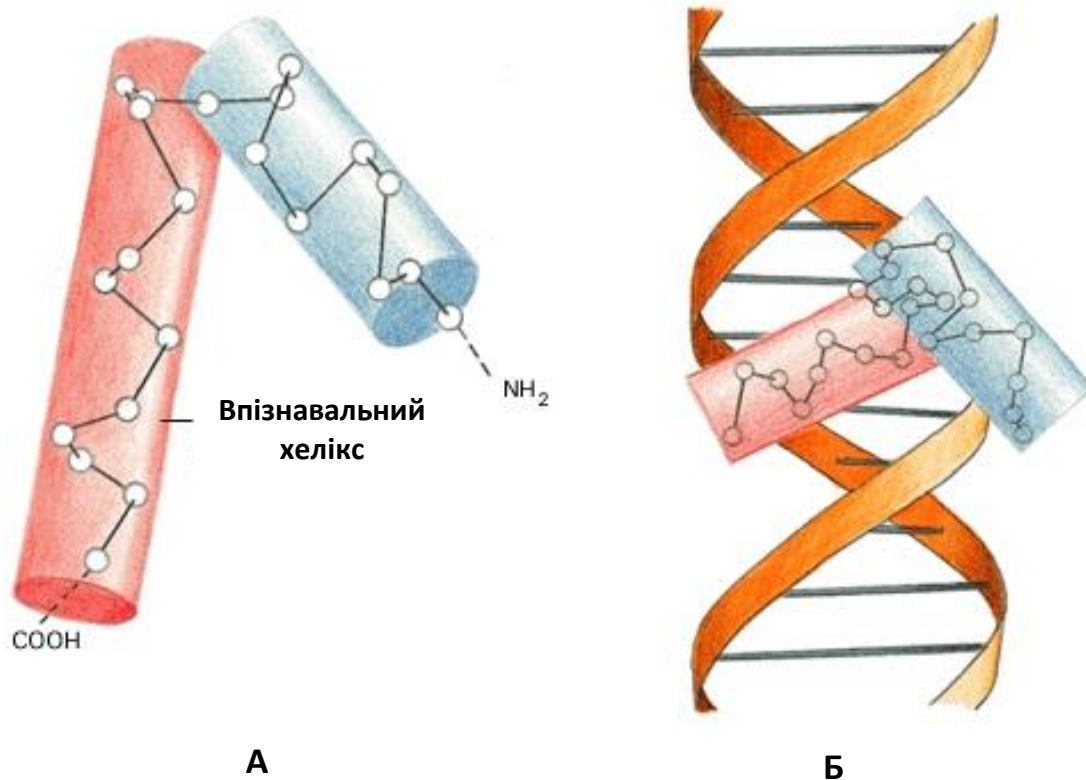


Рис. 77. Схема структури домену НТН (А) та його взаємодія з ДНК (Б).

Виявлено, що НТН-ділянка складається з **20 амінокислотних залишків**, сім з яких формують **перший α -хелікс**, а залишки з **12-го по 20-ий – другий хелікс**, таким чином, на сполучну ділянку припадає ще 4 амінокислоти. Кут між хеліксами складає 120° . Другий з хеліксів є впізнавальним, тобто, саме він «лежить» всередині великої борозенки ДНК і взаємодіє зі специфічними контактними поверхнями основ. Відомо також, що у домені НТН в положеннях 4, 8, 10, 16 та 18 знаходяться гідрофобні амінокислоти. N-термінальна ділянка НТН (тобто, перший хелікс), як правило, приєднується до малої борозенки ДНК, що стабілізує структуру комплексу. Встановлено, що основним учасником таких взаємодій є бічний ланцюг аргініну.

Відомо, що сам по собі домен НТН є нестабільним і повинен підтримуватись у активній конформації за допомогою інших ділянок білкових молекул. Так, було показано, що еукаріотичний **гомодоменний зубчастий білок (engrailed)** має ділянку з трьох послідовно розміщених хеліксів, причому НТН відповідає другому та третьому з них, останній є впізнавальним. Також відомо, що **репресор 434 та репресор з бактеріофагу λ** складаються з **п'яти α -хеліксів**, у цьому випадку домен НТН також розміщується одразу за першим.

Показано, що **прокаріотичні домени НТН** приєднуються до ДНК як правило, попарно, тобто, у **димеризованій формі**, в той час як у **еукаріот** відповідний домен

зв'язується з ДНК у приєднується до ДНК як **мономер**. Однак, багато еукаріотичних гомодоменних транскрипційних факторів з НТН у своєму складі, приєднуються до відповідних ділянок ДНК тандемно. Прикладом можуть слугувати **МАТ α 1 та МАТ α 2**, які регулюють транскрипцію геному дріжджів. Так, кристалічна структура гомодоменного МАТ α 2 у комплексі з В-ДНК показує тандемну організацію. У **табл. 22** зведено дані щодо існуючих на сьогодні кристалічних структур комплексів білків з доменами НТН і молекул ДНК.

Таблиця 22. Кристалічні комплекси ДНК з білками з НТН у складі

Структура, зв'язана з ДНК	Номер у базі PDB	Номер у базі NDB
Репресор 434	3CRO	PDR001
Репресор λ	4CRO	PDR003
Репресор Lac	1EFA	PDR0118
Репресор Cro	3ORC	PDR0022
Зубчастий гомодомен (<i>engrailed</i>)	3HDD	PDR0016
Гомодомен з <i>Antennapedia</i>	1HOM	PDR055
Гомодомени МАТ α 1 та МАТ α 2	1AKH	PDR049
CAP	1CGP	PDR006

Взагалі, більшість білків з доменами НТН характеризуються прямими контактами між впізнавальним хеліксом білку та **великою борозенкою операторної ДНК**, яка зазвичай зберігає **В-форму**.

6.6. Домени «цинкових пальців»

На сьогодні цинк-вмісні ділянки у складі ДНК-зв'язуючих білків є однією з найбільш широких груп доменів, що відповідають за розпізнавання і зв'язування цих білків з нуклеїновими кислотами. Хронологічно першим прикладом виступає **група транскрипційних факторів TFIIA з жаб роду *Xenopus***. Домени саме цих поліпептидів вперше отримали назву білків з ділянками «цинкових пальців» (**zinc fingers**). Такі ділянки складаються з регулярно розміщених залишків **цистеїну та гістидину**, що

скоординовані між собою через **йон цинку (рис. 78)**. Назва «палець» походить від третинної структури білку у регіоні йона цинку - кожен з таких «пальців» являє собою комплекс **α -хеліксу з антипаралельними β -складчастими структурами**, який скоординований через **Zn**.

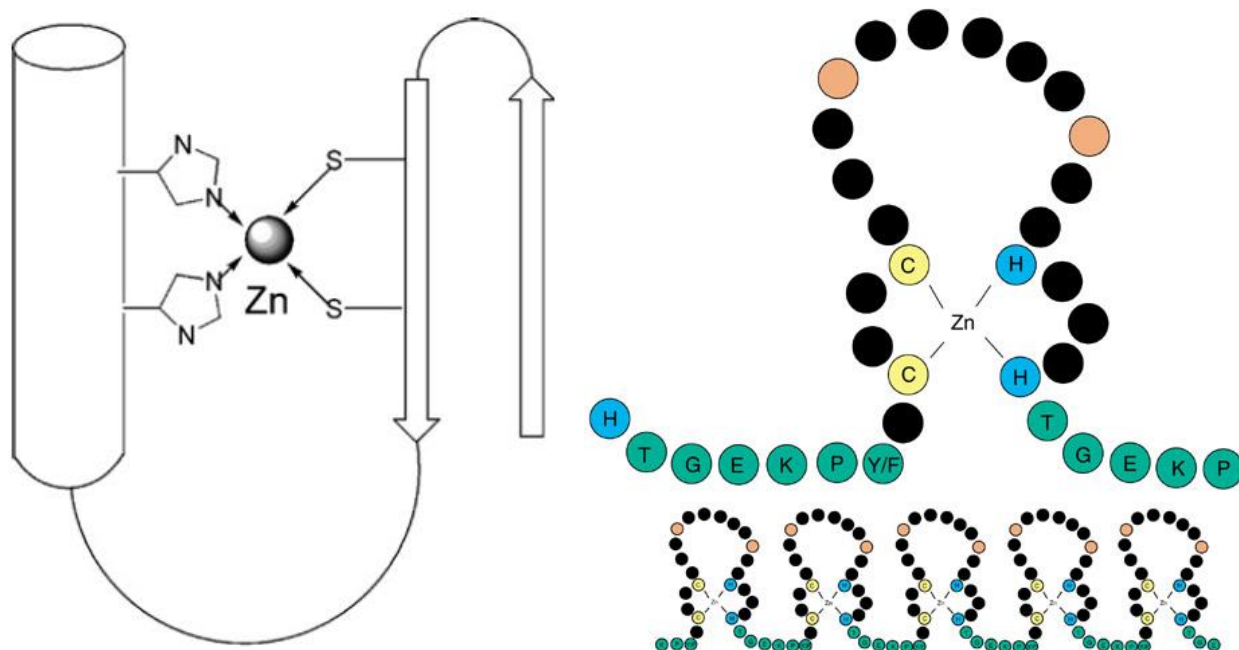


Рис. 78. Схематична організація доменів «цинкових пальців».

Як правило, у цинк-вмісних білках розміщено як мінімум два таких домени, кожен з яких розпізнає сайти з трьох пар основ з боку великої борозенки В-ДНК. Такий план будови виявлений на прикладі **транскрипційного фактора Zif268** в лабораторії Павлетича та Пабо у 1991 році. Встановлено, що у такому домені кожен «палець» прямо контактує зі збагаченим гуаніном ланцюгом ДНК, причому така взаємодія йде через зв'язки «аргінін-гуанін» та «гістидин-гуанін», що за конфігурацією подібні до виявлених у випадку доменів НТН.

Ще один приклад - **транскрипційний активатор GAL4**, в якому домени «цинкових пальців» виявлені Марморштейном у 1992 році. Цей транскрипційний фактор приєднується до ДНК у вигляді димеру, причому кожна з окремих молекул має по два домени - цинк-зв'язуючий та α -хеліксний. Дані домени поєднуються між собою за допомогою довгої поліпептидної ділянки (**рис. 79**). Виявлено, що після приєднання цього білку до ДНК перший з доменів знаходиться у великій борозенці і

увтворює контакти між бічними ланцюгами лізину з одного боку, та гуаніном і цитозином – з іншого. Встановлено, що **CCG** є основною послідовністю, яка впізнається фактором GAL4.

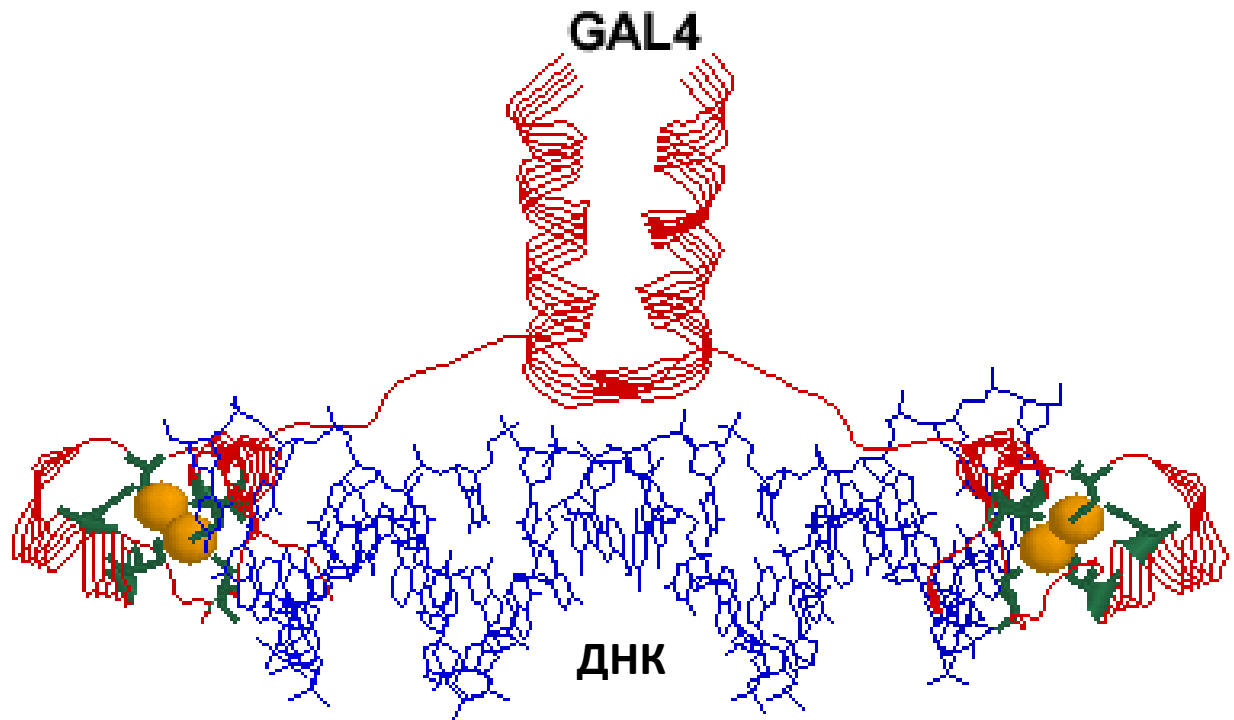


Рис. 79. Схема контактів транскрипційного фактора GAL4 з ДНК.

Нарешті, ядерні рецептори до стероїдів та ретиноєвої кислоти також використовують «цинкові пальці» для розпізнавання відповідних елементів відповіді **RE (Response Element)** в ДНК (рис. 80).

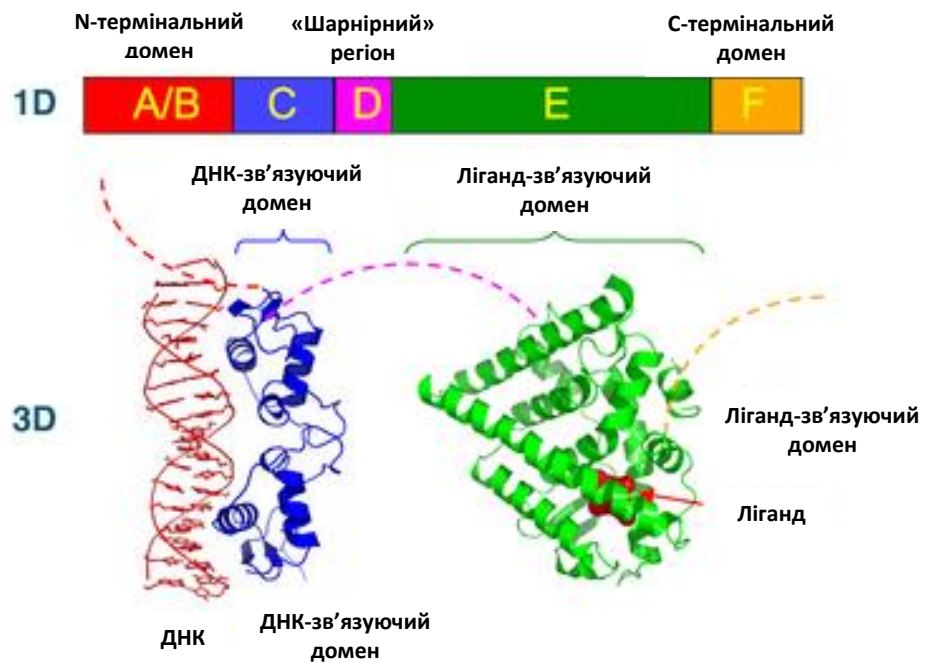


Рис. 80. Схема структури ядерних рецепторів стероїдів.

Майже всі ділянки RE мають у своєму складі послідовності **d(AGGTCA)** або **d(AGAACA)**, до яких приєднуються **відповідні рецептори** у якості **гомо- або гетеродимерів**. Цинкові ділянки у таких білках містять **два α -хелікси**, що поєднані координаційно між собою **через 2 атоми цинку** у районі **С-термінальної петлі** (рис. 81).

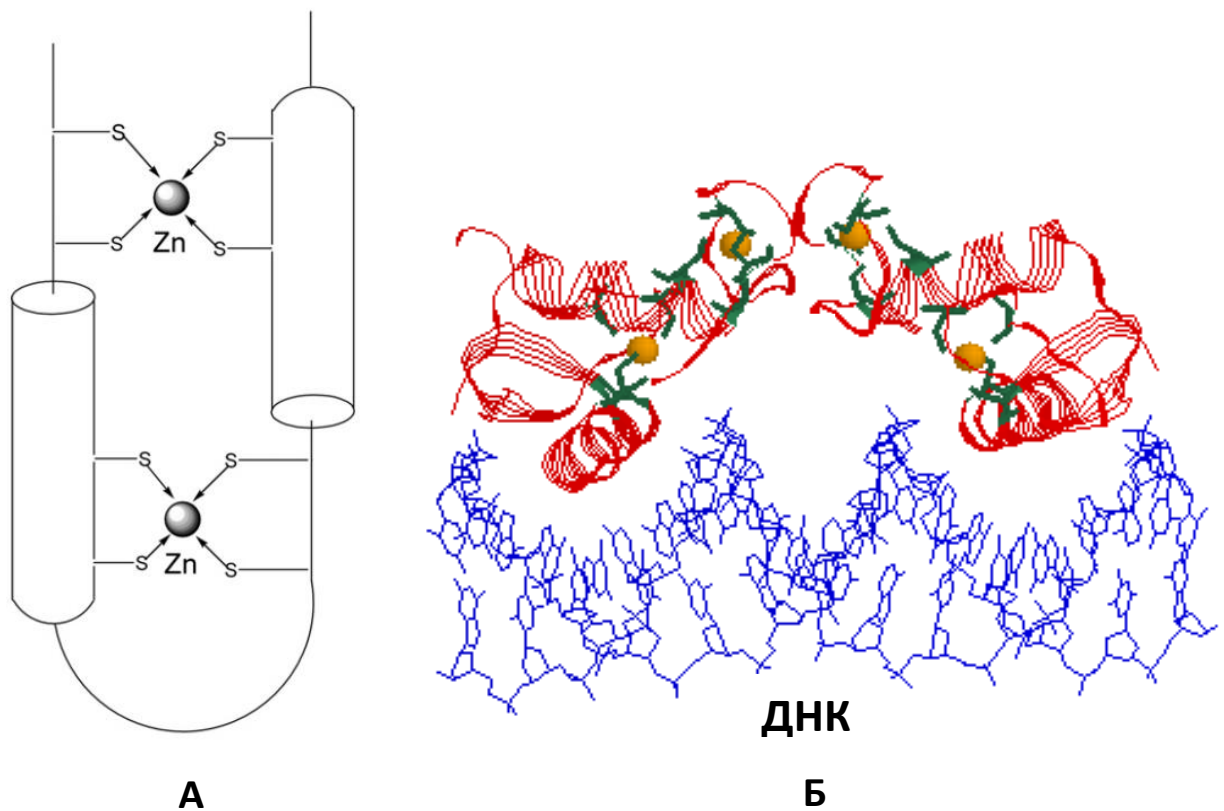


Рис. 81. Схема будови «цинкових пальців» у складі ядерних рецепторів **(А)** та розміщення цих рецепторів у контакті з ДНК **(Б)**.

Виявлено що один з хеліксів у складі домену приєднується до великої борозенки ДНК, а другий підтримує структурну цілісність усього комплексу. Також у процесі розпізнавання бічні ланцюги основних амінокислот прямо контактують з основами ДНК, причому сама молекула ДНК зберігає В-форму.

«Цинкові пальці» можуть використовуватись для дизайну синтетичних розпізнавальних молекул ДНК зі специфічними послідовностями, які можна варіювати. Такий підхід був використаний, наприклад, для дослідження механізмів зв'язування димерних поліамінів з малою борозенкою ДНК. Перевагою даного методу є можливість синтезу конструкцій до основних сайтів ДНК з різною доступністю. Недоліком методу є великі розміри утворених комплексів, що затруднює їх перенос у клітину. Вбудовування так званої димерізуючої ділянки у молекулу конструкту дозволяє у перспективі збільшити кількість цинкових доменів на одному пептиді до чотирьох та більше без втрати загальної спорідненості до ДНК для кожного з них.

У **таблиці 23** представлено дані щодо кристалізованих білків з доменами «цинкових пальців».

Таблиця 23. Кристалізовані білки з доменами «цинкових пальців»

Білок	Номер у базі PDB	Номер у базі NDB
Zif268	1ZAA	PDT006
GAL4	1D66	PDT003
Рецептор естрогену	1HCQ	PDRC03
Репресор ретиноату	2NLL	PDR021
ТАТА-зв'язуючий білок	2G2D	PD0186

6.7. Лейциновий «зіппер» та інші розпізнавальні ділянки

Домен лейцинового «зіппера» (рис. 82) зустрічається у складі багатьох еукаріотичних транскрипційних факторів, він одночасно є і сайтом димеризації. Вперше «зіппер» був відкритий Елленбергером у 1992 році у складі **транскрипційного фактора GCN4 дріжджів**. Виявлено, що цей домен складається з дуже довгого та майже прямого α -хеліксу, що містить регулярно-повторювані залишки лейцину. Два таких хелікси взаємодіють між собою та формують структуру паралельно-закрученої нитки (Coiled Coil), яка має велику кількість взаємодій як з основами через бічні ланцюги АК, так і з кістяком ДНК через непряме зчитування. Для формування правильних контактів критичним у цьому випадку є положення α -хеліксу білку всередині великої борозенки ДНК – він повинен розміститися майже перпендикулярно до фосфодиефірного кістяку ДНК.

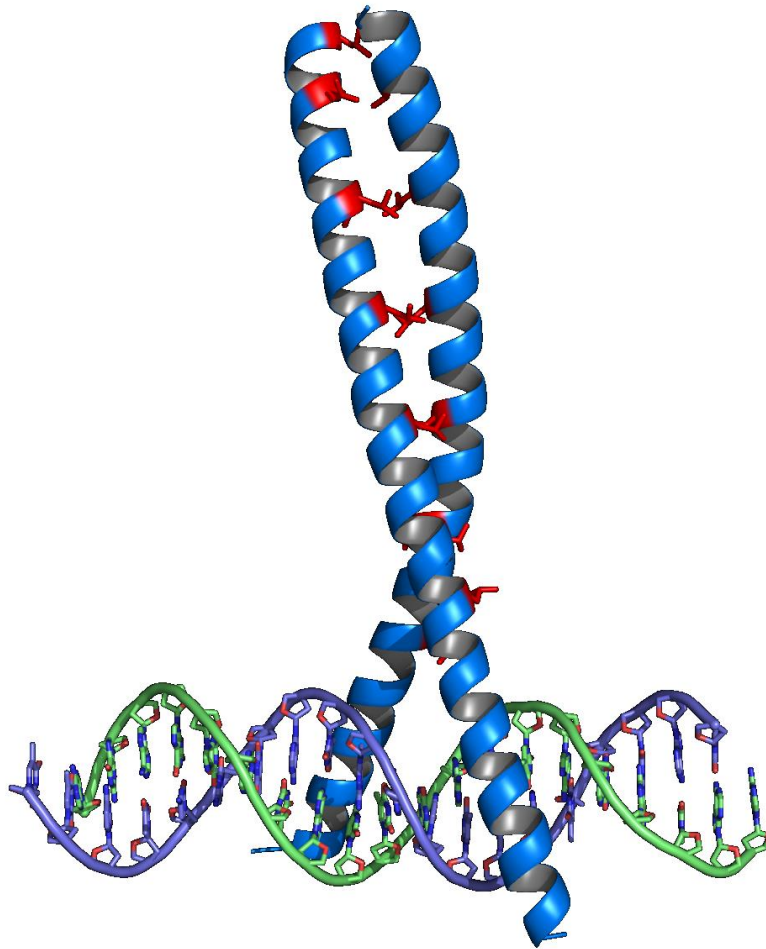


Рис. 82. Схема домену лейцинового «зіппера» у контакті з ДНК.

Антипаралельне β -«барильце» – ще один вид розпізнавального елемента для ДНК. Домен був відкритий у складі **транскрипційного фактору E2 вірусу папіломи HPV (Human Papilloma Virus)** Хеджем з колегами у 1992 році. Таке «барильце» поєднане з **парою α -хеліксів**, які розміщуються у **великій борозенці**. Контакти між ДНК та білком у цьому випадку також включають прямі взаємодії між бічними ланцюгами АК та основами, а також непрямі взаємодії з боку білку з кісткою ДНК. Унікальною особливістю даного комплексу є формування невеликого закручування ДНК навколо β -барильця, причому кут закручування дорівнює приблизно 45° , що вдвічі менше спостереженого у комплексах з транскрипційним активаторним білком CAP за участю димеризованих доменів НТН E.coli. Закручування формується через велику кількість взаємодій з фосфатними групами ДНК, що призначені для правильного розміщення розпізнавального хеліксу у великій борозенці.

Подійноланцюгові антипаралельні β -«стрічки» - вперше знайдені у комплексі **оператора-репресора met J** з ДНК Сомерсом та Філіпсом у 1992 році. Взагалі така ділянка є типовою у складі бактеріальних білків-репресорів. Бічні ланцюги АК у складі

цих «стрічок» взаємодіють з фосфатами та основами ДНК у ході прямого та непрямого зчитувань відповідно. Подібний варіант впізнаючої ділянки є також у деяких білках репарації ДНК, наприклад, Ku. У **табл. 24** наведено кристалізовані білки з розглянутими вище доменами.

Таблиця 24. Кристалізовані білки з доменами лейцинового «зіппера», β -«барильця» та β -«стрічок»

Білок	Номер у базі PDB	Номер у базі NDB
Met J	1MJM	PD0245
E2	2BOP	PDV001
p53	1TSR	PDR022
Ku	1JEY	PD0220
NF-кВ	2RAM	PDR051
Нуклеосома (розд. зд. - 0,28 нм)	1AOI	PD0001
Нуклеосома (розд. зд. - 1,94 нм)	1KX5	PD0287
Тетрануклеосома	1ZBB	PD0639

На **рис 83** представлено схеми взаємодії ДНК з доменами, про які йшла мова у цьому розділі.

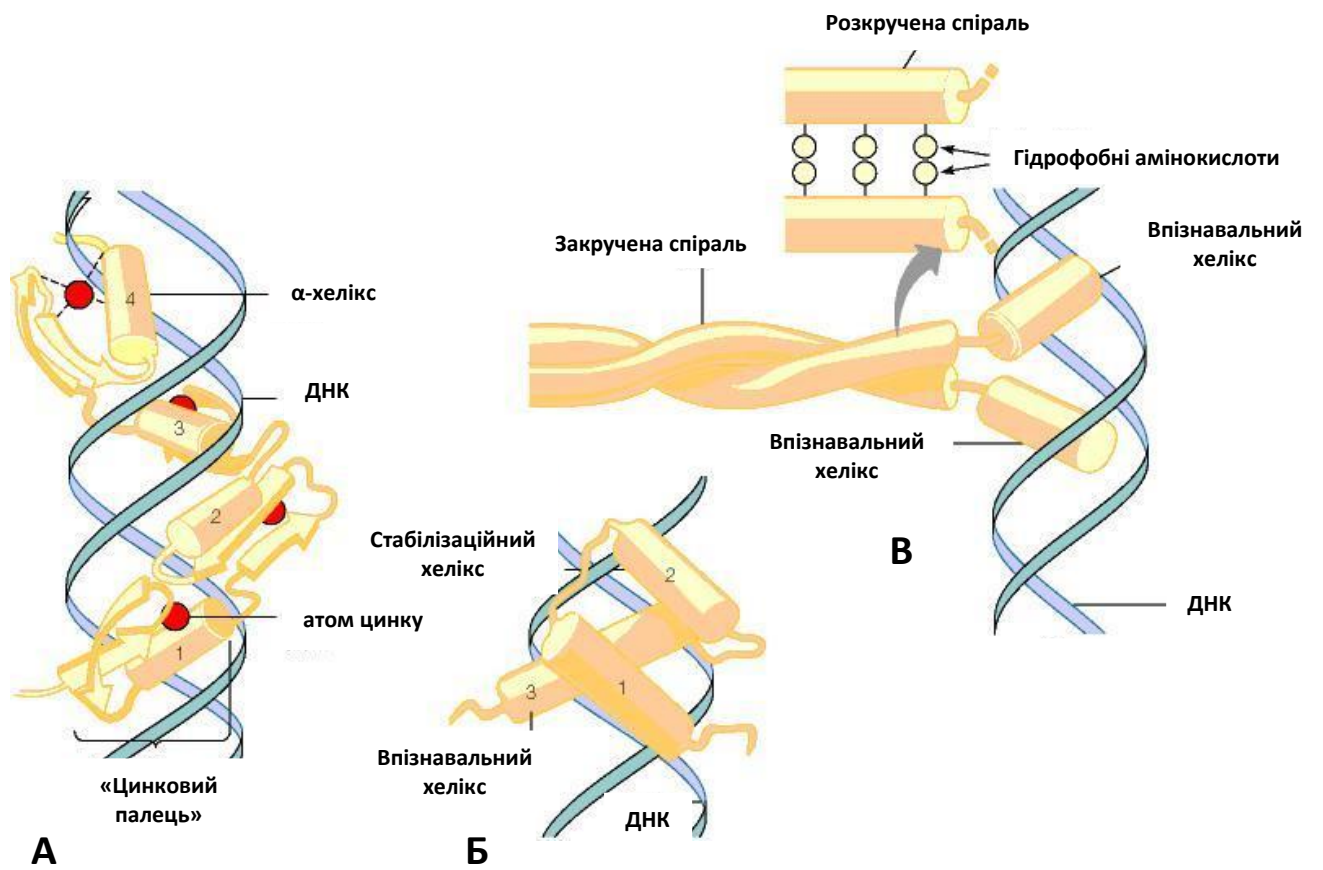


Рис. 83. Порівняльна схема взаємодії білкових доменів «цинкових пальців» (А), НТН (Б) та лейцинового «зіппера» (В) з ДНК.

РОЗДІЛ 7. Конденсація ДНК еукаріотичних організмів та особливості структури хроматину

У даному розділі розглядається структура хроматину як вищої форми організації ДНК у клітині еукаріот. Подано сучасні дані про будову білків хроматину, структуру нуклеосом та наднуклеосомних рівнів компактизації геному.

7.1. Загальна характеристика рівнів структури хроматину

Еукаріоти мають на декілька порядків більше генетичного матеріалу, ніж віруси та бактерії, а це означає, що ступінь його компактизації повинен бути ще більшим, ніж у даних простіших організмів.

Основною одиницею конденсації генного матеріалу в організмі еукаріот є, як відомо, **хромосома**. Геном людини складається з 23 гаплоїдних хромосом, що відповідає близько $3,9 \times 10^9$ пар основ. Кавеноффим та Зіммом у 1973 році було визначено, що кожна з хромосом являє собою одиничну молекулу ДНК. Таким чином, кожна молекула ДНК у хромосомі людини має у середньому $1,7 \times 10^8$ пар основ, що у перерахунку довжину повністю витягнутої ДНК дорівнює 5,8 см. Середній діаметр ядра дорівнює близько 5 мкм. Отже, для того, щоб розміститися у ядрі, ступінь компактизації ДНК однієї хромосоми повинен становити 10^4 - 10^5 , що і забезпечується утворенням хроматинових комплексів ДНК з білками. Причому, за масою співвідношення ДНК : білок у хроматині дорівнює приблизно 1 : 2. Біля половини білків хроматину є структурними - гістонами, решта належить негістоновим білкам, серед яких перше місце займає **ДНК-топоізомераза II** (КФ 5.99.1.3), що регулює конденсацію хроматину.

Подіями фундаментального характеру, пов'язаними із з'ясуванням **структури хроматину**, вважаються наступні:

- **Теорія Корнберга**, розроблена у 1974 році, яка постулює, що хроматин складається з повторюваних одиниць, кожна з яких містить по два комплекти гістонів H2A, H2B, H3 та H4, а також ділянку ДНК довжиною приблизно 200 пар основ.
- **Електромагнітна візуалізація структури хроматину** Олінсом та Олінсом у 1974 році, відома як «буси на нитці», що показала взаємне розташування повторюваних ділянок хроматину, згаданих у теорії Конберга.

На **рис. 84** представлені основні етапи компактизації ДНК еукаріот.

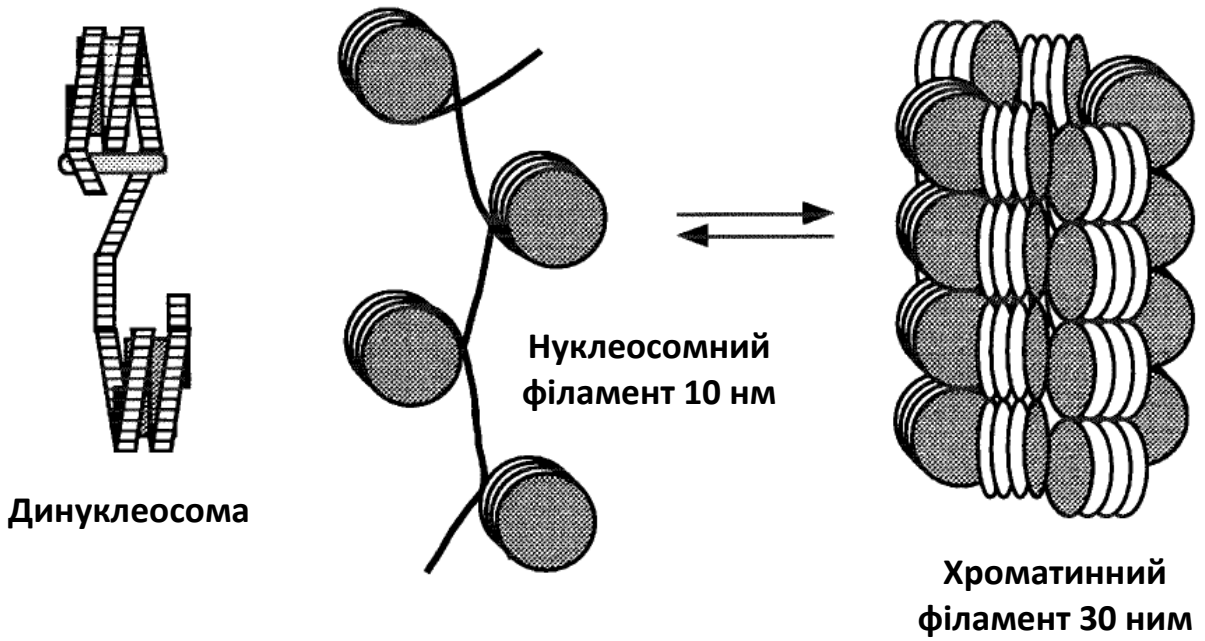
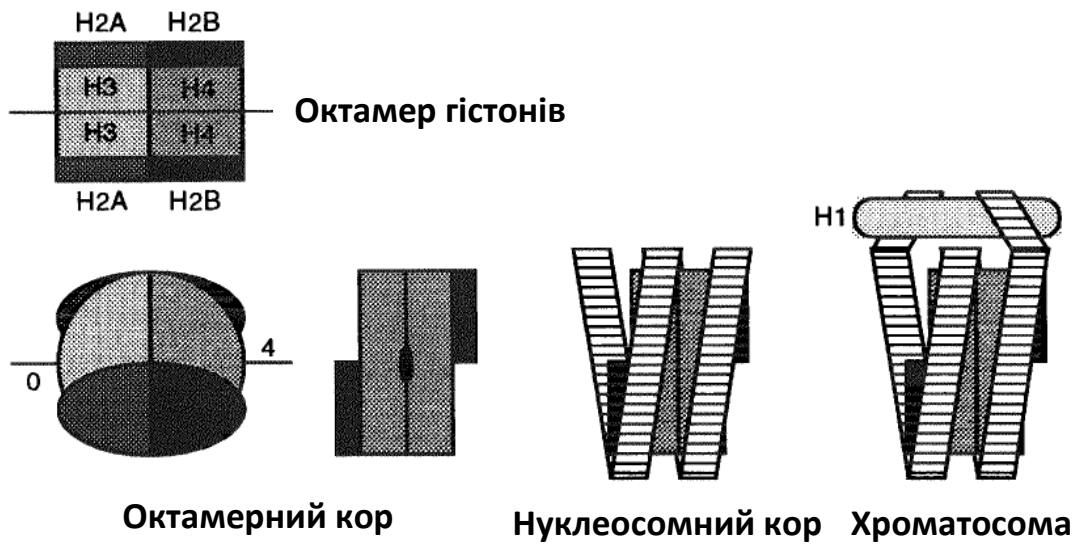


Рис. 84. Рівні організації хроматину.

Взагалі, етапами конденсації ДНК під час утворення хроматину, у порядку зростання рівня організації називають наступні:

- 1) Надспіралізована у різному ступені молекула ДНК
- 2) Субнуклеосомальна частинка (октамер гістонів)
- 3) Нуклеосомний кор (набір корових гістонів + корова ДНК)
- 4) Хроматосома (нуклеосомний кор + лінкерний гістон),
- 5) Нуклеосома (хроматосома + лінкерна ДНК),
- 6) Динуклеосома,
- 7) Олігонуклеосома,
- 8) Нуклеосомний філамент, «буси на нитці» (10 нм),
- 9) Хроматинний філамент, «соленоїд» (30 нм),
- 10) Надспіралізований соленоїд,
- 11) Петельні домени,
- 12) Хроматида та хромосома (мітозний стан).

7.2. Загальна будова нуклеосом

Фундаментальною структурною одиницею хроматину є нуклеосома. У основі її лежить комплекс з чотирьох пар гістонів (октамер), навколо якого закручена ділянка нуклеосомної ДНК – так звана корова ДНК (рис. 85).

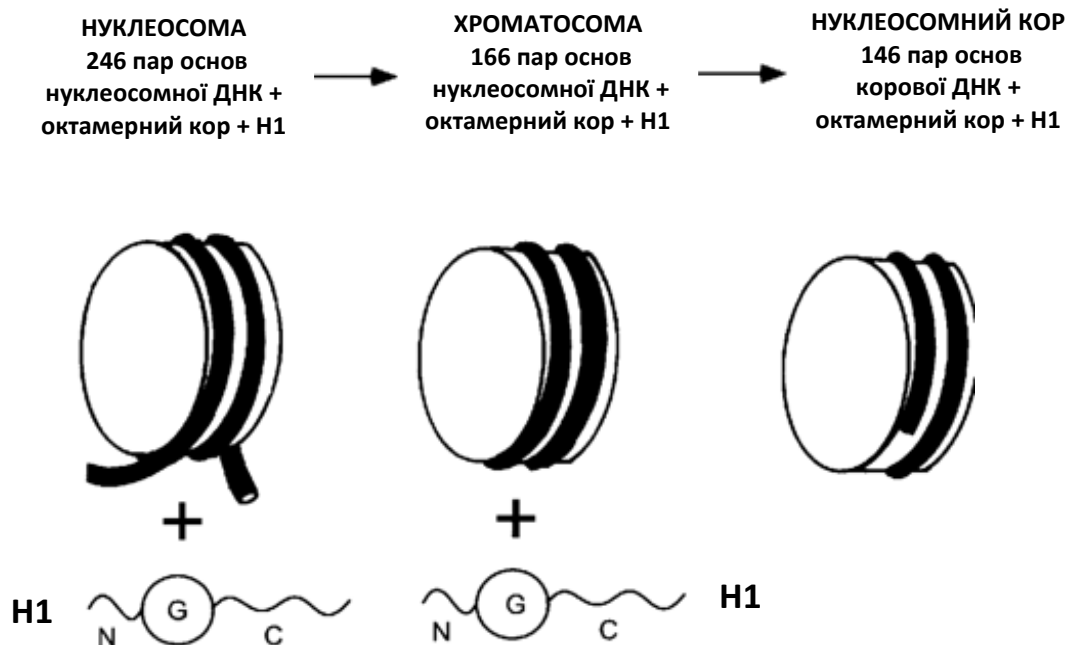


Рис. 85. Будова нуклеосоми, хроматосоми та нуклеосомного кору.

Білкова частина нуклеосоми називається октамерним кором або октамером та містить по дві копії корових гістонів - H2A, H2B, H3 та H4. Крім того, у всіх вищих

еукаріот (але не у дріжджів) є ще один гістон - Н1 (**табл. 25**). Цей особливий гістон називають лінкерним, оскільки він не входить до складу кору, а знаходиться назовні нуклеосоми, приєднаний до лінкерної ділянки, звідки й походить його назва. Лінкерна ділянка або лінкер – регіон ДНК нуклеосоми, який не входить у нуклеосомний кор, але поєднує нуклеосоми між собою у олігонуклеосомних ділянках. У еритроцитах птахів функцію Н1 виконує гістон Н5. Комплекс нуклеосомного кору з гістоном Н1, приєднаним до ділянки у 20 пар основ у складі лінкера, називають хроматосомою (**рис. 85**).

Встановлено, що **розщеплення релаксованого хроматину нуклеазами** спочатку дає фракції ДНК, за довжиною кратні ділянкам у 166-246 пар основ, в залежності від умов розщеплення та виду клітин. Ділянки з максимальною довжиною у 246 пар основ репрезентують собою повну нуклеосому (**рис. 84 та 85**), яка складається з октамеру гістонів (нуклеосомного кору), однієї копії гістону Н1 та нуклеосомної ДНК. Причому 146 пар основ в такій ДНК припадає на корову ділянку, а ще 100 пар основ – на лінкерний регіон молекули ДНК. **Подальша обробка ферментами дає хроматосому (рис. 84 та 85)**, яка також складається з нуклеосомного октамеру та гістону Н1, але у даному випадку втрачається близько 80 пар основ вільного лінкера, що не контактує з Н1 і слугує для поєднання нуклеосом між собою. Нарешті, **фінальні стадії гідролізу** призводять до появи **частинок нуклеосомного кору** - октамерного комплексу гістонів у поєднанні з коровою ДНК довжиною **146 пар основ**, але вже без гістону Н1 та ділянки ДНК у 20 пар основ, яка безпосередньо з ним контактувала (**рис. 84 та 85**).

Нуклеосоми усіх еукаріот є ідентичними за будовою, а саме виявляються у вигляді дисків діаметром 11 нм та висотою 5,7 нм, навколо яких нуклеосомна ДНК робить 1,75 оберти (**рис. 85**). Таким чином, в цілому **нуклеосомна ДНК** довжиною 246 п.о.) складається з **трьох регіонів**:

- 1) Корового - **146 пар основ**,
- 2) Лінкерного для контакту з Н1 - **20 пар основ**,
- 3) Вільного лінкерного для поєднання нуклеосом - **80 пар основ**.

7.3. Особливості структури компонентів нуклеосомного кору

Було виявлено, що **1,75 обертів** нуклеосомної ДНК розміщуються виключно назовні нуклеосоми, причому закручування йде у ліву сторону і є майже симметричним відносно центральної вісі комплексу. Кристалографічні дослідження з роздільною здатністю 0,7 нм показують, що ДНК у складі нуклеосоми існує у видозміненій В-формі з підйомом спіралі 0,28 нм. ДНК навколо кору **не є регулярно і гомогенно зігнутою**, а, скоріше, характеризується **різкими зігнутостями** з періодичністю кожні 1-4 витки спіралі. Як вважається, це можна пояснити контактами ДНК з гістоном Н3 та/або певними послідовностями у складі самої ДНК.

Результати кристалографії за роздільної здатності 0,31 нм показали, що **октамер гістонів** можна розмежувати на **три основні частини**:

- 1) **центральный тетрамер (H3-H4)₂,**
- 2) **«правий» димер H2A-H2B,**
- 3) **«лівий» димер H2A-H2B.**

Діаметр такого октамеру складає 6,5 нм, а довжина – від 1 до 6 нм. Таким чином, в залежності від орієнтації гістонів та зовнішніх умов, за формою октамер може бути або плоским диском, або відсіченим конусом. Виявлено, що у складі кору **гістони розташовуються у наступному порядку**:

H2A-H2B : H3-H4 : H3-H4 : H2A-H2B

Зокрема, центральна ділянка нуклеосомної ДНК довжиною приблизно 80 пар основ взаємодіє з **тетрамером 2 × (H3-H4)**, утворений комплекс «ДНК-білок» має двовимірну симетрію. Ділянки ДНК по 20 пар основ з обох боків центрального регіону взаємодіють з кожним гетеродимером H2A-H2B. Пари гістонів H3-H4 та H2A-H2B з кожного боку дуже точно та специфічно контактують між собою так званими **ділянками «потискання рук»**. На поверхні октамеру димери гістонів розташовуються спіралью, тому іноді називаються суперхеліксною структурою.

Встановлено також, що В-ДНК у складі нуклеосоми має варіабельну кількість основ на один повний виток: 10 пар основ - біля кінців нуклеосомальної ДНК, коли як на ділянці біля центру кору це значення складає приблизно 10,7. Таким чином, середнє значення складає 10,2 пар основ на виток для ДНК нуклеосом. Для порівняння у розчині В-форма ДНК має 10,5 пар основ на виток. Факт варіабельності параметрів нуклеосомної ДНК може пояснити, принаймні частково, існуванням так званого **лінкерного парадоксу**. Згідно нього нуклеосомна ДНК повинна мати 1,75 витків навколо кору, але у релаксованих формах хроматину виявляється лише 1 виток.

Всі корові гістони є простими сильноосновними ($pI = 9,5 - 12$) білками масою до 23 кДа, які відрізняються за відносним вмістом позитивно заряджених амінокислот – лізину та аргініну – та мають подібну тривимірну структуру. Вони являють собою витягнуті молекули з центральним довгим хеліксом, кінці якого з кожного боку фланковані петлею та коротка спіраллю. Така структура є унікальною, тому отримала власну назву **гістонової згорнутості (Histone Fold, рис. 86, А)**. Сама тривимірна структура корових гістонів, у свою чергу, містить **дві частини (рис. 86, Б)**:

1. **N-термінальний подовжений позитивно заряджений домен – збагачений на лізин або аргінін (табл. 25),**
2. **C –термінальний глобулярний домен, який ще називають ділянкою гістонової згорнутості.**

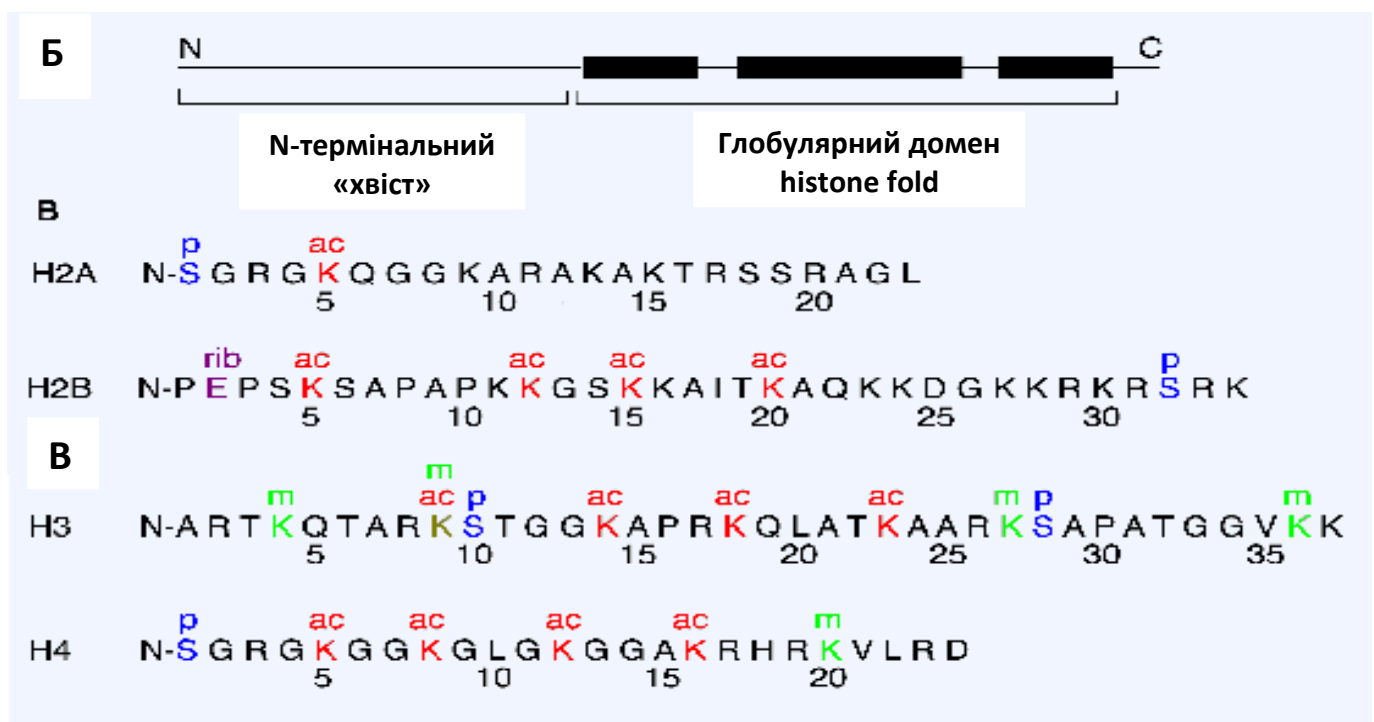
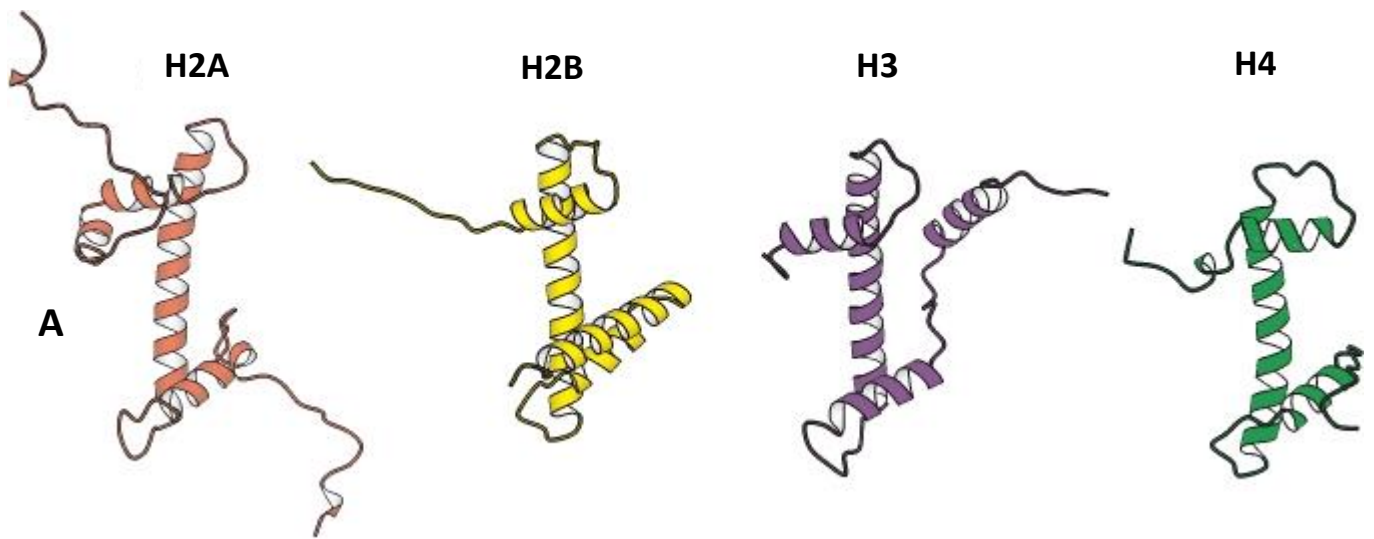


Рис. 86. Третинна (А) та первинна (В) форми будови корових гістонів, а також схема розташування їх доменів (Б). ас – ацетилювання, м – метилювання, р – фосфорилування, rib – АДФ-рибозилування.

Саме за N-термінальним доменом, як правило, здійснюється велика кількість посттрансляційних модифікацій гістонів (рис. 86, В) - ацетилювання, метилювання, фосфорилування, поліАДФ-рибозилування, а також убіквітінування. Дані види модифікацій відповідають за регуляцію функціональної активності корових гістонів і хроматину в цілому. Організація закручування ДНК навколо кору у більшості випадків, забезпечується за рахунок С-термінального домену корових гістонів. Єдиним винятком з цього правило є гістон Н4, у якому цей домен приймає участь у

позиціонуванні ДНК відносно октамерного кору та приєднанні цієї молекули до останнього.

Таблиця 25. Параметри гістонів

Вид гістону	Молекулярна вага, Да	Вміст основних амінокислот		Кислі/основні амінокислоти
		Лізін, %	Аргінін, %	
H1	23000	29	1	5,4
H2A	13960	11	9	1,4
H2B	13770	16	6	1,7
H3	15340	10	13	1,8
H4	11280	11	14	2,5

Основними силами, які забезпечують **стабільність структури нуклеосоми**, вважаються **електростатичні взаємодії між фосфатними групами** малої борозенки ДНК та **залишками аргініну** в С-термінальному глобулярному регіоні корових гістонів, особливо щодо пари білків H3-H4. Взагалі, цей димер характеризується найбільш консервативною будовою серед усіх відомих на сьогодні білкових молекул. Оскільки основними силами приєднання корових гістонів до ДНК є електростатичні, за умов підвищення концентрації солей ці білки дисоціюють. За таких умов периферичні димери H2A-H2B від'єднуються раніше, а більш глибоко розташовані H3-H4 – пізніше. Встановлено також, що H2A-H2B стабілізують олігомеризацію H3-H4. За фізіологічних умов час дисоціації периферичних димерів від октамеру складає менше секунди.

7.4. Будова хроматосоми та лінкерних гістонів

У 1978 році Сімпсоном шляхом нуклеолізу у м'яких умовах було виділено комплекс корового октамеру гістонів, однієї молекули H1 та ділянки нуклесомної ДНК приблизно у 160 пар основ довжиною. Цей комплекс, як уже відмічалось, був названий **хроматосоמוю (рис. 84 та 85)**. Дослідження з термічної денатурації показали, що H1 взаємодіє як з лінкерною, так і з коровою ДНК, що призводить до стабілізації структури обох ділянок. Встановлено, що кінцеві ділянки ДНК у хроматосомі на вході та на виході з неї розміщуються під кутом у 50-60° відносно

головної вісі. Саме на цих **двох ділянках входу та виходу локалізується гістон H1**, що призводить до наближення та перекривання цих регіонів між собою.

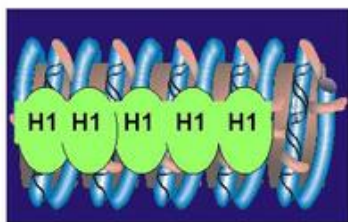
Встановлено, що молекула H1 за структурою відрізняється від корових гістонів та складається з трьох доменів - центрального глобулярного, який контактує з ДНК та захищає її від дії нуклеаз, та двох подовжених N- та С-термінальних, які мають високу щільність позитивного заряду, за рахунок чого взаємодіють з лінкерною ДНК. Два останні домени вважаються основними факторами регуляції процесів конденсації хроматину. Саме тому, очевидно, вони містять численні сайти фосфорилювання, які потрібні для синхронізації ступеню конденсації зі стадіями клітинного циклу. Вважається, що під час взаємодії з ДНК, дані домени, що мають форму α -хеліксів, розміщуються у великій борозенці полінуклеотиду.

Структуру **H5**, альтернативного варіанту лінкерного гістону, який іноді називають **GH5**, було виявлено кристалографічно з роздільною здатністю 0,25 нм. Встановлено, що ця молекула складається з трьох хеліксів (хеліксний кор) та **С-термінального β -вигину**. Така структура дуже нагадує будову **транскрипційного фактора HNF-3 γ** , що також має **два хелікси для взаємодії з ДНК (так звані «крила»)**, та ще один центральний хелікс, що також приймає участь у взаємодіях з ДНК. Показано, що одне з «крил» відповідає N-термінальному регіону H5, а друге – його С-термінальній ділянці.

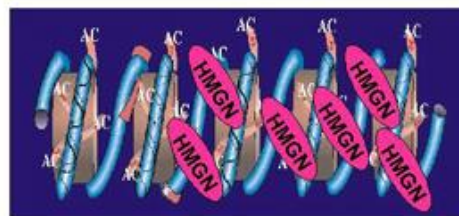
У 1993 році в лабораторії Вольффе було встановлено, що обидва типи лінкерних гістонів краще асоціюють з ДНК, асоційованої з октамером, ніж з «чистим» хеліксом. Для приєднання необхідною є присутність вільної лінкерної ДНК на обох сторонах октамерного кору. Показано, що зв'язування однієї молекули H1 з лінкером займає 20 пар основ у складі останньої, захищаючи її від дії мікрококової нуклеази. Причому 15 пар основ з цієї кількості знаходяться на одній стороні кору, а ще 5 пар основ – на іншій. До того ж, на одному з боків нуклеосома має специфічний сайт підвищеної спорідненості до H5, посередництвом якого H5 здатен змінювати силу контактів корових гістонів між собою, регулюючи таким чином стабільність структури октамерного кору.

Окрім вищенаведеної, лінкерні гістони мають ще декілька функцій. Так, поряд з **білками високої рухливості HMG (High Mobility Group)**, гістон H1 контролює ступінь компактизації хроматину в залежності від фізіологічного стану клітини. Хімічні модифікації цього гістону, як і у випадку з коровими, дестабілізують його структуру та призводять до дисоціації зі складу нуклеосоми. Вважається, що така дисоціація потрібна для запуску декомпактизації хроматину з метою змін позиціонування нуклеосом відносно ДНК. А це, у свою чергу, є необхідним для регуляції активності функціональної активності хроматину - реплікативної та транскрипційної (**рис. 87**). Також встановлено, що гістон H1 може модулювати зв'язування транскрипційних

факторів з відповідними послідовностями ДНК та захищати лінкер та корову ДНК від атак едонуклеаз.

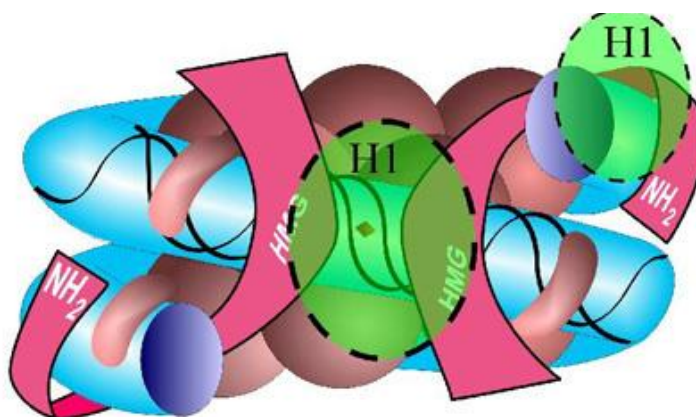


Компаткизований хроматин



Декомпактизований хроматин

А



Б

Рис. 87. Регуляція компактизації хроматину з боку лінкерного гістону Н1 та білків HMG (А) та приблизні місця їх розташування на нуклеосомі (Б).

7.5. Нуклеосомний та хроматинний філаменти

Відомо, що за умови низької йонної сили середовища хроматин розгортається і переходить у стан **нуклеосомного філаменту**, що являє собою вже згадані раніше «буси на нитці» (рис. 84). Така структура, що має 10 нм у діаметрі, по суті, є ланцюжком нуклеосом, поєднаних між собою за допомогою лінкерної ДНК. З підвищенням концентрації солей у середовищі до фізіологічних значень така полінулеосомна «нитка» компактизується до **хроматинного філаменту діаметром 30 нм**, який іноді називають **соленоїдом**. Соленоїд являє собою хелікс, на кожен виток якого припадає по 6 нуклеосом (рис. 88). Вздовж такого філаменту виявляється посмугованість з періодичністю 11 нм, що відповідає діаметру нуклеосомного кору. Причому площини нуклеосом у такому філаменті орієнтовані приблизно паралельно

- в межах 20^0 - відносно його довгої вісі. Саме у вигляді хроматинного філаменту і підтримується структурна цілісність хроматину впродовж більшої частини клітинного циклу.

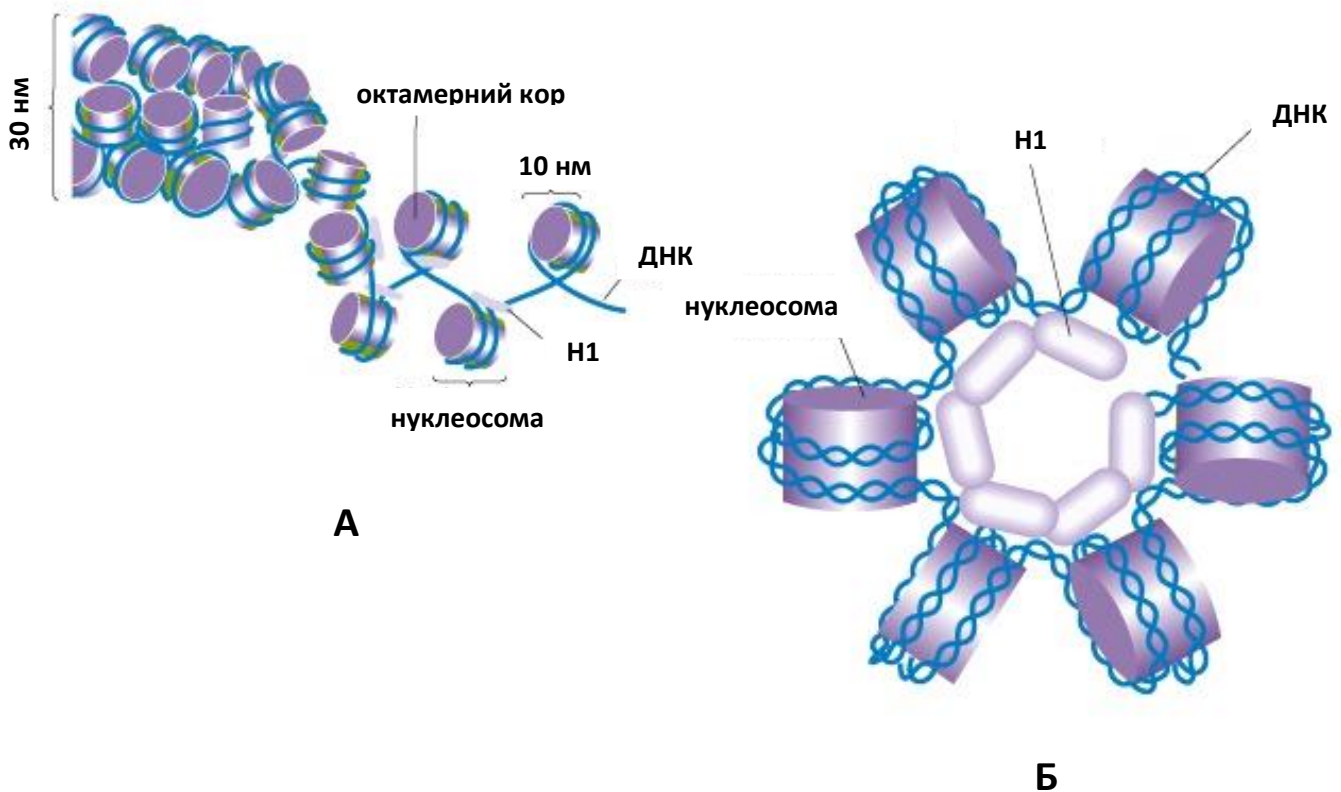


Рис. 88. Перехід нуклеосомного філаменту у соленоїд **(А)** та схема структури останнього **(Б)**.

Залежність форми філаменту від йонної сили середовища виглядає так:

- **За низької йонної сили** виявляється зигзагоподібна «нитка» з типовою будовою «бус на нитці»,
- **За середньої концентрації солі** хроматин набуває форми більш плоскої «стрічки» шириною 25 нм,
- **За 0,1 М NaCl (близько до фізіологічних умов) і вище** «стрічка» реорганізується у хроматинний філамент діаметром 30 нм з посмугованістю 11 нм.

Виявлено, що **гістони Н1 та Н5** відіграють значну роль у **конденсації дезоксирибонуклеопротейінових комплексів** до стану хроматинного філаменту, хоча і не є абсолютно необхідними для цього процесу. Присутність цих гістонів, наприклад, призводить до швидшої більш впорядкованої компактизації хроматину і за нижчих концентрацій солей у середовищі.

Існує **декілька моделей розміщення лінкерних гістонів** та ДНК у складі хроматинної фібрили. Найбільш відомою з них є вже згадана нами **соленоїдна модель**. Оскільки ширина нуклеосомного диску складає 11 нм, можна припустити, що нуклеосоми за цією моделлю розташовуються у вигляді стосиків, довгі вісі яких йдуть паралельно вісі нитки (**рис. 84**). Відомо, що у цьому випадку згортання хроматинна фібрила стабілізується кооперативними взаємодіями між лінкерними гістонами, що розташовуються ближче до середини нитки (**рис. 88**). Недоліком соленоїдної моделі є невизначеність щодо стану лінкерної ДНК, тому недавно була запропонована **модель «згорнутого лінкера»**. За нею лінкерні ділянки ДНК повинні бути специфічно згорнутими між сусідніми нуклеосомами.

7.6. Петельні домени та вищі форми конденсації хроматину

Вищі за хроматинний філамент рівні організації хроматину, наразі вивчені не дуже добре. Це пов'язано з тим, що мітотичні хромосоми, які є найбільш конденсованою формою хроматину, складно піддаються вивченню, оскільки є замалими для дослідження за допомогою світлової мікроскопії, але водночас завеликими для електромагнітних методів. До того ж, негістонові білки, що сприяють компактизації хроматину у хромосоми, виявляються у малих кількостях порівняно з гістонами, тому їх важко виділити та ідентифікувати.

На сьогодні домінуючою моделлю вищої організації хроматину є модель, що була запропонована Ірншоу у 1991 році. Згідно її положень хроматинні філаменти діаметром 30 нм організуються у петлі по 50-100 тисяч пар основ діаметром до 300 нм – так звані **петельні домени (рис. 89)**. Вони, у свою чергу фіксуються на **білках скаффолду** у складі **периферичного ядерного матриксу** або на **кістяку хромосоми під час мітозу**. Такі петлі, як було показано Златановою та Ван-Хольде у 1992 році, приєднані до кістяку нерегулярно.

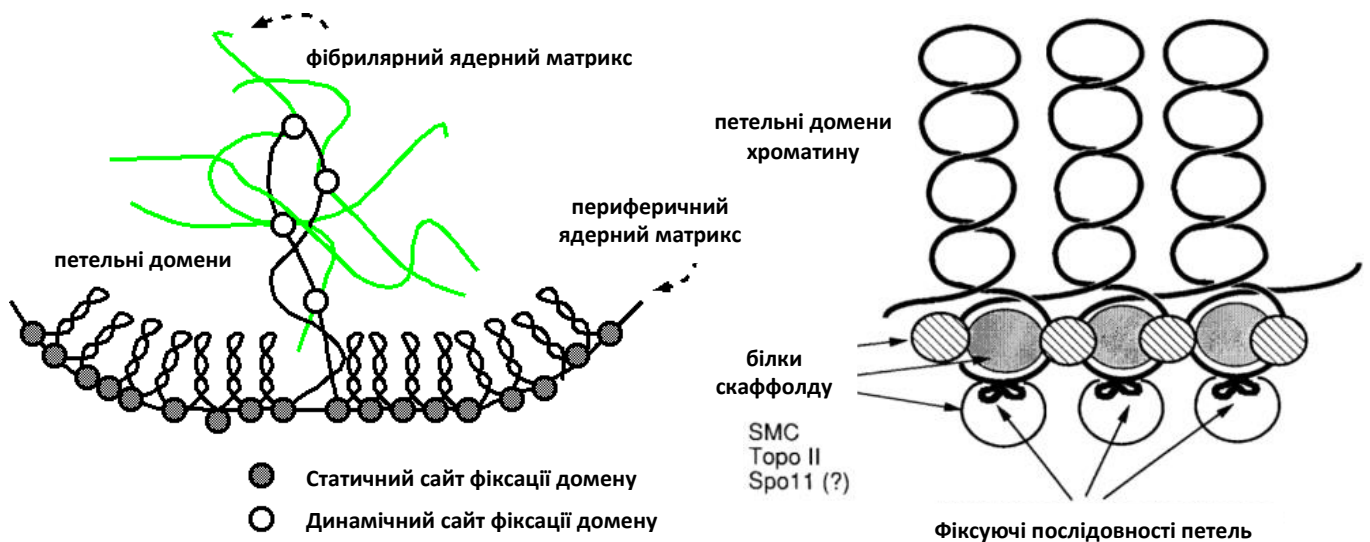


Рис. 89. Схема організації петельних доменів хроматину.

Серед білків скаффолду, які опосередковують взаємодію петельних доменів з периферичним ядерним матриксом, варто відмітити **ламіни А, В та С** (містять сайти приєднання хроматину до ядерної мембрани), **топоімеразу II** (основний фактор регуляції компактизації, який вносить та знімає супервитки ДНК), а також **компоненти центромер та теломер хромосом (у тому числі й теломеразу)**, що, як і топоімеразы, відносяться до групи **білків підтримки структури хромосом SMC (Structural Maintenance of Chromosomes)**. Нарешті, на **рис. 90** схематично представлено структурні рівні повної компактизації хроматину до хромосоми.

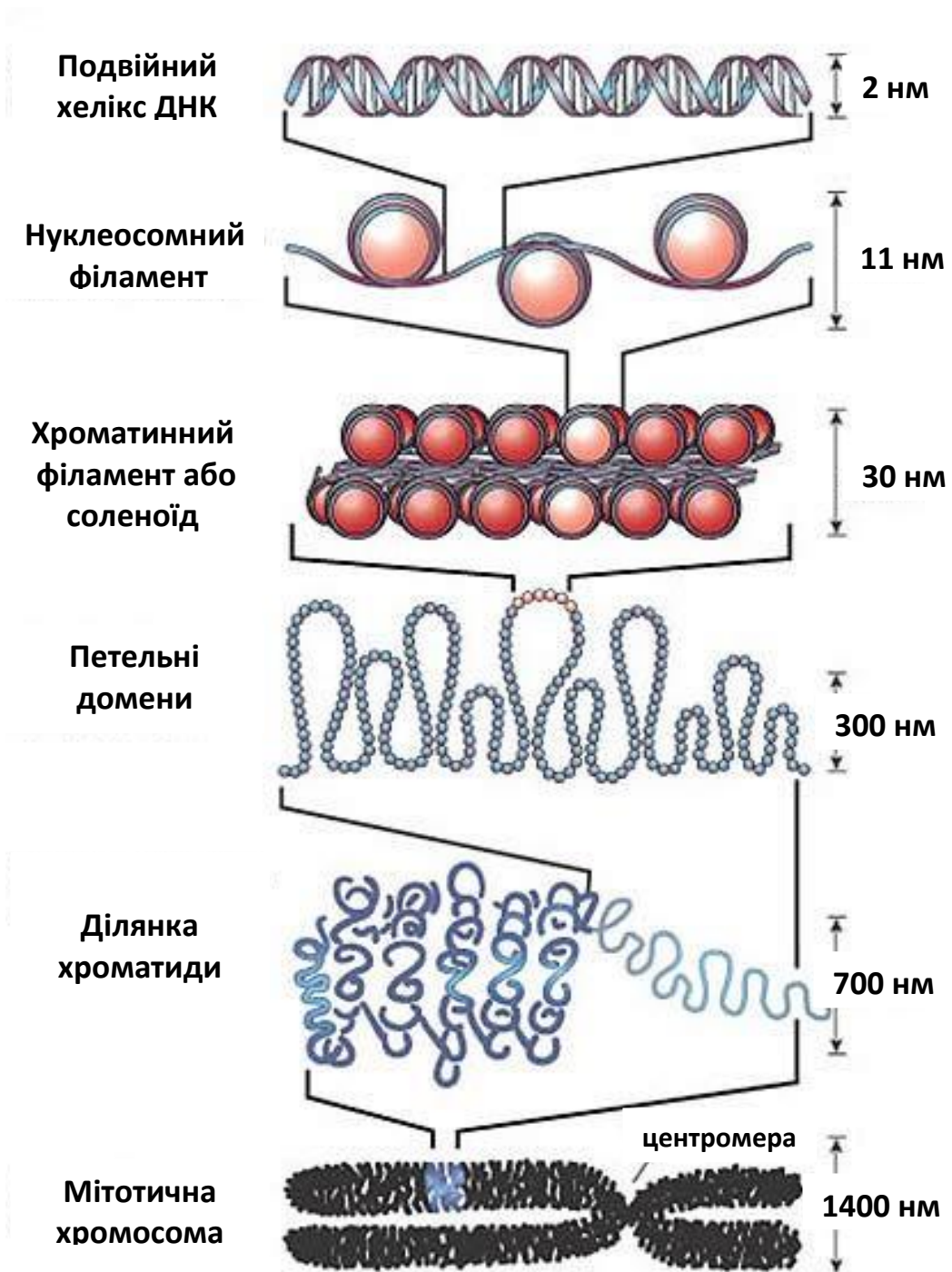


Рис. 90. Схема конденсації ДНК хроматину до хромосоми.

7.7. Позиціонування нуклеосом

Згортання ДНК у хроматин найчастіше асоціюють зі зменшенням доступності самої ДНК. Однак відомо, що лінкерна ДНК у цьому випадку є більш доступною для дії мікрококової нуклеази, ніж коро́ва (нуклеосомна) ДНК. Загалом, для правильного приєднання транскрипційних та інших факторів, що визначає регуляцію загальної активності генів, нуклеосоми у хроматині повинні розміщуватися певним

характерним чином, тобто мати певну форму так званого **позиціонування**. Таке позиціонування має **дві основні форми**:

- 1) **Трансляційне або повздожне** – визначається як довжина контактної ділянки ДНК, що взаємодіє з нуклеосою.
- 2) **Обертальне або поперечне** – визначається орієнтацією поверхні ДНК по відношенню до кору гістонів.

Яскравим прикладом регулярного позиціонування нуклеосом є гени 5S рРНК. Ширина малої борозенки ДНК у регіоні цих генів періодично змінюється з частотою один раз на кожен оберт спіралі. Виявлено, що така зміна зберігається і після приєднання ДНК до нуклеосоми. Взагалі, варіації у ширині малої борозенки, які за періодичністю співпадають з періодичністю хеліксу, як правило, індукують зігнутість ДНК. При цьому зігнутість ДНК у бік гістонового кору призводить до звуження малої борозенки, а в протилежний бік – до розширення. До того ж, таке позиціонування зменшує витрати енергії на згортання ДНК навколо октамеру. Виявлено також, що позиціонування у нуклеосомах зберігається у діапазоні температур від 0 до 70 °С та за концентрації солей у середовищі від до 0,8 М. Це свідчить про значні за силою та енергією взаємодії, що стабілізують розміщення нуклеосом у певній орієнтації по відношенню до ДНК. Нарешті, було встановлено, що у формуванні і підтриманні позиціонування певну роль відіграють негістонові білки, які пов'язані з хроматином.

7.8. Нуклеосоми і транскрипційна активність хроматину

Раніше вважалося, що компактизація ДНК у хроматин призводить до зниження її доступності для ферментів та транскрипційних факторів. Внаслідок цього процеси транскрипції та реплікації інгібуються. Однак, пізніше було доведено, що це не відповідає дійсності, оскільки виявилось, що і транскрипція, і реплікація вільно проходять у нуклеосомальній ДНК, хоча ініціація цих процесів дещо уповільнюється. Відомо, що доступ ефекторних білків та інших молекул до послідовностей ДНК визначається видом її згортання навколо нуклеосом та позиціонуванням останніх. Таким чином, регуляція активності хроматину є залежною не лише від наявності білків-модуляторів експресії та певних послідовностей ДНК, а також і від позиціонування ДНК навколо нуклеосоми, а також конформаційного стану гістонів у складі хроматину.

Відомо, що РНК-полімераза у процесі транскрипції продукує позитивні супервитки попереду транскрипційного комплексу та негативні – позаду. Тому контакти октамерного кору з нуклеосомною ДНК під час транскрипції повинні дестабілізуватися попереду комплексу. Цілком можливо, що такий процес включає у себе від'єднання комплексів гістонового кору та перенесення їх на найближчу

акцепторну ділянку ДНК. Дійсно, *in vitro* була показана можливість такого «перескоку» октамерів через полімеразний комплекс без остаточного вивільнення їх зі складу хроматину у процесі транскрипції. Також було виявлено, що **від'єднання октамерів від ДНК** відбувається і **під впливом транскрипційних факторів (рис. 91)**. Наприклад, додавання до середовища інкубації нуклеосом ДНК-зв'язуючого домену **транскрипційного фактора GAL4-АН** дріжджів призводило до тимчасового утворення комплексу, який складався з білкового фактора, корових гістонів та ДНК. У присутності неспецифічної конкурентної ДНК цей комплекс був нестабільним, і змінював свою форму то на хроматин з ДНК та гістонами, то на чисту ДНК у поєднанні з фактором GAL4. Було також виявлено, що N-термінальні ділянки гістонів виявилися здатними інгібувати приєднання GAL4-АН до ДНК, особливо у центрі нуклеосомного кору. Приєднання ж наступних молекул транскрипційного фактора відбувалося кооперативно і ближче до кінців нуклеосом.

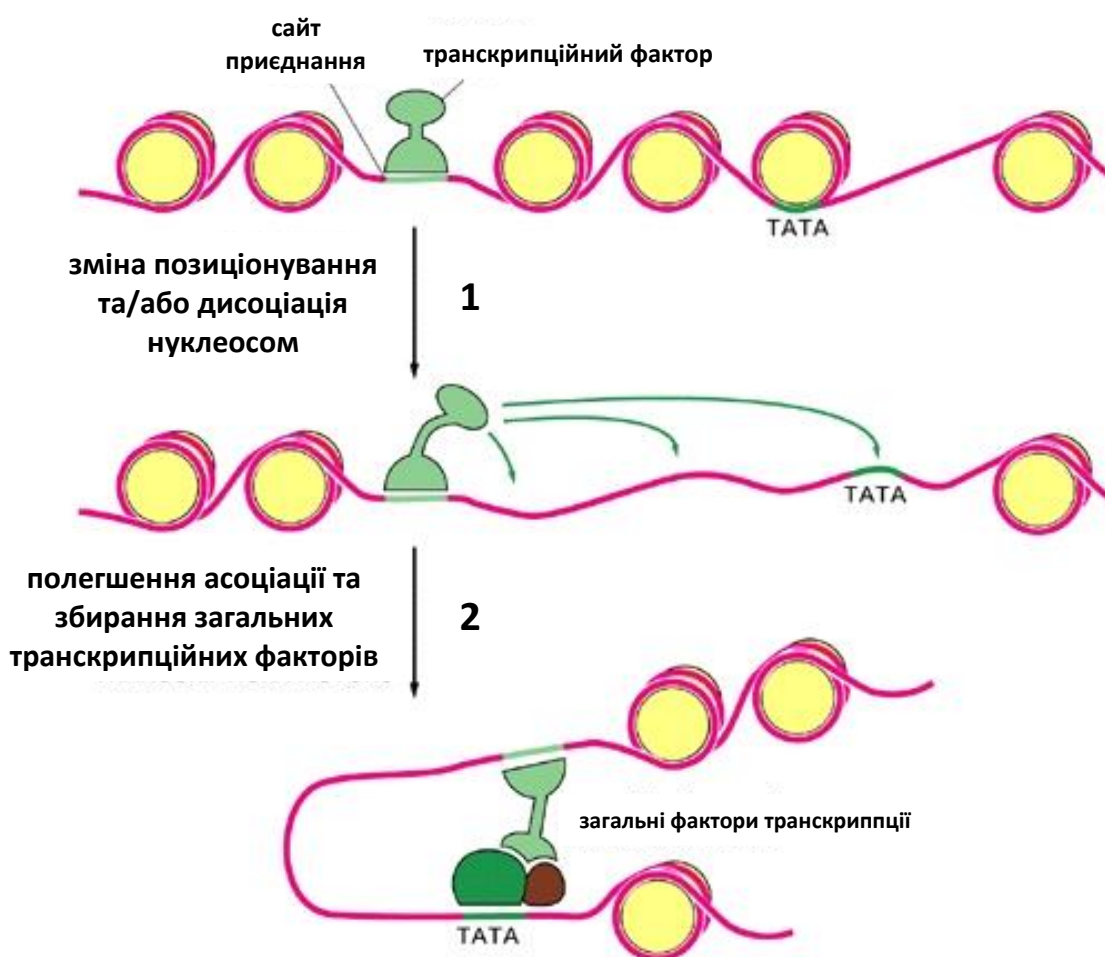


Рис. 91. Схема впливу транскрипційних факторів на позиціонування нуклеосом.

Зв'язування транскрипційних факторів з нуклеосомою може стимулюватися також за допомогою **нуклеоплазміну** - специфічного білку, що контактує з гістонами.

Так, було встановлено, що у присутності GAL4-АН, нуклеоплазмін призводить до **дисоціації димеру H2A-H2B** зі складу нуклеосоми, що у подальшому полегшує обмін тетрамерами (H3-H4)₂ з конкуруючою ДНК. Виявлено також, що N-термінальні ділянки корових гістонів модулюють репресію транскрипції через лінкерний гістон H1. Цікаво, що H1 пригнічує функціонування **транскрипційного фактора USF**, але не має ефекту на GAL4-АН. Ацетилювання N-термінальних ділянок лінкерного гістону або втрата їх контактів з ДНК призводило до нейтралізації інгібування USF з боку H1. Це ще раз вказує на те, що модифікації гістонів відіграють значну роль у ремоделюванні хроматину під час різних функціональних станів останнього.

Нарешті, як уже відмічалось раніше, одним з найбільш важливих факторів зміни позиціонування нуклеосом і моделювання структури хроматину під час транскрипції є участь **білків високої мобільності HMG** (рис. 92).

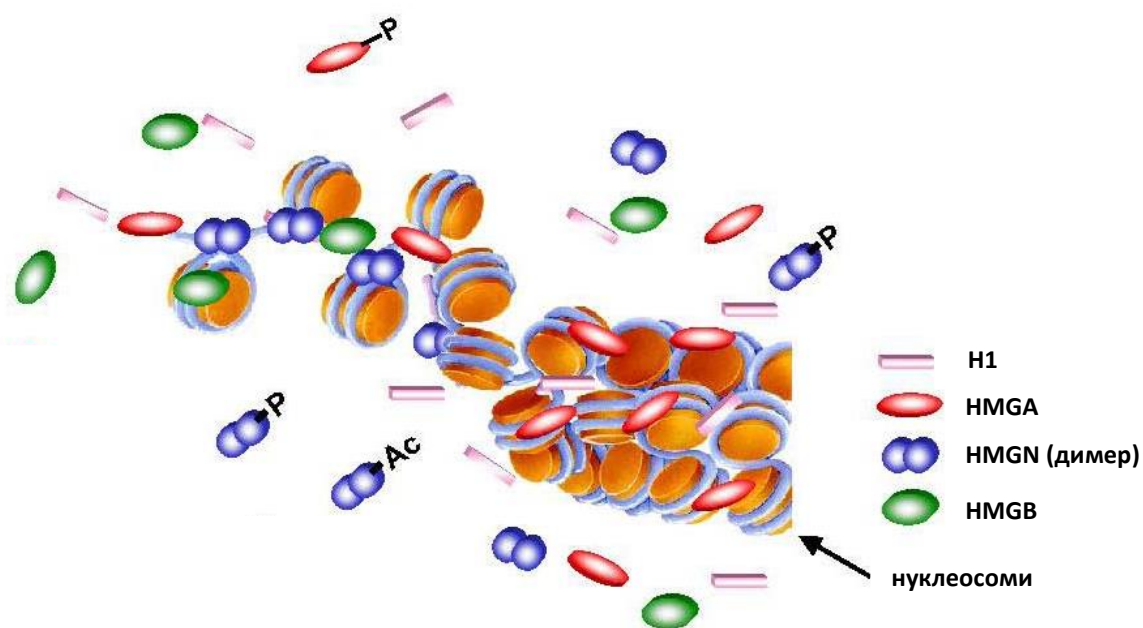


Рис. 92. Роль лінкерного гістону і білків HMG у контролі позиціонування нуклеосом під час ініціації транскрипції. Ас-ацетилювання, Р-фосфорилування

За однією з **моделей регуляції позиціонування** хроматинна фібрила у транскрипційно-активних ділянках локально розкручується перед ініціацією транскрипції. При цьому гістони H1 вивільнюються. До лінкерних ділянок ДНК на місця цих гістонів приєднуються білки HMG. Після цього нуклеосоми на кодуючому ланцюзі розгортаються, причому всі корові гістони залишаються зв'язаними з ДНК.

Далі ланцюги ДНК у цих ділянках тимчасово локально плавляться. Некодуючий ланцюг ДНК зберігає нуклеосоми у згорнутому вигляді з приєднаними до них білками HMG, в той же час на кодуючому ланцюзі з розгорнутими нуклеосомами відбувається збирання РНК-полімеразного комплексу та ініціація транскрипції. Після синтезу мРНК нуклеосоми згортаються і позиціонування відновлюється.

РОЗДІЛ 8. Механізми репарації пошкоджень ДНК

У даному розділі будуть розглянуті механізми унікального, характерного лише для ДНК, явища репарації, тобто, елімінації пошкоджень молекули в рамках розвитку клітинного стресу після дії факторів зовнішнього середовища. Описано сучасні уявлення про організацію основних репараційних систем клітини та функціонування і регуляції білкових комплексів, що залучені до виправлення порушень структури ДНК. Також приводяться дані щодо патологій, викликаних дисрегуляцією основних факторів репарації.

8.1. Види пошкоджень ДНК та пошкоджуючі фактори

ДНК в живих клітинах є постійною мішенню різноманітних пошкоджень, більшість з яких ефективно виправляються. Такі пошкодження реалізуються внаслідок розвитку клітинного стресу завдяки впливу зовнішніх факторів, і поділяються на **чотири основні групи**:

- 1) Хімічна модифікація основ у нуклеотидах,
- 2) Втрата основ (безосновні (б/о) сайти) або нуклеотидів,
- 3) Одно- (о/н) та двониткові (д/н) розриви хеліксу ДНК,
- 4) Внутрішньо- (в/л) та міжланцюгові (м/л) перехресні ковалентні зшивки.

Кожне з вищенаведених порушень структури ДНК може призвести до небажаних успадкованих мутацій. З іншого боку, серед **факторів, які пошкоджують ДНК**, виділяють **наступні (рис. 93)**:

- **Помилки реплікації ДНК** - помилковий вибір нуклеотидів полімеразами, зниження швидкості реплікації або зупинка реплікативної вилки,
- **Дисрегуляція фізіологічних процесів рекомбінації** - особливо у характерно для ембріональних клітин та лімфоцитів,
- **Спонтанні реакції основ** - наприклад, дезамінування,
- **Оксидативний стрес** - дія супероксиданіону, гідроксил-радикалу, тощо,
- **Іонізуюче випромінювання** - α -, β -, γ -промені або нейтронне,
- **Неіонізуюче випромінювання** – ультрафіолет (УФВ), інфрачервоне (ІЧ), високочастотне (ВЧ) та надвисокочастотне (НВЧ) проміння,
- **Дія канцерогенів, тератогенів** та інших хімічно-синтезованих або природних агентів,
- **Розвиток вірусних або (рідше) бактеріальних інфекцій** – особливо тут слід відмітити пряму дію онкогенних вірусів шляхом інтеграції в геном, або непряму через інактивуючий вплив вірусних білків на системи репарації.

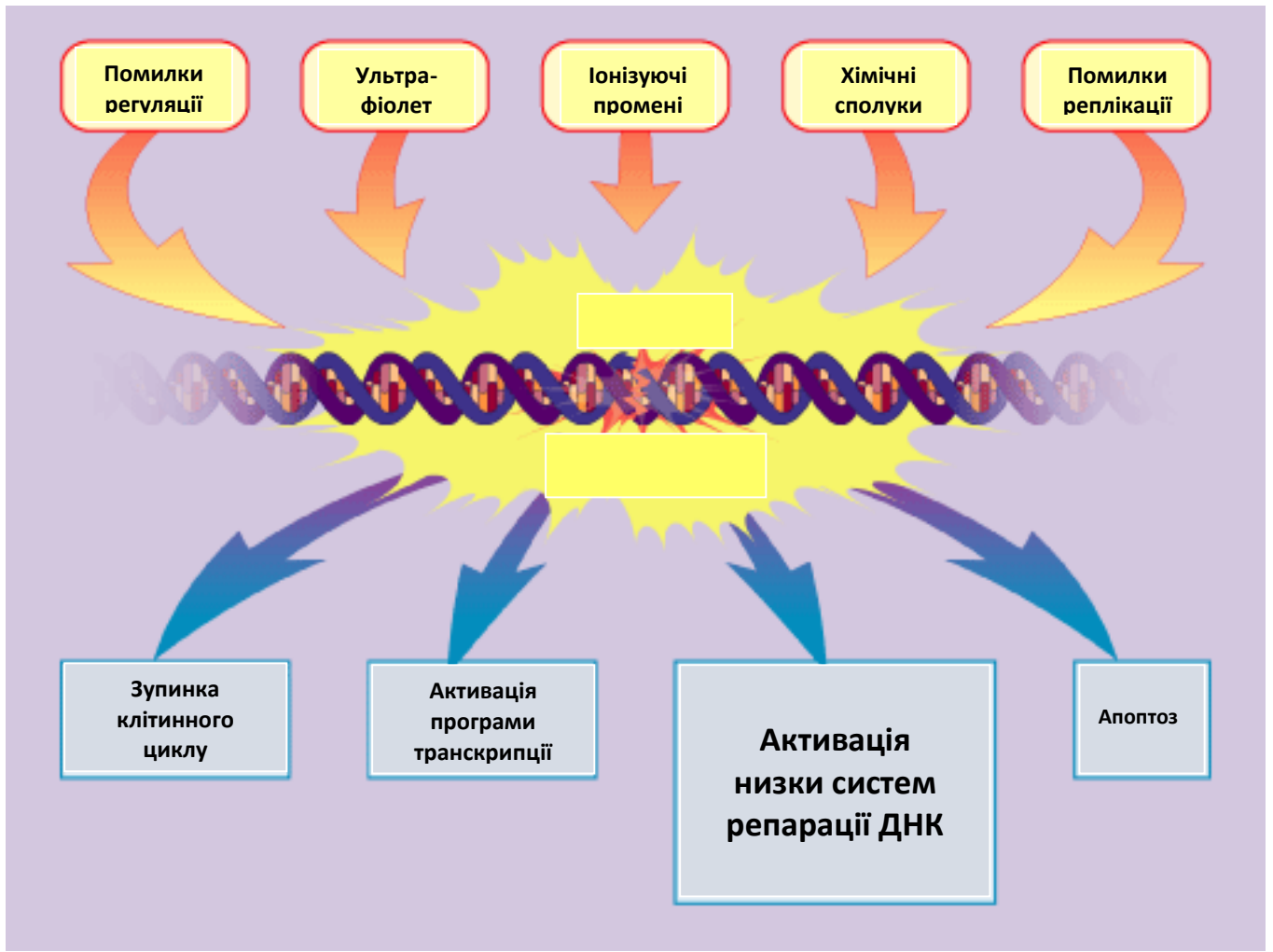


Рис. 93. Причини та можливі наслідки пошкоджень ДНК.

За збереження структурної цілісності, а також стабільності організації ДНК у складі хроматину за будь-яких умов відповідають репараційні системи клітини (рис. 94). Вони існують у вигляді низки факторів – сенсорів пошкодження, месенджерів сигналу, виконавчих ферментів – ДНК-полімераз та лігаз. Фактори, що реагують на різні типи пошкоджень і активують залежні від них ефектори, є різними в залежності від пошкодження ДНК.

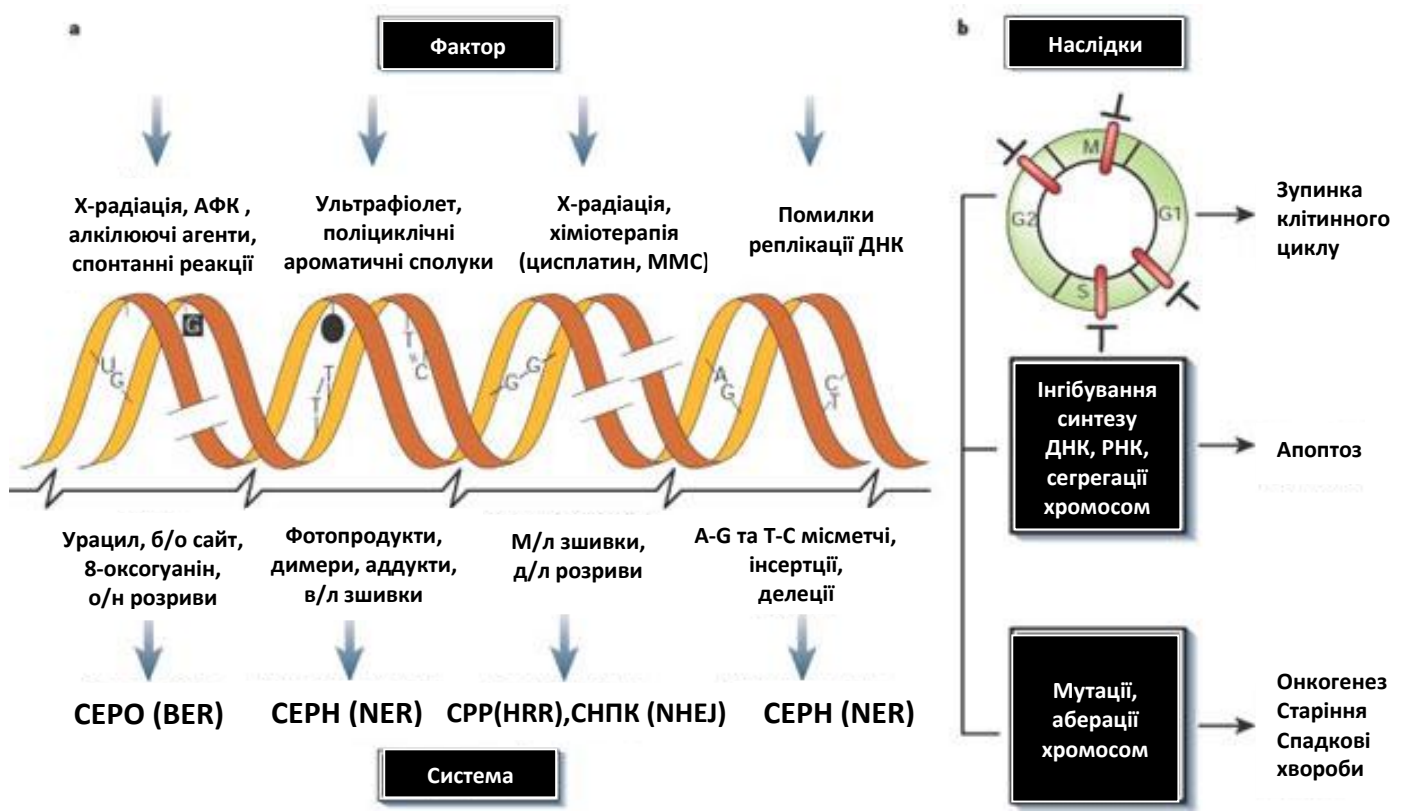


Рис. 94. Види пошкоджень ДНК та репараційних систем їх елімінації. Пояснення абревіатур наведено далі у тексті.

На сьогодні **основними видами репараційних механізмів** клітини вважаються:

- Система ексцизійної репарації основ (CEPO) або BER (Base Excision Repair)
 - Система короткої патч-репарації (СКПР) або SPR (Short Patch-Repair),
 - Система довгої патч-репарації (СДПР) або LPR (Long Patch Repair).
- Система ексцизійної репарації нуклеотидів (CEPH) або NER (Nucleotide Excision Repair),
 - Система репарації місметчів (СРМ) або MR (Mismatch Repair),
 - Система репарації петель (СРП) або LR (Loop Repair),
- Система обхідної репарації (COP) або BR (Bypass Repair).
- Система репарації перехресних зшивок (СРПЗ) або CR (Crosslink Repair),
- Система рекомбінаційної репарації (CPP) або HRR (Homologous Reparation Recombination),
- Система негомологічного поєднання кінців (СНПК) або NHEJ (Non-Homologous End-Joining).

Додаткові дані про вищенаведені системи, які співвіднесені до відповідних пошкоджень ДНК, а також основні фактори регуляції репарації, представлені

табл. 26. Розшифровка абревіатур факторів приводиться далі під час детального розгляду окремих систем репарації ДНК в порядку, вказаному у таблиці.

Таблиця 26. Види порушень структури ДНК та відповідні їм системи і фактори репарації (пояснення абревіатур приводиться в тексті)

Тип порушення	Системи репарації	Основні фактори
Неправильні пари основ (місметчі)	СРМ (MR)	MLH1, MSH2, MSH6, PMS1
	СЕРО (BER)/СКПР (SPR)	UGH
Хімічні модифікації основ	СЕРО (BER)/СКПР (SPR)	UGH, OGG, MGMT, MBD4, MYH
Втрати основ	СЕРО (BER)/СКПР (SPR)	AP-ендонуклеаза, ДНК-полімераза, ДНК-лігаза
В/л зшивки, фотопродукти, димери, аддукти	СЕРН (NER)	XP, ERCC, CSA, CSB, ДНК-полімераза, ДНК-лігаза I
	СОР (BR)	ДНК-полімерази η та ι
М/л перехресні зшивки	СРПЗ (CR)	FANC, RAD52, NBS1, MRE11, RAD50, RAD51, BRCA2, BLM
Д/н розриви	СРР (HRR)	RAD52, NBS1, MRE11, RAD50, RAD51, BRCA2, BLM
	СНПК (NHEJ)	KU70, KU80, NBS1, MRE11, RAD50, FEN1, WRN, ДНК-лігаза IV

Розшифровка абревіатур факторів приводиться далі під час детального розгляду окремих систем репарації ДНК в порядку, вказаному у таблиці.

8.2. Система ексцизійної репарації

Система ексцизійної репарації (СЕР) або ER (Excision Repair) займається виправленням помилок реплікації ДНК, які відносяться до групи **ендогенних чинників пошкоджень**. Як відомо, найбільш чутливими до пошкоджень ДНК є

активно проліферуючі клітини з інтенсивною реплікацією геному, тому саме серед них ризик помилок у процесі синтезу нових молекул ДНК є найвищим. **Такими помилками є:**

- Вибір та вбудовування неправильних нуклеотидів у ланцюг,
- Затримка реплісоми на тандемних повторах,
- Перетворення одониткових розривів на двониткові у процесі реплікації,
- Зупинка реплісоми на складних або модифікованих екзогенними канцерогенами чи ендогенними білками ділянках ДНК.

Реплікація ядерної ДНК сама по собі є точним механізмом, однак забезпечується додатковою можливістю виправити помилки інтеграції нуклеотидів - проофрідингом завдяки 3'-5'-екзонуклеазній активності деяких з ДНК-залежних ДНК-полімераз. Завдяки цьому вбудовування помилкового нуклеотиду зустрічається не частіше одного випадку на 10^6 пар основ. Легко підрахувати, що, незважаючи на таку точність, під час копіювання геному людини довжиною приблизно 4×10^9 пар основ, буде зроблено декілька сотень помилок реплікації. Тому, для подальшого підвищення точності копіювання ДНК в клітині функціонує система ексцизійної репарації, завдяки якій ймовірність помилки знижується до однієї на 10^{10} пар основ.

Ексцизійна система репарації поділяється на **дві основні «гілки»:**

- 1) **Ексцизійної репарації основ (CEPO) або BER (Base Excision Repair),**
- 2) **Ексцизійної репарації нуклеотидів (CERN) або NER (Nucleotide Excision Repair).**

В цілому, як уже згадувалося, основною функцією ECP є попередження мутацій та інших наслідків помилок реплікації. Наприклад, **затримка реплісоми на повторюваних тандемах ДНК** як правило, призводить до утворення одониткових петель (**рис. 95**). ECP позбавляє від цих петель. Затримка дуже часто відбувається, наприклад, на мікросателітних послідовностях ДНК з тандемними повторами довжиною 2 - 4 пар основ, які є сайтами ризику мутацій, навіть за умови повного функціонування ECP. Тому мікросателітні ділянки часто є поліморфними.

Також відомо, що **поява неправильних пар основ внаслідок переходів основ між мезомерними ізоформами**. Загалом мезомери існують для всіх основ ДНК, і деякі з них є нетривалими, але можуть стабілізуватись хімічною модифікацією. Наприклад, гідроксилування гуаніну за положенням C8 стабілізує неканонічну пару G-A, у відповідь на присутність якої індукуються фактори ECP.

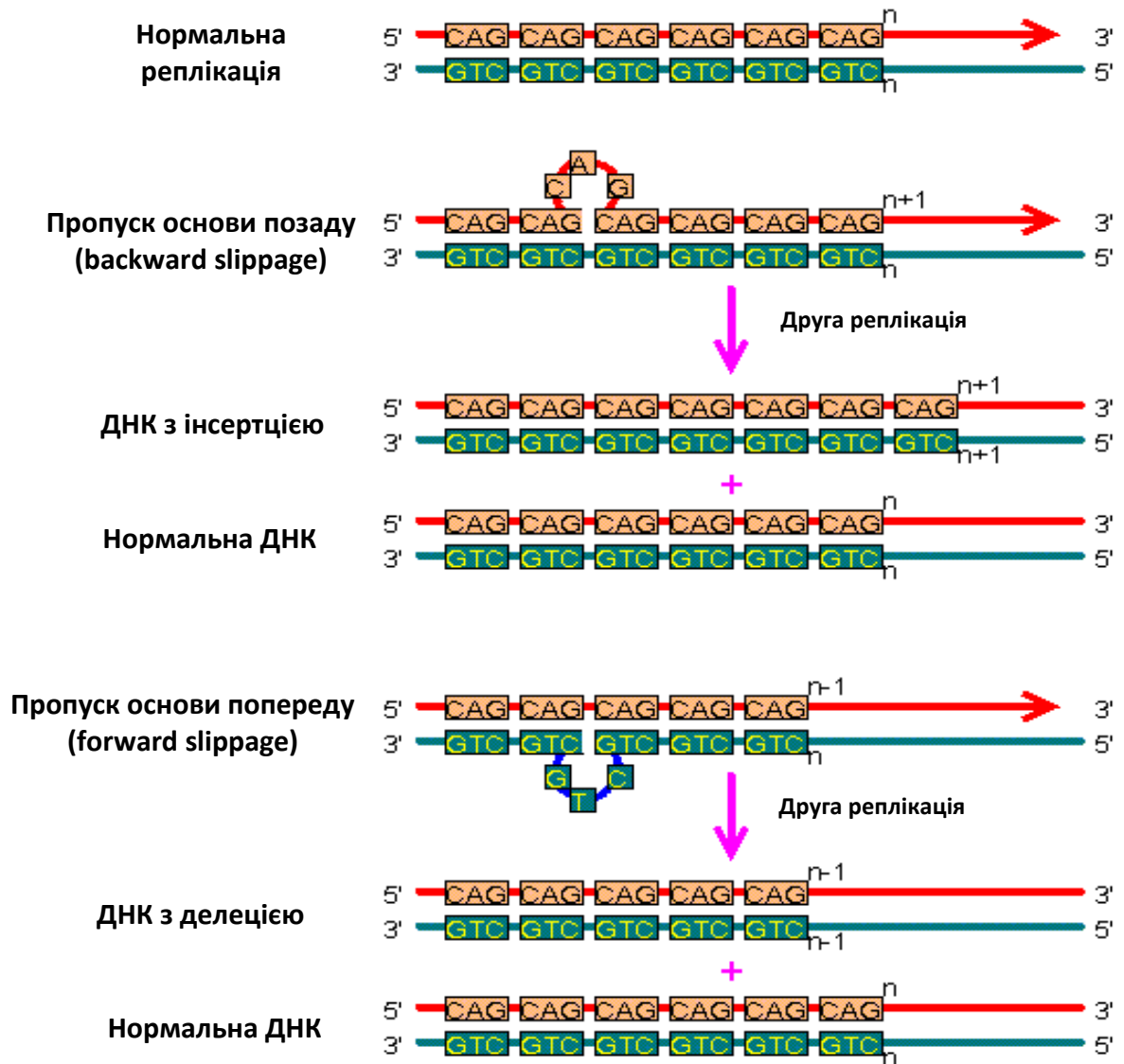


Рис. 95. Типові помилки реплікації внаслідок затримок ДНК-полімерази.

Недостатність дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, як попередників синтезу ДНК, також може бути причиною помилок реплікації. Варто відмітити, що шляхи біосинтезу нуклеотидів мають декілька перехресних механізмів регуляції, про що мова піде пізніше. У даному відношенні потрібні такі механізми у тому числі і для мінімізації ймовірності появи порушень структури ДНК. Наприклад, відомо, що **дисрегуляція синтезу гуанінових нуклеотидів,** що є найбільш критичною подією, активує захисні механізми, опосередковані білком р53. Після дГТФ найбільш критичною є недостатність дТТФ, оскільки ДНК-полімерази не дуже точно «відрізняють» цей нуклеотид від дУТФ. З цієї є причини рівень дУТФ у клітинах шляхом гідролізу спеціально пригнічується. Таким чином, у клітинах з недостатністю дТТФ, наприклад, викликаною порушенням функціонування фолатної системи, або

внаслідок хеміотерапії метотрексатом, відбувається **включення урацилу** на місце тиміну. Така помилка елімінується одним з ферментів ЕСР, а саме – специфічною урацил-N-глікозилазою UNG (Uracil-N-Glycosylase, КФ 3.2.2.27), яка розщеплює глікозидний зв'язок і вилучає «непотрібний» урацил. Однак, у процесі дії цього ферменту можуть утворюватися безосновні сайти, які за відсутності репарації можуть переходити у односторонні розриви ланцюгів ДНК.

ЕСР також може активуватися у відповідь на появу **спонтанних або індукованих хімічних модифікацій основ**. Наприклад, **спонтанне гідролітичне дезамінування цитозину** призводить до утворення урацилу, не властивого для ДНК. Такі основи, як і у попередньому прикладі, вилучаються урацилглікогідроксилазами. Активності цих ферментів достатньо для елімінації близько 1000 урацилів у одній клітині протягом доби. Відомо, що швидкість дезамінування цитозину збільшується під впливом, наприклад, нітразування аміногруп цієї основи. **Дезамінуванню може підлягати також метилцитозин**, в результаті він перетворюється на тимін. Окиснення метильної групи у складі метилцитозину до гідроксиметильної, збільшує ймовірність дезамінування з утворенням гідроксиметилтиміну. Останній також може формуватися прямо з тиміну під дією АФК. Серед пуринів **спонтанне дезамінування аденіну** призводить до появи гіпоксантину у складі нуклеотиду інозину. Для вилучення всіх цих основ існують свої спеціалізовані глікозилази.

Найпоширенішим прикладом індукованих модифікацій є **метилування**. Найчастіше **метилуванню піддається цитозин** з утворенням вже згаданого тут 5-метилцитозину, на який в середньому припадає 3-5% всіх залишків цитозину геному клітини. Метилцитозин, як уже відмічалось, може перетворитися на тимін після дезамінування. Функцію позбавлення від даної основи виконує спеціалізована репараційна G-T глікозилаза (Thymine DNA Glycosylase, КФ 3.2.2.29), яка вилучає тимін. Відомо, що метильовані динуклеотидні послідовності mCpG у складі ДНК є сайтом підвищеного ризику мутацій, оскільки можуть давати нетипові пари C-T або G-A.

Серед пуринових основ **найбільш чутливим до модифікуючих чинників є гуанін**. Як правило, модифікації цієї основи проходять у положеннях N7 або O6 за допомогою атак електрофілів, серед яких, в першу чергу, варто відмітити **S-аденозилметіонін, як донор метильних груп**. Метилування гуаніну також може призвести до появи неканонічних пар основ, тому такі метильні групи вилучаються спеціалізованим ферментом – так званою метилгуанілметилтрансферазою MGMT (Methyl Guanlyl Methyl Transferase, КФ 2.1.1.63). До речі, окрім метильної, даний фермент може вилучати і інші алкільні групи, за рахунок чого попереджає алкілування гуаніну канцерогенами та цитостатиками. Цікаво, що у багатьох типах пухлин MGMT інгібується. Нарешті, ще однією розповсюдженою модифікацією є окиснення гуаніну до 8-оксигуаніну, який вилучається ферментом оксогуанілглікогідролозою OGG1 (Oxoguanine Glycohydrolase 1, КФ 3.2.2.23).

8.3. Система ексцизійної репарації основ

Система ексцизійної репарації основ (СЕРО) або BER (Base Excision Repair) є підвидом ексцизійної репарації, яка елімінує **модифіковані основи та безосновні (б/о) сайти**. Загальний алгоритм функціонування СЕРО є типовим для систем репарації і полягає у:

- 1) Детекції зміненого сайту ДНК,
- 2) Вилученні зміненої основи, якщо вона присутня за допомогою глікозилаз,
- 3) Ексцизії, або «розрізанні» ланцюга у безосновному сайті,
- 4) Вилученні ділянки ДНК безосновного сайту,
- 5) Заповненні утвореного проміжку нуклеотидами з використанням комплементарного ланцюга у якості матриці ДНК-полімеразами,
- 6) «Зшиванні», або лігуванні розриву в ланцюзі специфічними ДНК-лігазами,
- 7) Регуляції всього процесу під дією специфічних білкових факторів.

Серед причин появи безосновних сайтів перше місце займає **спонтанна втрата основ - апуринізація та апіримідинізація**, які відбуваються за рахунок стохастичного гідролізу глікозидних зв'язків у нуклеотидах. Апуринізація зустрічається приблизно в 20 разів частіше, ніж апіримідинізація. Підраховано, що кожної доби геном однієї клітини втрачає приблизно 20000 пуринових основ. Ще одна причина появи б/о сайтів – розщеплення глікозидних зв'язків специфічними глікозилазами для вилучення неканонічних або модифікованих основ, тобто, внаслідок незавершеної репарації. Нарешті, основи можуть втрачатися і внаслідок пошкоджуючої дії екзогенних факторів.

СЕРО функціонує у вигляді **двох основних систем**:

- 1) Система короткої патч-репарації (СКПР) або SPR (Short Patch Repair) – використовується у випадку порушень відносно невеликого масштабу, коли зміненим є лише один нуклеотид.
- 2) Система довгої патч-репарації (СДПР) або LPR (Long Patch Repair) – призначена для корекції більш серйозних змін - безосновних або модифікованих сайтів з декількох розміщених нуклеотидів, або у випадку коли видозмінюється дезоксирибоза чи втрачається її 5'-фосфатна група, необхідна для активації ДНК-лігази.

Основними елементами СКПР є:

- Специфічні глікозилази – своя для кожної з модифікованих основ.
- Ендонуклеази APE1 або APEX2 (Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease).
- ДНК-полімераза β .
- ДНК-лігаза III.
- Регуляторний фактор XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1).

СКПР починає діяти через впізнання зміненого або безосновного сайту в ДНК (рис. 96, А). Якщо такий сайт має змінену основу, йде її вилучення специфічною глікозилазою. Після цього **ендонуклеази APE1 та APEX1** (КФ. 4.2.99.18), які є чутливими до безосновних ділянок, розщеплюють ланцюг ДНК у місці такого сайту, залишаючи вільною 3'-гідроксильну групу у якості сигналу для полімерази. У випадку вже утвореного б/о сайту, впізнання також здійснюється ферментами APE. Далі **ДНК-полімераза β** (КФ 2.7.7.7) за рахунок власної екзонуклеазної активності вилучає дезоксирибозу і замінює її на потрібний повний нуклеотид, використовуючи паралельний ланцюг ДНК у якості матриці. Замикання ланцюга здійснюється **ДНК-лігазою III** (КФ 6.5.1.1). Нарешті, функціонування останніх двох ферментів регулюється та координується за допомогою **білкового фактора XRCC1**.

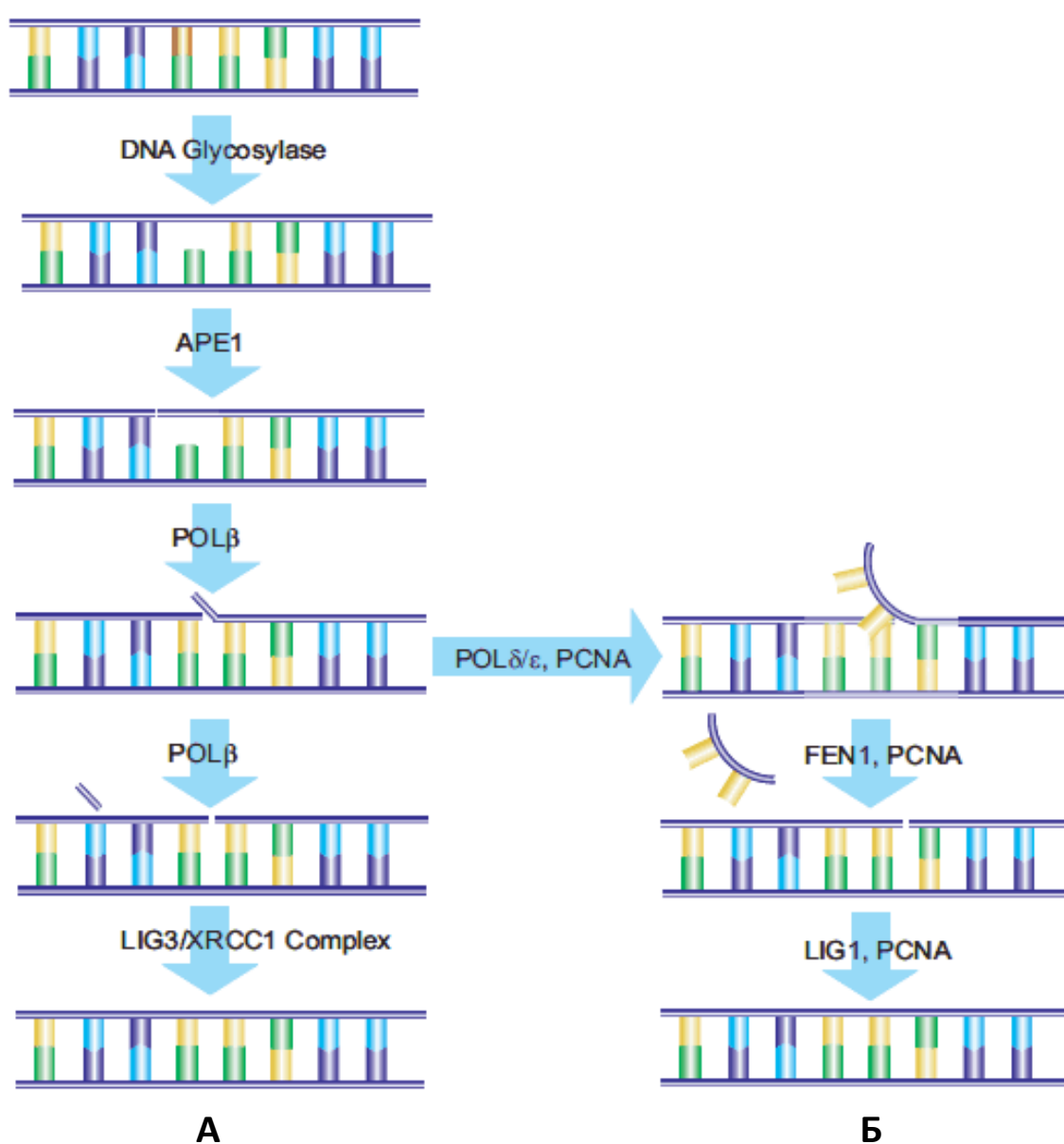


Рис. 96. Схема функціонування систем короткої (А) та довгої патч-репарації (Б).

Елементами складнішої **СДПР** виступають:

- Специфічні глікозилази,
- Ендонуклеази АРЕ1 або АРЕХЛ2,
- ДНК-полімераза β /ДНК-полімераза δ /ДНК-полімераза ϵ ,
- Ендонуклеаза FEN (Flap 1 Endonuclease),
- ДНК-лігаза I,
- Фактор PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

Послідовність подій СДПР на початковому етапі є ідентичною СКПР. Змінений сайт так само розпізнається і модифікована основа (якщо вона присутня) теж вилучається **специфічною глікозилазою**. **АР-ендонуклеаза** (КФ 4.2.99.18) розпізнає б/о сайт і розрізає ланцюг зі сторони 5'-кінця пошкодженої ділянки, залишаючи вільною 3'-гідроксильну групу. Далі, на відміну від СКПР, у якості полімераз можуть виступати три ферменти - **ДНК-полімерази β , δ або ϵ** (КФ 2.7.7.7). Вони заповнюють проміжок новими нуклеотидами, у процесі чого додатково відбувається також і заміна ділянки у 15-20 нуклеотидів у складі старого ланцюга поблизу зміненої ділянки ДНК на новий (Displacement Synthesis). Отже, цей метод називається довгою патч-репарацією, оскільки довжина синтезованої ділянки є більшою, ніж під час короткої патч-репарації (**рис. 96**). Після синтезу Далі старий ланцюг вилучається **Flap ендонуклеазою FEN** (КФ 3.1.x.x) з формуванням фосфорильованого 5'-кінця для активації лігази. Замикання ланцюга проводиться за допомогою **ДНК-лігази I** (КФ 6.5.1.1). Дія останніх чотирьох ферментів регулюється білковим фактором PCNA, який є одним з основних елементів реплісоми.

8.4. Система ексцизійної репарації нуклеотидів

Система ексцизійної репарації основ (СЕРН) або NER (Nucleotide Excision Repair) направлена на **позбавлення від неканонічних (некомплементарних) пар основ** - так званих **місметчів (mismatch)**, а також **однониткових петель**, щоб попередити появу **інсертцій або делецій (рис. 95)**. Відповідно, СЕРН включає в себе **дві функціональні гілки**:

- 1) Система репарації місметчів (СРМ) або MR (Mismatch Repair),**
- 2) Система репарації петель (СРП) або LR (Loop Repair).**

Обидва види вищенаведених змін структури ДНК виникають внаслідок помилок реплікації, а саме – вибору та інтеграції некомплементарних основ у ланцюг ДНК-полімеразою під час синтезу у першому випадку, та затримок реплісоми у процесі руху вздовж матриці ДНК - у другому.

Узагальнена схема дії ECPH (NER) еукаріот нагадує схему ECPO (BER):

- 1) **Детекція** зміненого сайту (місметчу або петлі),
- 2) **«Розрізання», або ексцизія** ланцюга у місці локалізації місметчу або петлі,
- 3) **Вилучення** короткої послідовності ДНК, включаючи змінений сайт,
- 4) **Заповнення** проміжку нуклеотидами згідно принципу комплементарності з використанням матриці ДНК,
- 5) **Поєднання, або лігування** ланцюга ДНК-лігазами.

Детекція здійснюється різними білковими факторами в залежності від виду змін - **місметчі** розпізнаються білками **MSH2 та MSH6 (MutS Protein Homologs, рис. 97)**, а **однориткові петлі ДНК** виявляються за допомогою **MSH3 та MSH2**. Після розпізнавання сайту репарації у дію вступають **фактори PMS2 (Postmeiotic Segregation Increased 2) та MLH1 (MutL Homolog 1)**. У якості ендонуклеаз, скоріше за все, залучаються стандартні **компоненти реплісоми та ендонуклеаза EXO1 (Exonuclease 1, КФ 3.1.x.x)**. У якості полімераз виступають **ДНК-полімерази δ або ϵ (КФ 2.7.7.7)**. Нарешті, дія факторів ECPH **регулюється з боку PCNA**, який є компонентом реплісоми.

Двома дилемами функціонування ECPH є **вирішення яку саме з основ неправильної пари вилучати та як саме обходитися з одноритковими петлями**, в залежності від того, чи призведуть вони до делеції або інсерції (**рис. 95**). У **прокаріотичних організмах** ці проблеми вирішуються простіше, **оскільки їх геном (матрицю) перед реплікацією метильовано**, а пари основ у новосинтезованих регіонах ДНК спочатку не мають метильних груп. Таким чином, диференціація джерел появи однориткових петель полегшується. У еукаріотах механізм такого розпізнавання, очевидно, складніший, але його поки не вивчено.

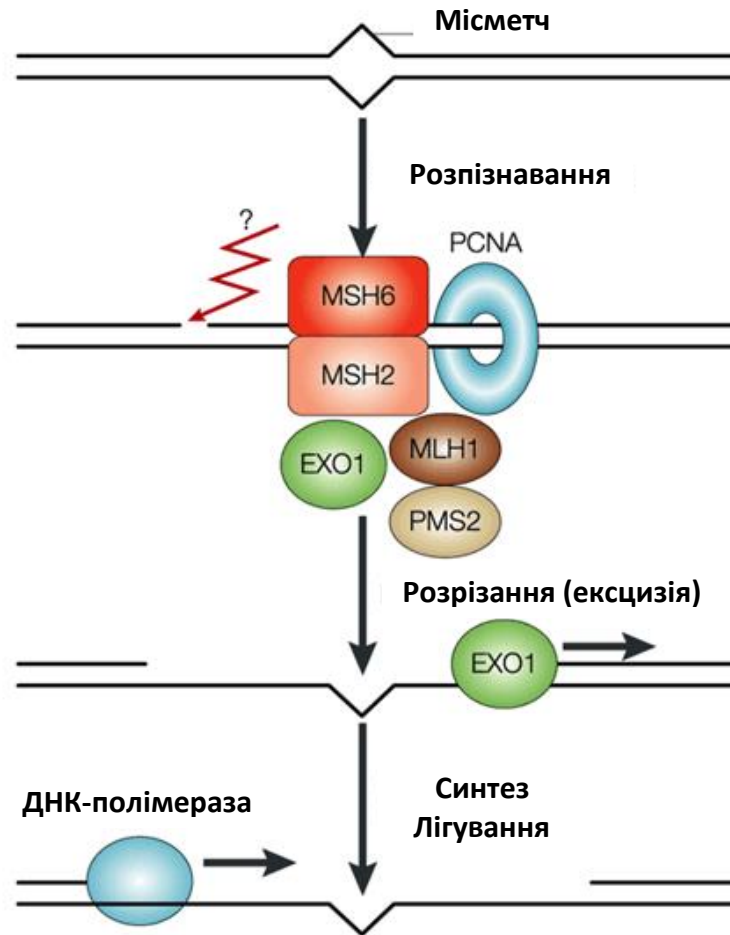


Рис. 97. Функціонування системи репарації місметчів.

Основними факторами **СЕРН** у прокаріот є білки родини **Mut (Mutators)**, які гомологічні еукаріотичним **MSH** (рис. 98). Існує три таких білки:

- **MutS** - гомолог комплексу **MSH2-MSH6**,
- **MutL** – гомолог комплексу **MSH2-MSH3** та **MLH1**,
- **MutH**.

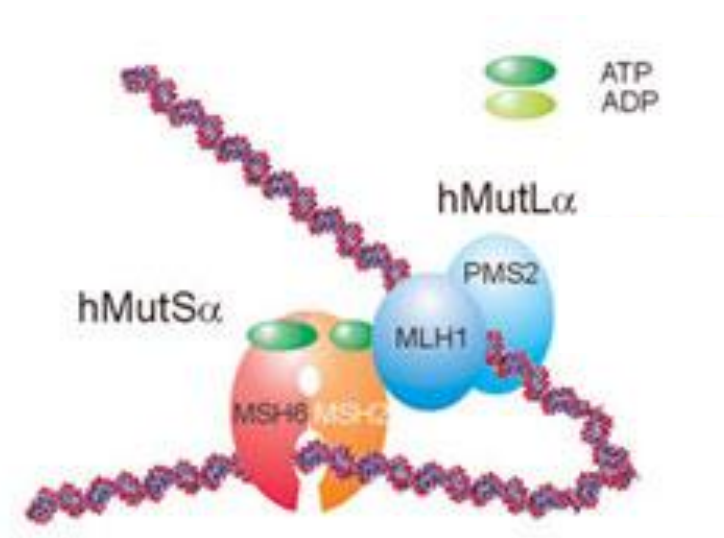


Рис. 98. Відповідність про- та еукаріотичних діючих факторів СЕРН.

У ході функціонування бактеріальної СЕРН (**рис. 99**) сайт місметчу розпізнається білком **MutS**, причому останній утворює з першим спеціальний розпізнавальний комплекс. Далі **MutL** за рахунок гідролізу однієї молекули АТФ зв'язується з MutS і утворюється так званий преінцизійний комплекс. Після цього білок **MutH** з використанням двох АТФ приєднується до специфічного сайту, наближеного до місметчу і метильованого системою **DAM** за залишками аденозину у послідовності **STAG**, причому комплементарна їй ділянка **GATC** на протилежному ланцюзі неметильована. Саме так визначається напрямок вилучення некомплементарної пари або петлі. Отже, три білки Mut утворюють **інцизійний комплекс**.

Після цього неметильований ланцюг розщеплюється за рахунок нуклеазної активності MutH за місцем сигнальної послідовності **GATC**. Далі MutH заміщується у складі комплексу на фактор **UvrD (Ultra-Violet Repair Protein D)** – утворюється так званий постінцизійний комплекс. UvrD розплітає ланцюги ДНК у місці сигнальної послідовності, причому утворені одноланцюгові ділянки, як і під час реплікації, стабілізуються білками **SSB (Single Strand Binding)**. Далі відбувається «вирізання» ділянки місметчу з декількома прилеглими нуклеотидами за рахунок ексцизійних ексонуклеаз **Ехо-1, ЕхоVII, ЕхоX або RecJ**. Нарешті, утворений проміжок заповнюється ДНК-полімеразами I та/або III і зшивається ДНК-лігазою.

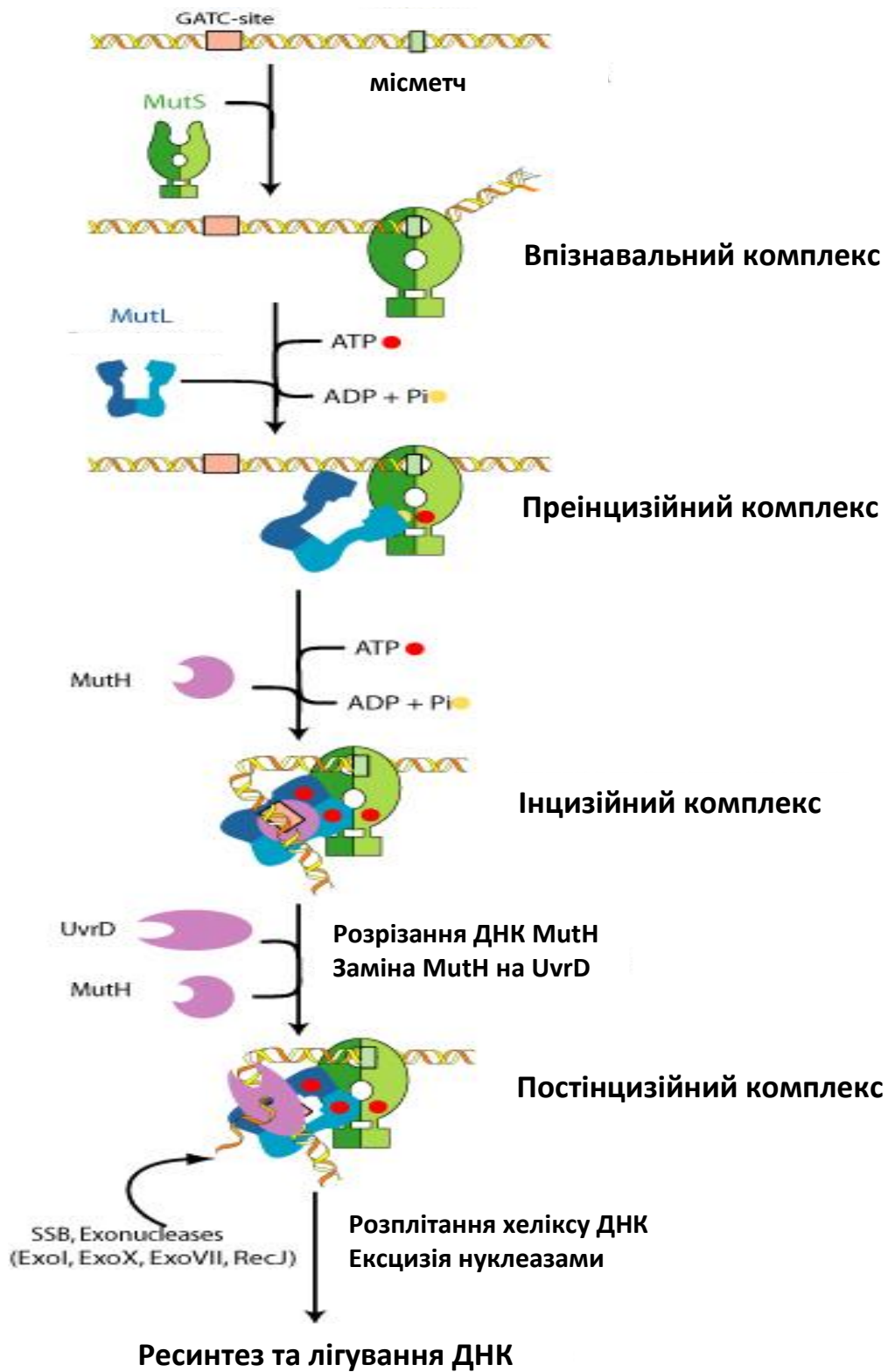


Рис. 99. Схема функціонування бактеріальної системи репарації місметчів. GATC-site – сайт GATC, SSB (single strand binding) – білки стабілізації одноланцюгових ділянок ДНК, Exonucleases – екзонуклеази.

8.5. Екзцизійна репарація внутрішньоланцюгових (повздожніх) та міжланцюгових (поперечних або перехресних) ковалентних «зшивок» ДНК

Ковалентні «зшивки» в ланцюгах ДНК є небезпечними, оскільки їх наявність повністю блокує реплікацію регіонів геному. Головним пошкоджуючим фактором, який призводить до появи зшивок, є **ультрафіолетові промені**, особливо у діапазоні довжин хвиль **від 280 до 320 нм**. Цей діапазон є близьким до максимуму поглинання ДНК (260 нм), до того ж промені цієї довжини хвилі проникають через шкіру у тканини живого організму. Іншими факторами **утворення ковалентних «зшивок»** виступають **хімічні речовини (інтеркалятори), активні форми кисню, тощо**.

Взагалі, «зшивки» ланцюгів ДНК можуть мати **дві форми**:

- 1) Повздожні або внутрішньоланцюгові (в/л) зшивки (intrastrand crosslinks)** – утворюються у межах одного ланцюга між сусідніми основами.
- 2) Поперечні або міжланцюгові (м/л) зшивки (interstrand crosslinks)** – утворюються між основами у сусідніх ланцюгах.

Повздожні «зшивки» утворюються за рахунок **хімічної реакції формування ковалентних зв'язків** між сусідніми піримідинами одного ланцюга, що призводить до появи так званих фотопродуктів - **циклобутанових тимін-тимінових димерів або ж 6-4-фотопродуктів «тимін-цитозин» та «цитозин-цитозин» (рис. 100)**. Варто відмітити, що подібні продукти утворюються також за дії певних хімічних речовин та канцерогенів. Прикладом можуть слугувати **афлатоксин або бензпірен (рис. 101, А та Б)**, що формують димери з гуанінових залишків. **Поперечні (перехресні) «зшивки»** між ланцюгами у молекулі ДНК, виникають, наприклад за дії **цисплатину або мітоміцину С (рис. 102, А та Б)**, які часто використовуються у якості антиканцерних терапевтичних агентів.

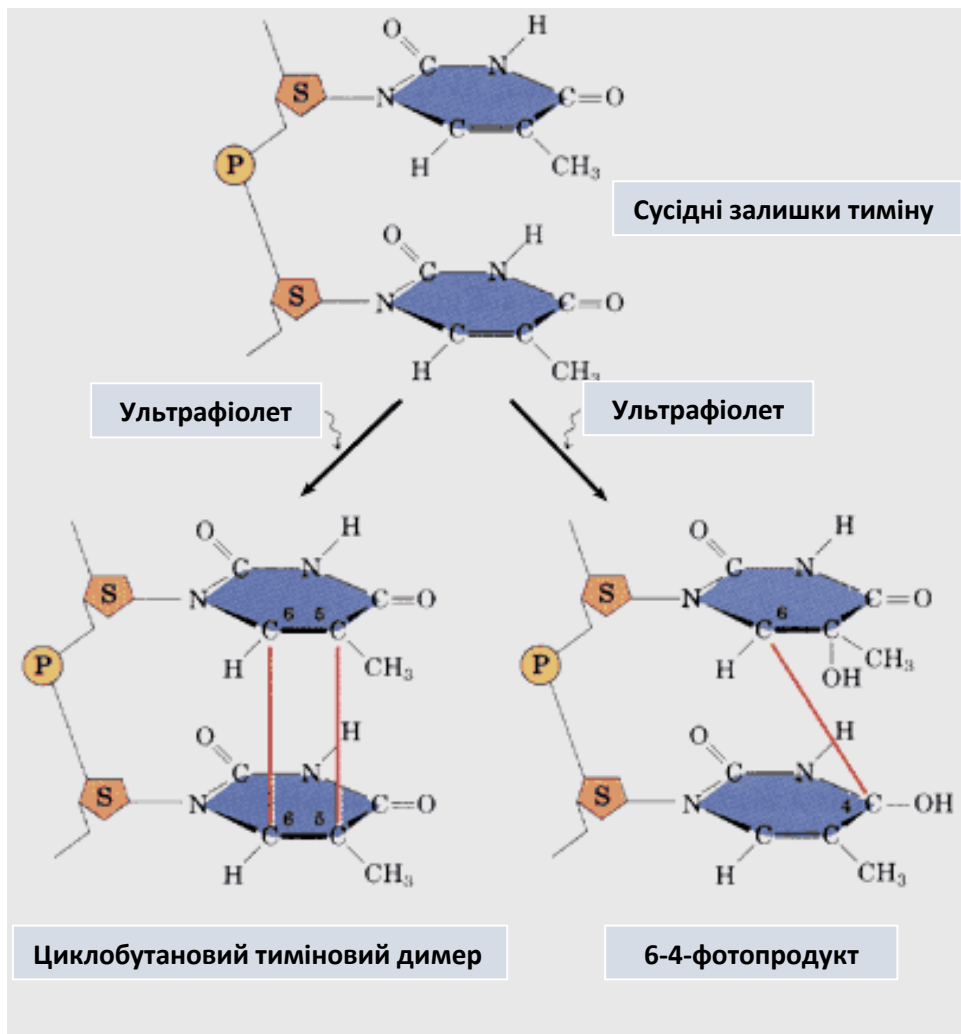


Рис. 100. Утворення тимінового димеру та 6-4-фотопродукту.

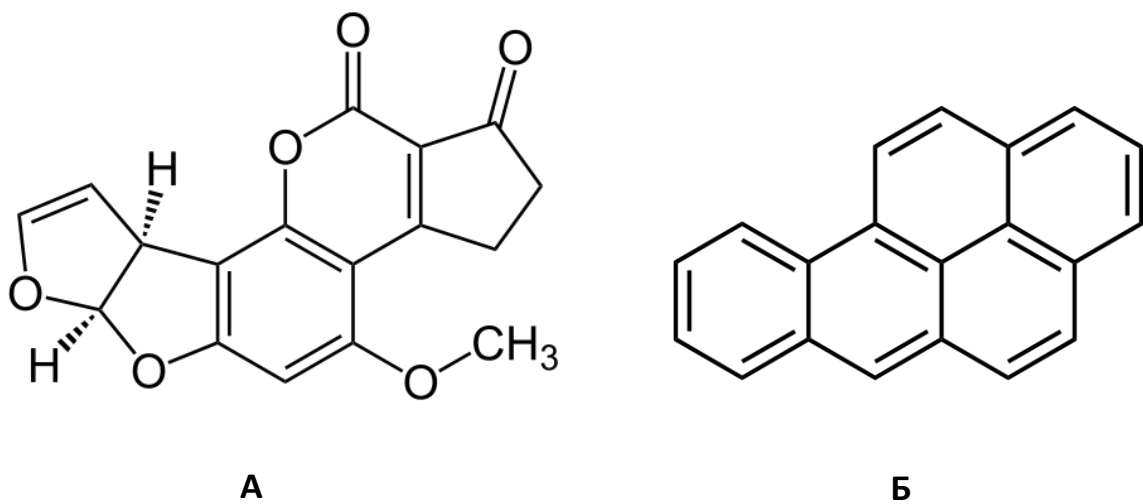


Рис. 101. Структура афлатоксину (А) та бензпірену (Б).

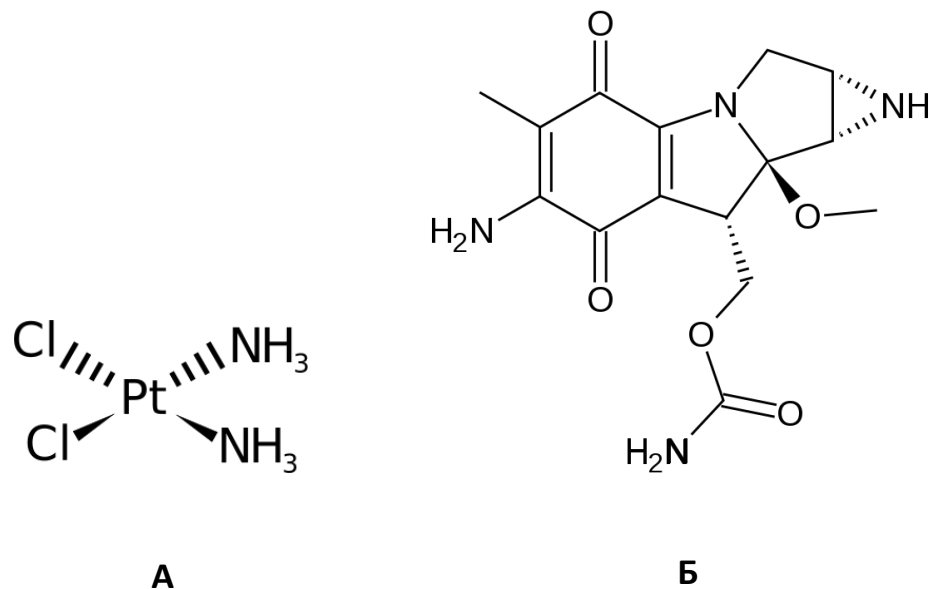


Рис. 102. Структура цисплатину (А) та мітоміцину С (Б).

Елімінація як внутрішньоланцюгових фотопродуктів, так і перехресних «зшивок» здійснюється за допомогою СЕРН, яка у даному відношенні має **дві функціональні «гілки»**:

- 1) Загально-геномна система (ЗГС),
- 2) Транскрипційно-залежна система (ТЗС).

Основною різницею між ними є **механізм впізнавання сайту димеру або «зшивки» (рис. 103)**. У випадку ЗГС таке **розпізнавання** проводиться у будь-якому місці геному спеціалізованими білками **ХРС (Xeroderma Pigmentosum Protein C) та HR23В (рис. 103 та 104)**. **Впізнавання сайту** під час функціонування ТЗС відбувається за рахунок білків **CSA та CSB (Cockayne Syndrome Proteins A and B)**, а також **РНК-полімерази II (КФ 2.7.7.6)** у складі транскрипційного комплексу, тобто, лише в транскрибованих ділянках геному, звідки й пішла назва системи.

Відомо, що **ЗГС є більш повільною формою репарації**, оскільки певний час витрачається на «сканування» послідовностей ДНК за допомогою фактора HR23В. З іншого боку, ця система репарації **діє у будь-яких ділянках геному**, навіть тих, що не піддаються транскрипції, тобто, вона має **ширшу специфічність дії**. **ТЗС є більш швидкою формою**, але вона **обмежена тими регіонами геному, які активно транскрибуються**, тобто, помилки структури ДНК виявляються лише під час процесу копіювання послідовності ДНК у мРНК РНК-полімеразою.

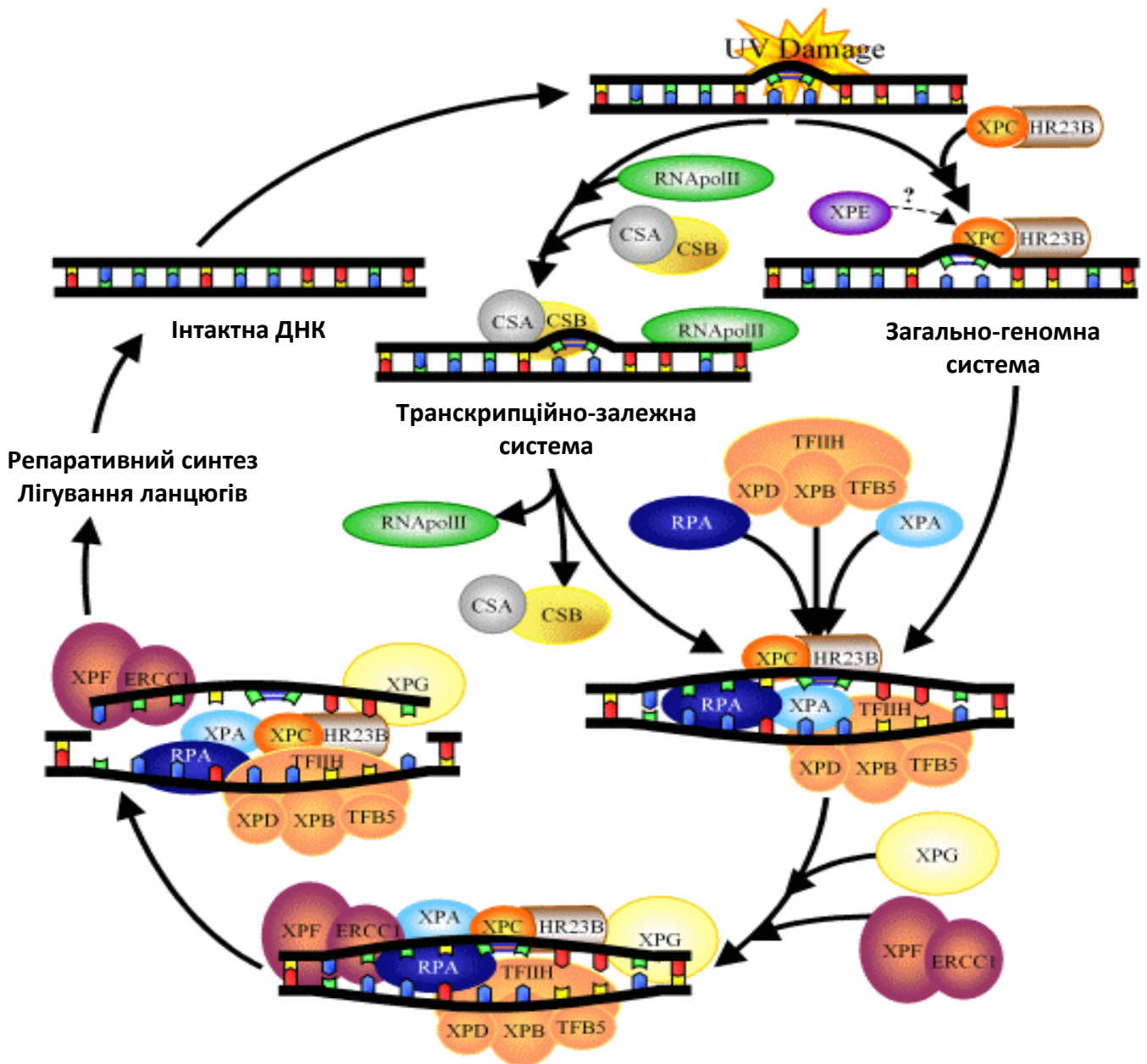


Рис. 103. Схема функціонування обох «гілок» СЕРН для елімінації в/л «зшивок».

Як видно з **рис. 103**, після впізнання сайту з ковалентним димером стадії репарації є спільними для обох «гілок» ЕСРН. Спочатку до зміненого сайту відбувається приєднання складного комплексу, основою якого є **фактор транскрипції ТФІІН**. Даний комплекс включає як мінімум десять компонентів, в тому числі гелікази **XPB/ERCC2** та **XPD/ERCC3 (Xeroderma Pigmentosum Proteins)**, **фактор TFB5** та **циклін Н (рис. 103)**. Далі відбувається активація комплексу. **Циклін Н** у його складі регулює активність кіназ, які у нормі фосфорилують і активують **РНК-полімеразу II** та **ДНК-гелікази XPB та XPD (КФ 3.6.4.12)**.

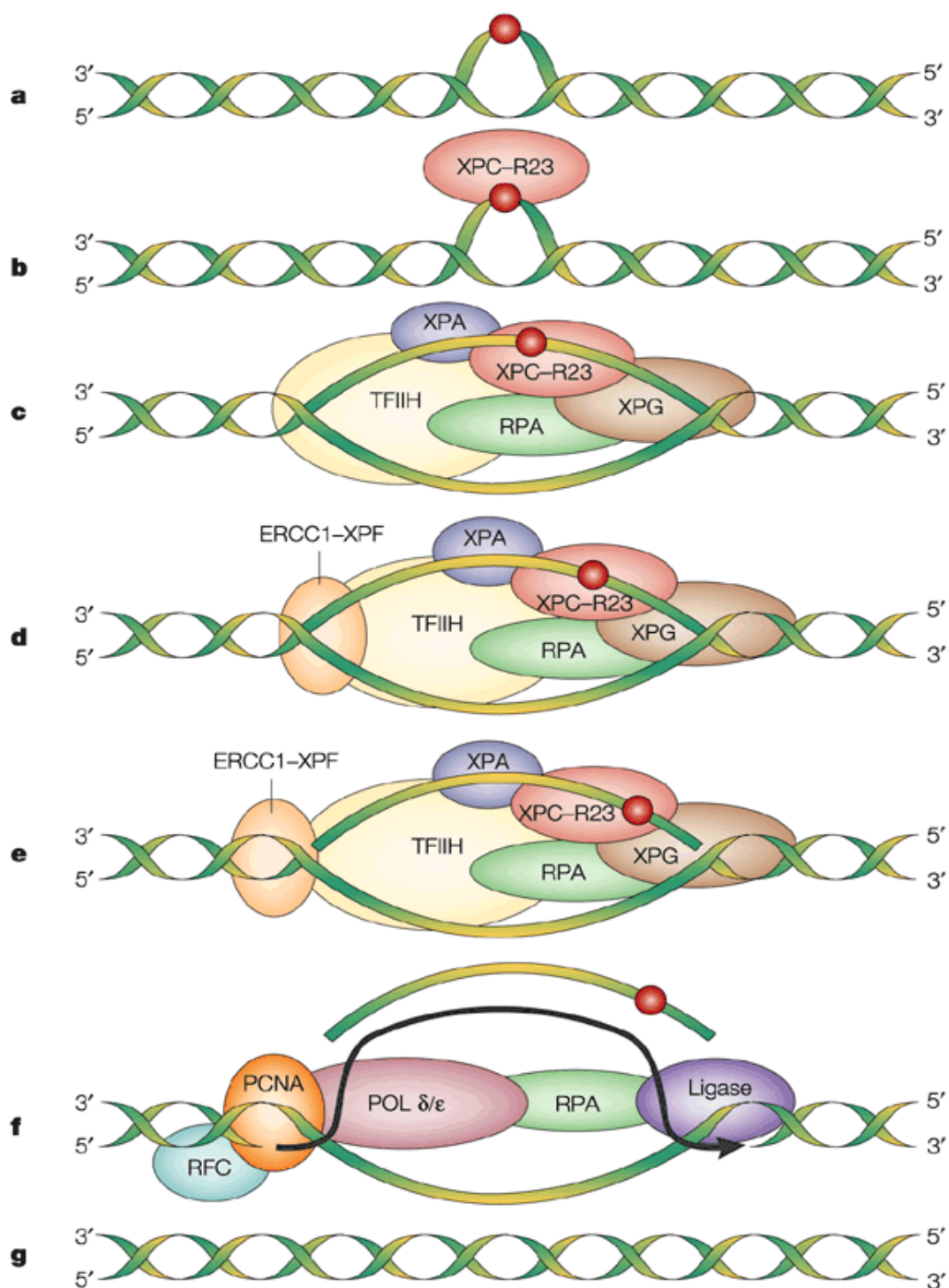


Рис. 104. Схема впізнавання в/л «зшивок» та позбавлення від них за ЗГС (пояснення у тексті). Ligase –лігаза.

Варто відмітити, що у випадку ТЗС білки **CSA/CSB** та РНК-полімераза II від'єднуються від ДНК одразу перед приєднанням комплексу **TFIIH** (рис. 103). Одночасно з активацією комплексу відбувається зв'язування з ним білків **RPA (Replication Protein A)**, які мають спорідненість до одониткових фрагментів ДНК. Також у склад комплексу потрапляє **фактор XPA**, який, разом з **геліказами**, здійснює

контроль розкручування спіралі ДНК у місці приєднання TFIIH, а RPA стабілізують «розплетені» ділянки. Далі ковалентний димер «вирізається» з ланцюга ДНК разом з прилеглою одноланцюговою ділянкою довжиною 18-24 нуклеотиди, причому з 3'-кінця фрагменту розщеплення відбувається **ендонуклеазою XPG/ERCC5** (КФ 3.1.x.x), а з 5'-кінця - **ендонуклеазою XPF/ERCC1**. Отриманий проміжок у послідовності ДНК заповнюється нуклеотидами за допомогою **ДНК-полімераз δ та ε**, причому регуляція активності цих ферментів здійснюється **факторами PCNA та RF-C (Replication Factor C)**, які є компонентами реплісоми. Нарешті, кінці ланцюга зшиваються за допомогою **ДНК-лігази I** (КФ 6.5.1.1).

Цікаво, що, окрім ECPH, димери, фотопродукти та інші масивні утворення, що блокують реплісому, індукують ще один, менш точний **механізм транс-репарації пошкоджень**, за яким працює **система обхідної репарації (COP) або BR (Bypass Repair)**. Механізм її функціонування досліджений недостатньо, але відомо, що ключовими її ферментами є так звані полімерази низької точності. Серед них варто відмітити **ДНК-полімерази η та ι** (КФ 2.7.7.7), які виступають надзвичайно потужними ферментами реплікації, здатними копіювати навіть пошкоджені або змінені ділянки ДНК, включаючи регіони з димерами та масивними аддуктами. Зрозуміло, що цей тип репарації відноситься, скоріше, до **SOS-методів виправлення структури ДНК**, оскільки, **зберігає цілісність геному** коштом значного **підвищення рівня помилок** у ньому.

Поперечні (перехресні) «зшивки» виражаються у появі міжланцюгових (м/л) ковалентних зв'язків між азотистими основами або структурними елементами цукровофосфатного кістяку. Вони також є перешкодою для реплікації та транскрипції і виявляються складнішим «тестом» для репараційних систем, оскільки їх репарація дуже часто проходить навіть з втратами ділянок ДНК. Для елімінації поперечних «зшивок» існує спеціальна **система репарації перехресних зшивок (СРПЗ) або CR (Crosslink Repair)**, механізми функціонування якої вивчені неповністю.

Як і у випадку розглянутої раніше CEPH, **механізм впізнавання «зшивки» залежить від того, чи проведена детекція у процесі реплікації, чи незалежно від нього**. Так, **незалежні від реплікації** і менш точні механізми репарації міжланцюгових зшивок ДНК у клітинах включають в себе або **пряме видалення ковалентно «зшитого» подвійного сегменту ДНК з його втратою**, або ж **«обхідну» реплікацію за допомогою COP (BR)**. Зі зрозумілих причин, такі види репарації є менш «вигідними», тому характерні для **високоспеціалізованих клітин з низькими рівнями реплікації**. На відміну від них, **СРПЗ є високоточним та позбавленим помилок механізмом репарації**, що включає в себе **гомологічну рекомбінацію з сестринською хроматидою** хромосоми на стадії клітинного циклу G2. Відповідно, **впізнавання «зшивок» у цій системі репарації відбувається лише під час реплікації**, з наступною рекомбінацією з використанням гомологічних послідовностей сестринської хроматиди у якості матриці (**рис. 105**).

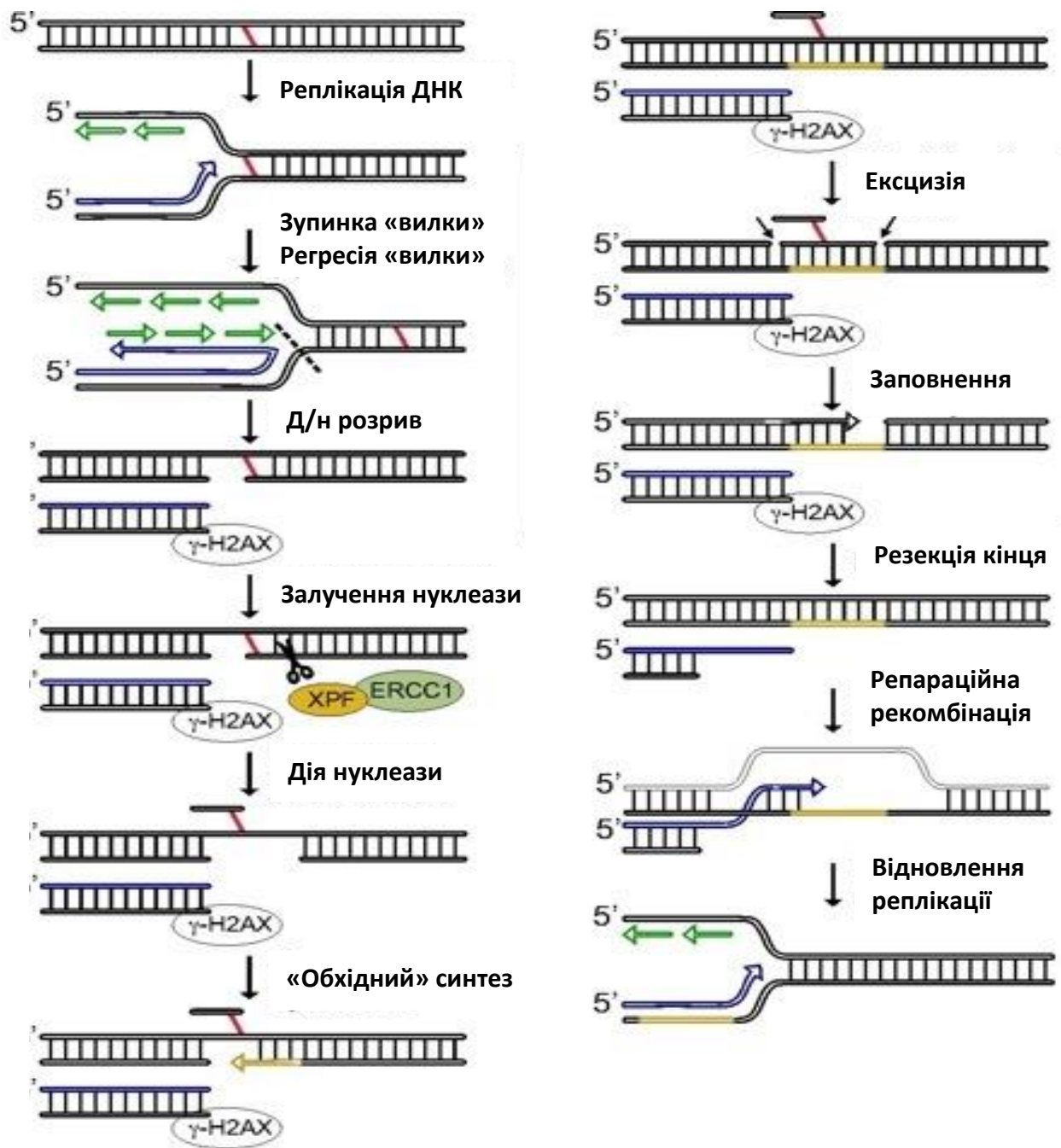


Рис. 105. Схема функціонування системи репарації перехресних «зшивок».

Основний алгоритм роботи СРПЗ (рис. 105) полягає у наступному. У ході реплікації реплікаційна «вилка» зупиняється в місці «зшивки» та піддається частковій регресії з формуванням двониткового розриву. Після цього відбувається розрізання ланцюга поблизу «зшивки» нуклеазою XPF/ERCC1. Утворений таким чином проміжок одного ланцюга заповнюється ДНК-полімеразою з використанням гомологічної послідовності у якості комплементарної матриці. Далі відбувається

рекомбінація гомологічних ділянок між сестринськими хроматидами. Нарешті, другий ланцюг синтезується після ексцизії перехресного фрагменту, що містив «зшивку». **Механізм СРПЗ регулюється** білковими факторами **FANС (Fanconi Protein), ХРВ/ERCC2 та ВRСА1 і 2 (Breast Cancer Proteins)**, і, по суті, включає у себе стадії звичайної ексцизійної репарації (ЕСРН) та репарації двониткових розривів (РДР), про яку мова піде дещо пізніше. Цікавим є той факт, що у місці формування дволанцюгового розриву виявляється **особливий гістон γ -H2АХ**, який, як вважається, є одним з **сигналів пошкодження ДНК**.

8.6. Патології, пов'язані з мутаціями генів факторів ЕСРН

Інактивуючі мутації у генах білкових факторів ЕСРН є доволі серйозною ситуацією, оскільки призводять до низки наступних **рецесивно успадкованих хвороб**:

- **Пігментна ксеродерма (Xeroderma pigmentosum)** – викликається мутаціями генів низки факторів **ХР (ХРА – ХРG) або ERCC** у різних варіантах, тому дані білки і мають аббревіатуру ХР. Причиною також може бути мутація гену **ДНК-полімерази η** , у такому випадку говорять про підвид хвороби **ХР-V**.
- **Синдром Кокайна (Cockayne Syndrome)** – індукується гомозиготними мутаціями у генах білків **CSA та CSB**, звідси і походить аббревіатура CS.
- **Тріхотіодистрофія (Trichothiodystrophy)** – доволі рідкісна хвороба, причиною якої є мутації у специфічних генах **TTDA (Trichothiodystrophy A), ХРВ або ХРD**.
- **Комбінований варіант синдрому Кокайна та пігментної ксеродерми** – в його основі лежать мутації гену фактора **ХРD**.

Вищенаведені хвороби характеризуються різноманітними симптомами та наслідками. Так, пацієнти з синдромом Кокайна та тріхотіодистрофією відрізняються затримкою росту та прогресуючою розумовою відсталістю, мають лускату поверхню шкіри (іхтіоз), ламке волосся та нігті (особливо за тріхотіодистрофії), а також менше живуть і передчасного старіють. Пацієнти з пігментною ксеродермою страждають від підвищеної пігментації та фоточутливості шкіри, а також чутливості очей до ультрафіолету. До того ж, ризик появи раку шкіри – в основному, меланоми лускатої карциноми та карциноми базальних клітин - у таких людей підвищений на декілька порядків порівняно з нормою, що пов'язано з дефектами репараційних систем.

Мутації у будь-якому з семи генів, що кодують **білки FANС (FANС A-FANС G)**, призводять до рецесивно-успадкованої **анемії Фанконі (Fanconi Anemia, звідси й назва)**, проявами якої є малий зріст, порушений морфогенез кінцівок (наприклад, неправильні форми передпліччя та великого пальця руки), дефекти формування

скелету, порушення розвитку шлунково-кишкового тракту, сечо-статевої, серцево-судинної та нервової систем. До того ж пацієнти з анемією Фанконі також характеризуються порушеною пігментацією окремих ділянок шкіри та панцитопенією, тобто зниженням загальної продукції клітин гематопоетичної системи. Власне, це і є причиною анемії у вигляді гострої мієлоїдної лейкемії або мієлодиспластичного синдрому. Такі тяжкі порушення пояснюються тим, що **білки FANC**, окрім репарації перехресних зшивок ДНК, мають інші функції – приймають участь у регуляції синтезу цитокінів, індукції апоптозу, захисті клітин від дії АФК (**FANC C**). До того ж, у нормальних клітинах **білки FANC A, C, E, F та G** кооперативно приймають участь у моноубіквітинуванні **фактору FANCD2**, яке є **біохімічним маркером анемії Фанконі**. Убіквітинований фактор активує певні білки, у тому числі і фактори СРЗ.

Нарешті, мутації у генах **факторів BRCA1 та BRCA2** призводять до **підвищення ризику появи раку молочної залози та яєчників** навіть у гетерозиготних за цим геном людей. Гомозиготні мутації BRCA2 можуть індукувати і прояви **анемії Фанконі**, тому що цей білок, разом з BRCA1, впливає на функціонування комплексу FANC, зокрема BRCA1 регулює зв'язування з ним BRCA2.

8.7. Репарація одностранных та двохланцюгових розривів ланцюгів ДНК

Як відомо, **розриви ланцюгів ДНК**, які являють собою **проміжки у цукрово-фосфатному кістяку ДНК**, можуть бути двох типів:

- 1. Одностранный або SSB (Single Strand Breaks),**
- 2. Двухланцюговий або DSB (Double Strand Breaks).**

Одностранный (о/н) розриви виникають, в основному, через **дію пошкоджуючих факторів середовища (хімічні речовини, іонізуюче випромінювання, АФК, тощо)**, через **помилки рекомбінації** або через **незавершені механізми репарації** за участю факторів будь-якої з розглянутих вище систем, дію певних пошкоджуючих факторів. Підраховано, що в геному однієї клітини утворюється приблизно 100 тис. одноланцюгових розривів на добу, причому більшість з них одразу елімінується за допомогою ДНК-лігаз. У випадку складніших порушень структури, наприклад, дециклізація пентофураноз, або розрив із втратою основи, індукуються вже розглянуті вище функціональні «гілки» короткої та довгої ексцизійної патч-репарації основ (СКПР та СДПР у складі СЕРО).

Двухланцюговий (д/н) розриви є складнішою ситуацією для клітини. Є декілька причин їх виникнення: **дія певних мутагенів фізичної та хімічної природи, незавершені процеси рекомбінації, перетворення з нерепарованих о/н розривів у процесі реплікації**, а також **близьке розміщення двох о/н розривів на обох**

ланцюгах хеліксу ДНК. Серед екзогенних агентів індукції двониткових розривів варто відмітити наступні:

- **Хімічні речовини** (особливо, хеміотерапевтичні) – наприклад, **блеоміцин, цисплатин, інгібітори топоізомераз, тощо**.
- **Віруси** - геном деяких з них кодує ретровірусні інтегрази, що розщеплюють ДНК за типом рестриктаз, що потрібно для інтеграції геному віруса в геном хазяїна. Особливо це характерно для онковірусів.
- **Іонізуюче випромінювання** - генерує обидва типи розривів за рахунок іонізації вздовж треків променів.

Варто відмітити, що **д/н розриви утворюються і за фізіологічних умов у процесі гомологічної рекомбінації**, яка потрібна для рекомбінації ДНК перед мейозом, **утворення функціонального рецептора Т-клітин TCR (T-Cell Receptor)**, а також **реорганізації структури геному низки спеціалізованих клітин**, наприклад, лімфоцитів. Дисрегуляція цих процесів призводить до появи лімфом та інших ракових захворювань імунної системи.

Незалежно від типу утворення, нерепаровані двониткові розриви ДНК є надзвичайно небезпечними, особливо інтенсивно проліферуючих клітин. Одним з **наслідків д/н розривів** може бути **втрата фрагментів ДНК** у процесі мітозу шляхом від'єднання від центромери. До того ж, **вільні кінці такого розриву** можуть вступати у так звану **«незаконну» рекомбінацію** з іншими частинами геному, що може призвести до **змін структурної організації хромосом**, і, у кінцевому рахунку, до загибелі (апоптозу) або переродження клітини.

Репарація двониткових розривів, як правило, повинна включати в себе **блокування та «маркування» його вільних кінців** спеціалізованими білками, **впізнання кінців, елімінацію пошкодження** за декількома механізмами з допомогою певних факторів, **зупинку (арешт) клітинного циклу** за допомогою активації **p53** та **кіназ чекпойнтів СНК (Checkpoint Kinases)** на період реплікації для попередження входу клітини у S-фазу, а також **індукцію апоптозу або іншої форми клітинної загибелі** у випадку незакінченої або невдалої репарації.

На сьогодні відомо **дві основні системи репарації д/н розривів (рис. 106):**

- 1) Система рекомбінаційної репарації (СРР) або HRR (Homologous Reparation Recombination),
- 2) Система негомологічного поєднання кінців СНПК або NHEJ (Non-Homologous End Joining).

Репарація з негомологічним поєднанням кінців характеризується низькою точністю і призводить до неминучої втрати частини генетичного матеріалу. Тому, як і СОР, вона відноситься до **видів SOS-репарації**. Незважаючи на такий факт, цей вид

виправлення пошкоджень дуже широко використовується клітиною, особливо за наявності великої кількості розривів в ДНК.

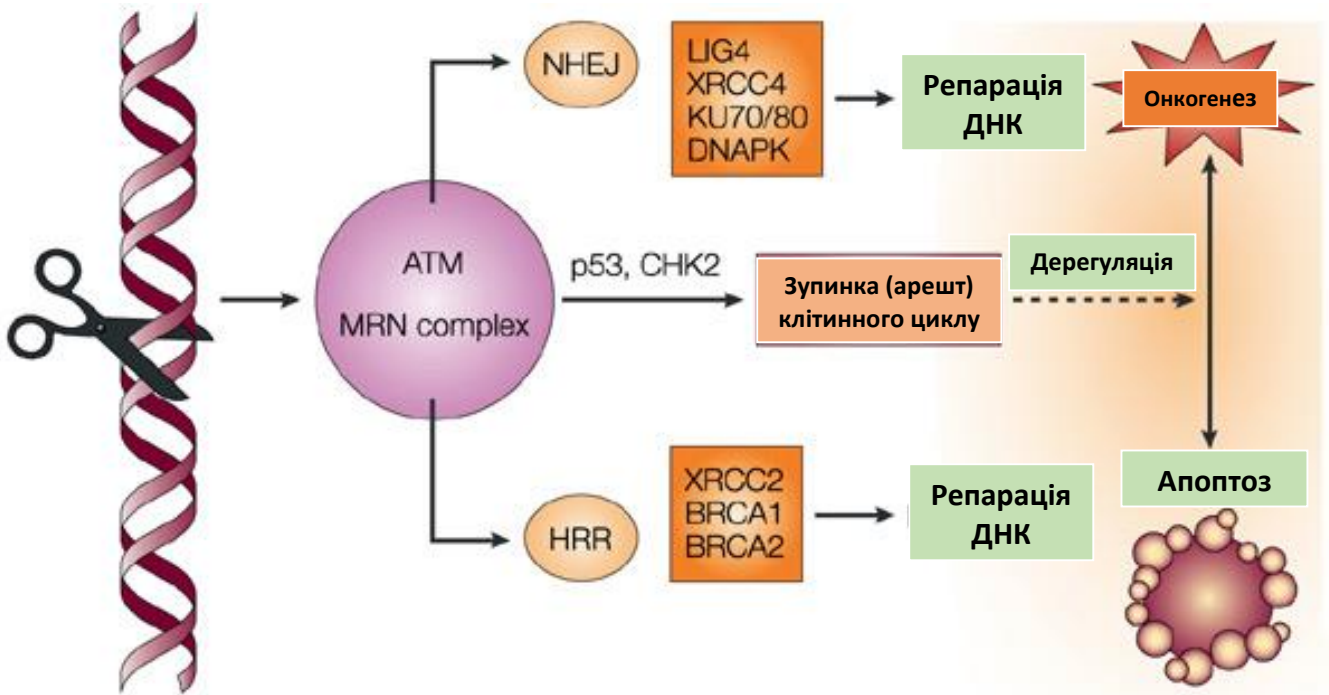


Рис. 106. Схема індукції двох видів систем репарації д/н розривів (пояснення у тексті).

В ході СНПК (рис. 107) вільні кінці подвійного розриву спочатку іммобілізуються гетеродимером білків **KU70/KU80**, які «маркують» їх для розпізнавання. Далі іммобілізовані кінці «впізнаються» **ДНК-залежною протеїнкіназою DNA-РК (DNA-Dependent Protein Kinase)** у поєднанні з власним регуляторним білком **Artemis**. Після цього до сайту залучається комплекс **MRN (MRE11-RAD50-NBS1)**, що, як видно з назви, складається з білків **MRE11 (Meiotic Recombination 11 Homolog A)**, **RAD50** та **нібрину NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1, NBN, Nibrin)**. MRN попереджає «незаконну» рекомбінацію кінців та виключає ймовірність неправильного їх з'єднання. Після приєднання комплексу може одразу відбутися «зшивання» кінців за допомогою лігази **IV/XRCC4** (КФ 6.5.1.1), але у більшості випадків ініціюється їх процесинг. Він, як правило включає в себе як **приєднання нуклеотидів до 5'-кінців, так і відщеплення їх з 3'-кінців розриву**. Процесинг здійснюється завдяки нуклеазній активності фактора **MRE11**, а також вже згаданій ендонуклеазі **FEN1**, причому геліказну функцію під час процесингу виконують гетеродимери **KU70/KU80**, а також

фактор **WRN (Werner Syndrome Protein)**. Розкручування спіралі та процесинг відбувається до тих пір, поки не буде підібрано **короткі комплементарні послідовності** обох ланцюгів **для гібридизації кінців розриву**. Якщо такі послідовності знайдено, залишкові нуклеотиди ланцюгів вилучаються, а проміжки заповнюються відповідними **ДНК-полімеразами**. Після цього ланцюг «зшивається» специфічною **лігазою IV/XRCC4**. Таким чином, кінцевим результатом функціонування СНПК є відновлений хелікс ДНК, який, однак, **обов'язково містить зведену до можливого мінімуму делецію** генетичного матеріалу.

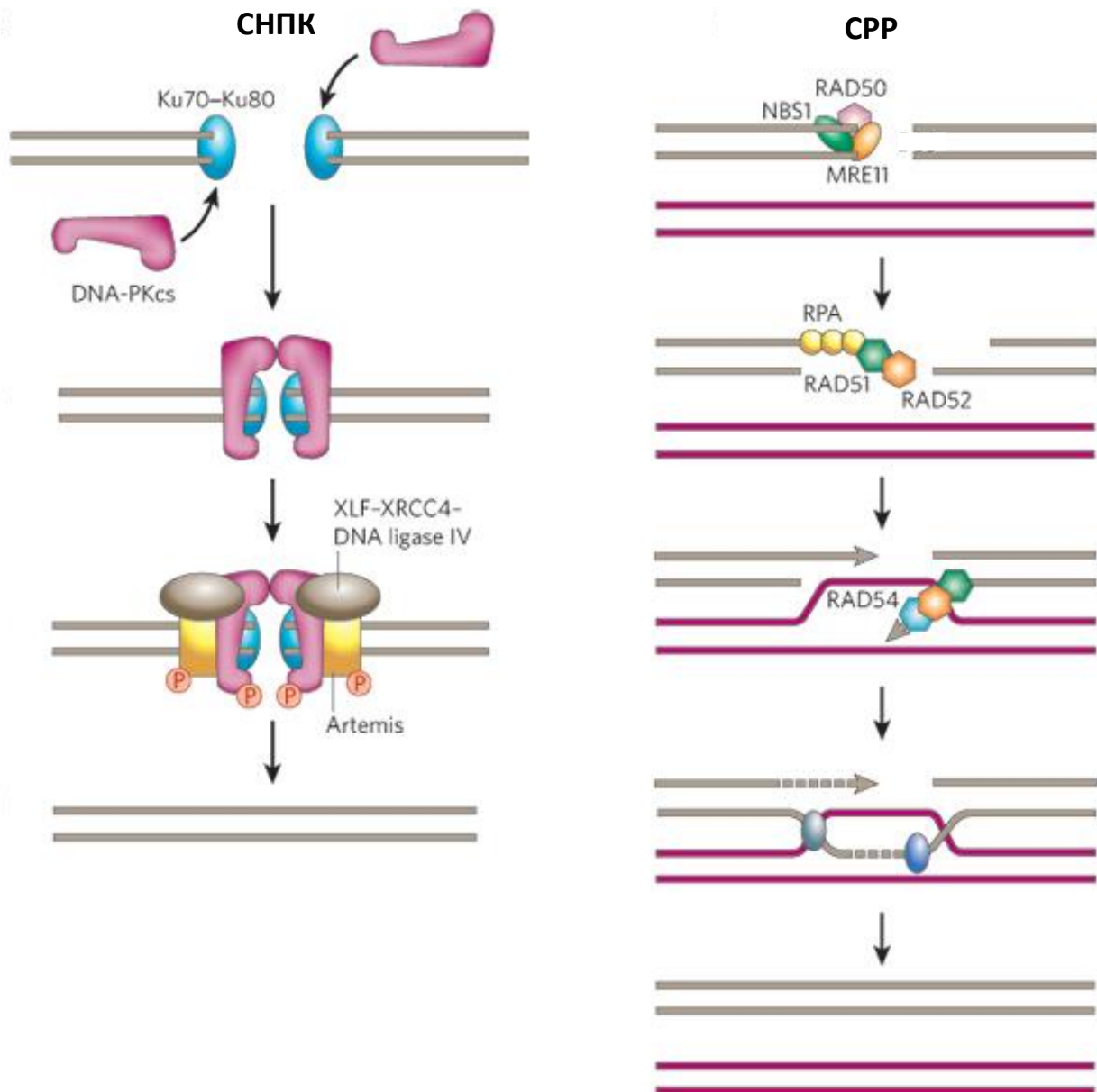


Рис. 107. Схема функціонування двох видів репарації д/н розривів (пояснення у тексті).

Іноді специфічною характеристикою ділянок, відрепарованих за допомогою СНПК, є так звані **мікрогомології**, що являють собою **послідовності довжиною від 3 до 12 пар основ**. Такі мікрогомології є ідентичними до ділянок, локалізованих на обох кінцях делеції ще на початку процесу. У таких випадках результатом роботи СНПК є не делеція, а інсерція декількох додаткових нуклеотидів, як, наприклад, у процесі **V(D)J-рекомбінації ДНК у лімфоцитах (рис. 108)**. Характерною особливістю V(D)J-рекомбінації є відносна залежність від факторів Ku та використання специфічних для генів імуноглобулінів **ДНК-полімераз λ та μ (КФ 2.7.7.7, рис. 108)**.

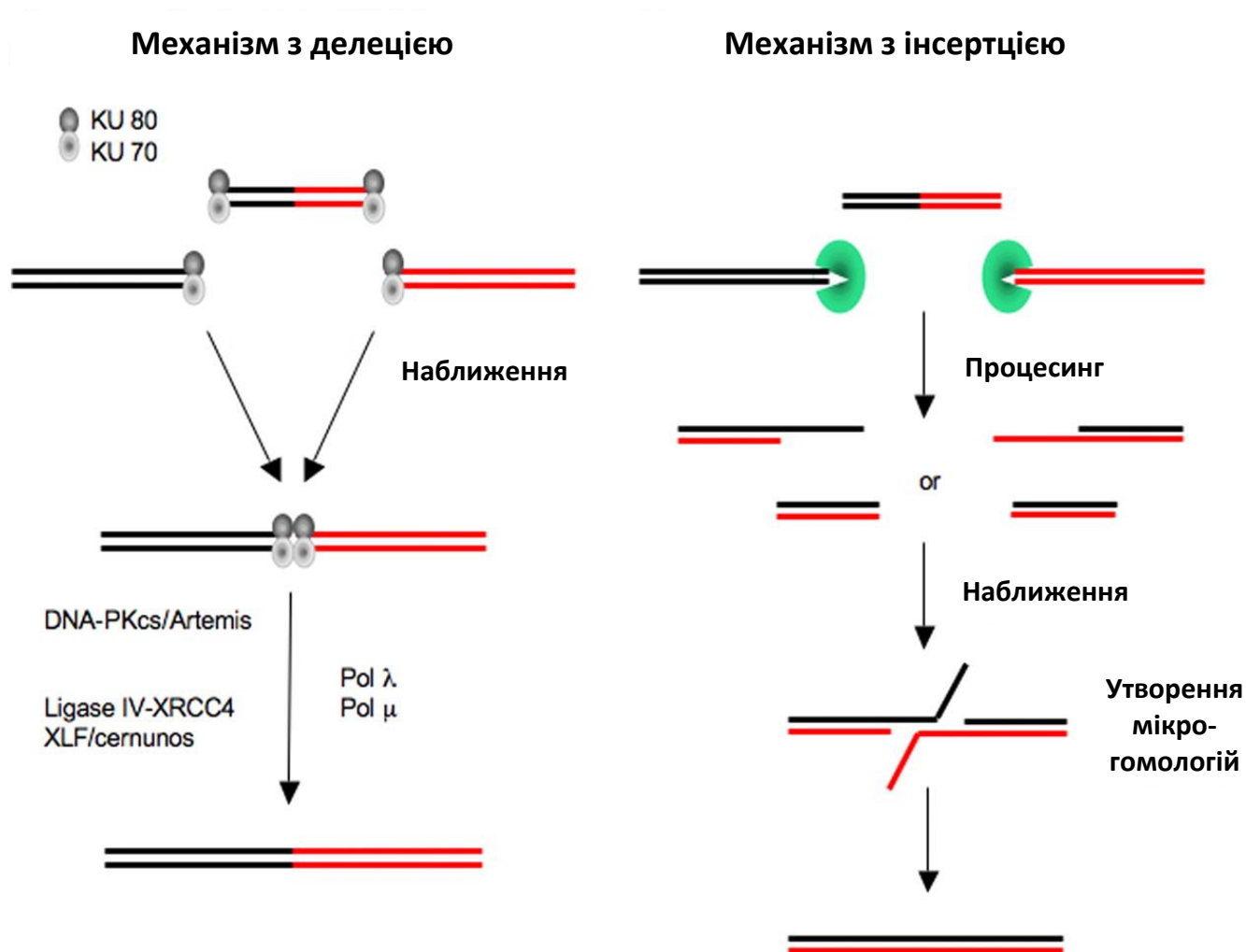


Рис. 108. Альтернативні шляхи функціонування СНПК у лімфоцитах (пояснення у тексті).

Відомо, що під час індукції СНПК активується **низка факторів арешту клітинного циклу**, таких як **супресор пухлин p53**, **протеїнкінази CDK (Cyclin Dependent Kinases)** та **CHK (Checkpoint Kinases)**, білок **p21CIP1 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDK-Interacting Protein 1)**, тощо (рис. 106). Така активація відбувається, в основному, за

рахунок **DNA-ПК**, регуляторними субодиницями якої є білки **KU70/KU80**. Після приєднання до білків **KU** у сайті пошкодження ДНК, каталітична субодиниця **DNA-ПК** піддається автофосфорилуванню, а також фосфорилує **p53** та інші білки репарації. **p53**, у свою чергу, активує білки чекпойнтів **p21**, **CHK**, тощо. Крім **DNA-ПК**, фосфорилування p53 здійснюється проеїнкіазами **ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)** чи **ATR (Ataxia Telangiectasia Rad3-Related, рис. 106 та 109)**, які активуються у відповідь на появу розривів ДНК. Відомо також, що через **p53** реалізується **індукція апоптозу**, у випадку, якщо репарація є невдалою або неможливою. Нарешті, встановлено, що **головним регулятором функціонування комплексу MRN** є **нібрин**, який в цілому модулює активність всіх факторів СНПК. Цей білок також активується фосфорилуванням з боку **ATM (рис. 109)**, і взаємодіє з білками **BRCA**.

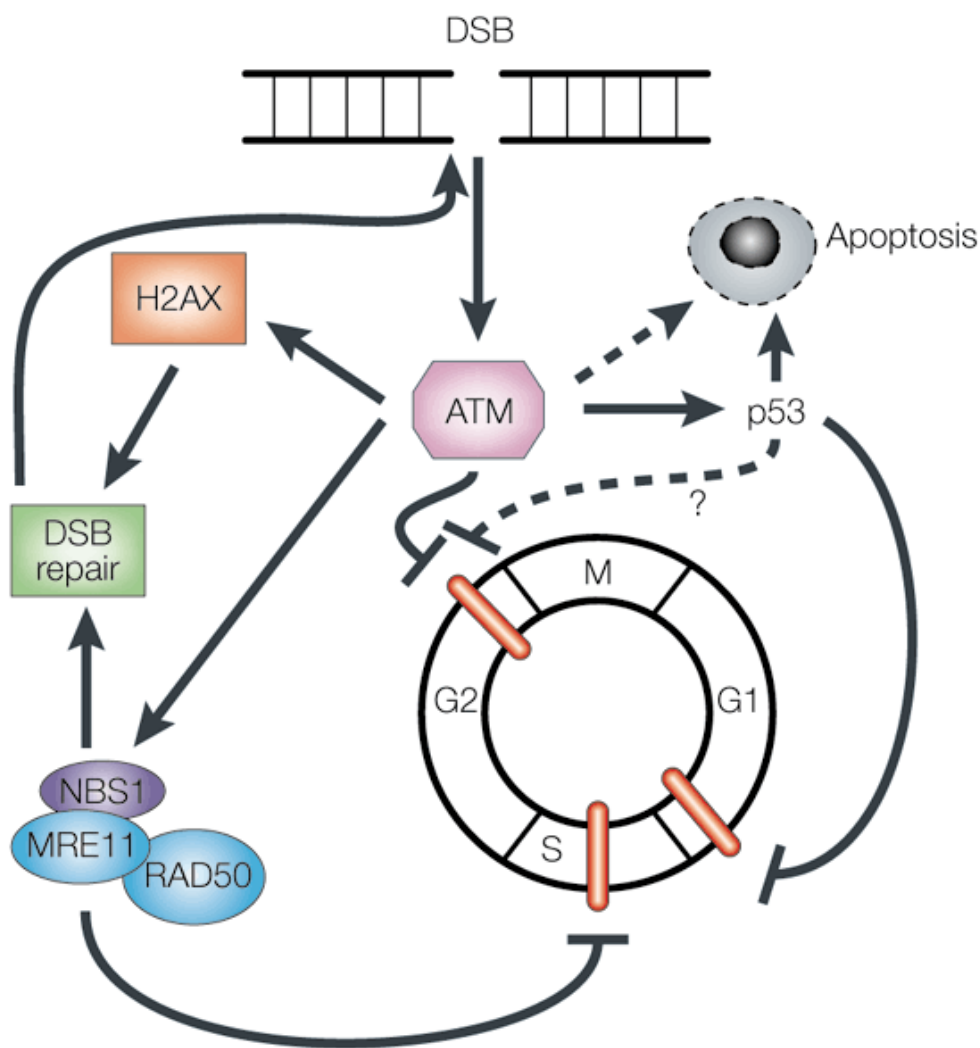


Рис. 109. Роль ATM у функціонуванні СНПК та арешті клітинного циклу (пояснення у тексті).

На відміну від СНПК, **система рекомбінаційної репарації** відрізняється **високою точністю відтворення ланцюгів і практично безпомилковою роботою**, що пов'язано з використанням у якості матриці гомологічних ланцюгів сестринської хроматиди. У ссавців ця система запускається лише **на стадії клітинного циклу G2**, оскільки саме тоді стає доступною сестринська хроматида з гомологічним набором нуклеотидів. В той же час **СНПК індукується**, в основному, **на стадії G1**.

СРР є основною системою **репарації двониткових розривів**, які з'являються внаслідок **подовження одониткових за рахунок зупинки реплісоми** під час реплікації. Відомо також, що у функціонуванні СРР (рис. 107) значну роль відіграє **геліказа BLM (Bloom Syndrome Protein)**. З її допомогою відбувається розпізнавання та імобілізація кінців д/н розриву. Альтернативно цю функцію виконує також фактор **RAD52**. Далі кінці піддаються процесингу, який здійснює вже згаданий **комплекс MRN (MRE11/RAD50/NBS1)** за участю білків **RAD52 та RPA**. Результатом такого процесингу якого є подовження 3'-кінців на декілька сотень нуклеотидів. Потім за допомогою білку **RAD51** отримані одониткові 3'-термінальні ділянки зближуються та проникають у гомологічну двониткову ДНК сестринської хроматиди, формуючи **D-петлеподібні структури (Displacement Structure)**. Після цього гідроксильні групи на 3'-кінці одониткових ділянок за участю фактора **Rad54** формують структуру з **двох сполучень Холідея (Holliday Junctions)**, які пізніше розщеплюються ендонуклеазами. В кінцевому рахунку можливими є **два результати функціонування СРР** в залежності від способу позбавлення від структур Холідея:

- 1) Обидві оригінальні послідовності повністю відновлюються,
- 2) Відбувається кросовер гомологічних послідовностей.

У другому випадку, якщо використовується саме сестринська хроматида, послідовність не змінюється, але якщо у механізмі приймає участь гомологічна послідовність іншої хромосоми, може відбутися **кросовер генів**.

Поява двониткових розривів, як правило, активує **АТМ**, яка, у свою чергу, залучає інші фактори репарації. В першу чергу, вона фосфорилує **NBS1** у складі **MRN**. Серед інших важливих мішеней **АТМ** варто відмітити білки репарації **FANCD2, BRCA1, RPA**, а також **гістон H2AX**, що акумулюється у місці д/н розриву (рис. 109). Варто відмітити, що **H2AX** може фосфорилуватися ф за допомогою **DNA-РК**, що, можливо, сприяє його ролі у якості «маркерної» молекули пошкоджень ДНК. Нарешті, субстратами **АТМ**, а, отже, до певної міри також сенсорними білками, є **RAD9 та RAD17**.

Як уже відмічалось, **АТМ** за рахунок фосфорилування **p53** та певних **протеїніназ CHK2 та CDK** активує систему чекпойнтів клітинного циклу, які ініціюють його арешт, блокуючи реплікацію пошкодженої ДНК. Фосфорилування **p53** з боку АТМ попереджає взаємодію супресора пухлин з його інгібіторним білком **Mdm2/Hdm2 (Murine Double Minute/Human Double Minute Protein 2)**. Таким чином, ці події ведуть до зупинок клітинного циклу у фазі G1/S за рахунок активації

інгібіторного фактора **p21CIP1**, або у фазі G2/M за допомогою інших посередників. В цілому, **реплікація ДНК інгібується** фосфорилуванням **CHK2** та **нібрину**, а **зупинка клітинного циклу на стадії G2/M** індукується фосфорилуванням **p53** та **BRCA1** (рис. 109). Пошкодження ж ДНК під впливом ультрафіолету призводить до активації протеїнкінази **ATR**, яка є спорідненою до **ATM**, і також фосфорилує **p53**, хоча серед кіназ чекопойнтів її мішенню є вже **CHK1**, а не **CHK2**. Нарешті, варто пам'ятати, що функції **ATM** та **ATR** лише частково подібні, хоча, в принципі, обидві ці кінази приймають участь у механізмах індукції майже всіх видів репарації ДНК (рис. 110).

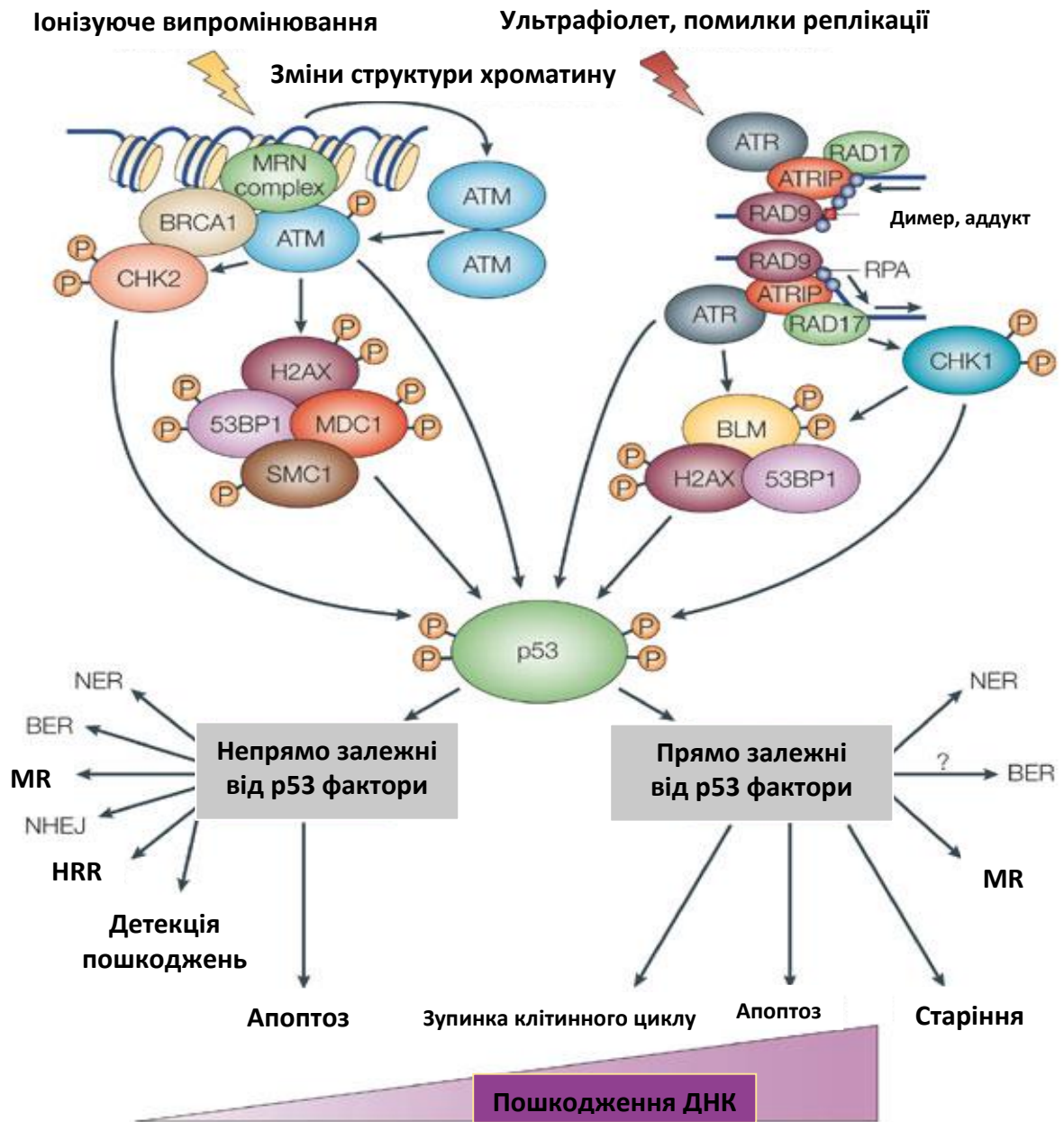


Рис. 110. Роль ATM, ATR та p53 у індукції різних видів репарації ДНК.

8.8. Патології, пов'язані з мутаціями генів факторів CPP

Система CPP менше вивчена, ніж СНПК. Але відомо, що мутації в генах її факторів є причинами спадкових хвороб людини. Наприклад, гомозиготні мутації гену **NBS1** призводять до порушення функціонування нібрину та розвитку **синдрому ламкості Ніджмегена (Nijmegen Breakage Syndrome)**. Пацієнти з цим рідкісним синдромом характеризуються розумовою відсталістю, імунодефіцитом, явною хромосомною нестабільністю та підвищеною чутливістю до онкогенних факторів.

Гомозиготні мутації гену гелікази/нуклеази **WRN**, яка також приймає участь у регуляції функціонування теломер, призводять до розвитку **синдрому Вернера (Werner Syndrome)**, симптоми якого проявляються ще до досягнення статевої зрілості.

Найбільш відомим синдромом у відношенні рецесивно-успадкованих **мутацій генів репарації розривів є атаксична телангіектазія АТ (Ataxia Telangiectasia)**. Вона спричинюється гомозиготними мутаціями у гені протеїнкінази **АТМ**. Пацієнти з телангіектазією є особливо чутливими до інфекцій та аберацій структури хромосом. Ризик утворення онкопатологій у таких людей є на декілька порядків вищим - в основному, це стосується лейкемій та лімфом. Як і у випадку синдрому Ніджмегена, спостерігається підвищена чутливість до іонізуючого опромінення. Відомо також, що хворі на телангіектазію не відрізняються поступовою регресією функцій мозочка, яка призводить до порушення координації рухів - **атаксії**, розладу мови та погіршення зору. **Телангіектазіями** називають агрегати у вигляді включень, які складаються з розширень малих кровоносних судин. Причиною появи цих агрегатів є дисрегуляція ангиогенезу. Подібні агрегати виявляються у різних місцях, найчастіше - у кон'юнктиві ока. Вважають, що атаксичної телангіектазії є недостатність або відсутність ферментативної активності **АТМ**, а, отже, і активації **p53**. Такі ефекти реалізуються, зокрема, інгібуванням ангиогенезу за умов гіпоксії. **До того ж**, за умов **дисфункції АТМ** накопичується велика кількість ембріонального альбуміну - **α-фетопротеїну**, який є біохімічним **маркером атаксичної телангіектазії**.

РОЗДІЛ 9. Обмін нуклеотидів

Даний розділ починається з огляду сучасних даних щодо біосинтезу основних попередників пуринових та піримідинових нуклеотидів, а саме – ІМФ та УМФ відповідно. Далі увага приділяється перетворенню цих попередників на складові пулу нуклеотидів, які використовуються клітиною для біосинтетичних процесів нуклеїнових кислот, а також для інших цілей – синтезу маркоергів, коферментів, тощо. Розглядаються також процеси реутилізації нуклеотидів (salvage) екзогенного походження (зі складу їжі), так само, як і отриманих з ендогенних джерел. Нарешті, розглядаються шляхи катаболізму нуклеотидів та їх похідних.

9.1. Синтез інозинмонофосфату *de novo*

Ідентифікація ферментів, відповідальних за перетворення інтермедіатів шляху синтезу двох пуринових нуклеотидів – **аденозин-5'-монофосфату (АМФ)** та **гуанозин-5'-монофосфату (ГМФ)** почалося з вивчення метаболізму азоту птахів. Як відомо, у цього класу тварин, так само, як і у рептилій, кінцевим продуктом азотного метаболізму є сечова кислота (**рис. 111, А**).

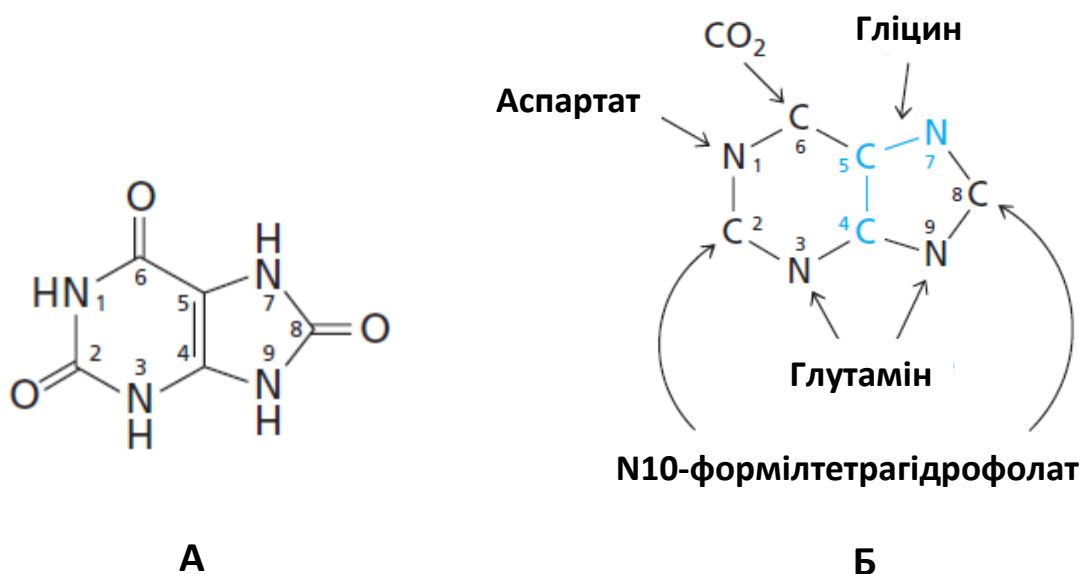


Рис. 111. Структура сечової кислоти (**А**) та схема джерел атомів пуринів (**Б**).

У 50-их роках минулого сторіччя було виявлено, що біосинтез як сечової кислоти, так і пуринів нуклеїнових кислот відбувається із залученням одного і того ж шляху через однакові проміжні сполуки. На той час основним і зручним модельним об'єктом вивчення біосинтезу пуринів була печінка голуба. У експериментах

використовувалися мічені різними ізотопами сполуки, як то $^{13}\text{CO}_2$, H^{13}COO - (**форміат**) та $^+\text{H}_3\text{N-CH}_2\text{-}^{13}\text{COO}$ - (**гліцин**). Коли ці речовини споживалися лабораторними тваринами у складі їжі, дослідники отримували мічену за певними атомами **сечову кислоту**. Вона виділялася і хімічно розщеплювалася у контрольованих умовах для ідентифікації позицій мічених атомів вуглецю та азоту. Було виявлено, що вуглець з CO_2 інкорпорувався у положення C6, а з **форміату** – у C2 та C8 **уреату**. У кінцевому рахунку було виявлено, що позиція N1 забезпечувалась **аміногрупою аспартату**, C2 та C8 – **N10-формільною частиною похідного тетрагідрофолієвої кислоти**, N3 та N9 – **амідними групами глутаміну**, C4, C5 та N7 – **повною молекулою гліцину**, і, нарешті, положення C6 мало своїм попередником **вуглекислий газ** (рис. 111, Б).

Було також встановлено, що пуринове кільце не синтезується з цих попередників у вигляді вільної структури, а лише у поєднанні з **рибозо-5'-фосфатом**. Причому джерелом рибозо-5'-фосфату є спеціальна макроергічна сполука – **5'-фосфорибозил-1'-пірофосфат**, відомий також як **5'-фосфорибозил-1'-дифосфат (ФРПФ)**. ФРПФ синтезується у спеціальній реакції з **рибозо-5'-фосфату**, отриманого, в основному, за рахунок функціонування пентозофосфатного циклу, та **АТФ** (рис. 112). Дану реакцію каталізує фермент **рибозофосфатдифосфокіназа** (КФ 2.7.6.1).

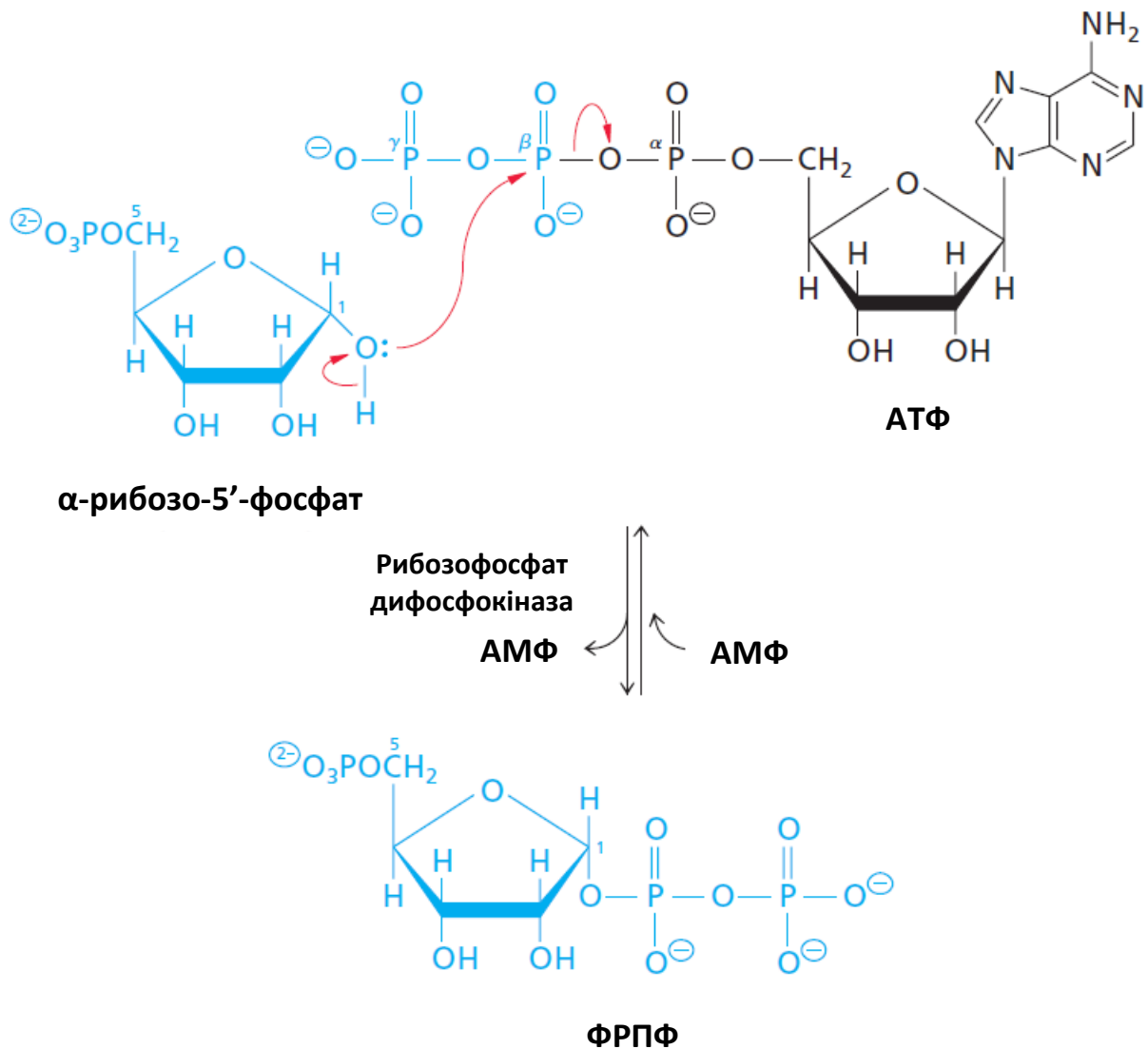


Рис. 112. Утворення 5'-фосфорибозил-1'-пірофосфату (ФРПФ).

Після синтезу **ФРПФ** є основною молекулою, на якій «будується» кістяк майбутнього пурину. Варто відмітити, що ця сполука приймає участь і у біосинтезі піримідинів, але у цьому випадку вона реагує вже з попередньо синтезованим піримідиновим кільцем. Іншими реакціями, в яких також **приймає участь ФРПФ**, є шляхи реутилізації нуклеотидів (*salvage pathways*) та біосинтез гістидину.

Виявлено, що кінцевим продуктом основного біосинтезу пуринів *de novo* є **інозин-5'-монофосфат або інозинат (ІМФ, рис. 113)**. Інозинат у якості основи містить **гіпоксантин або 6-оксипурин**. Механізм біосинтезу пуринів, організований з десяти реакцій, який являє собою один з найскладніших біосинтетичних шляхів, був відкритий в середині 50-их рр минулого сторіччя двома дослідницькими групами під керівництвом Джона Бученена та Роберта Грінберга. Причому на повне з'ясування реакцій шляху і ідентифікацію інтермедіатів було витрачено більше 10 років.

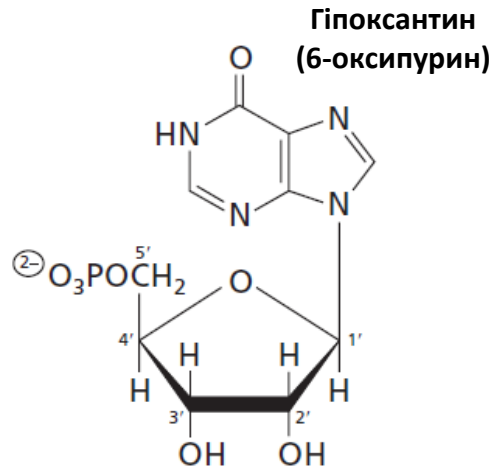


Рис. 113. Структура інозин-5'-монофосфату (ІМФ) або інозинату.

Першою реакцією біосинтезу пуринів є заміна пірофосфатної групи у складі ФРПФ на амідний азот **глутаміну (рис. 114)** у реакції, каталізованій **глутамін-ФРПФ-амідотрансферазою (КФ. 2.4.2.14)** з формуванням **5'-фосфорибозиламіну (ФРА)**.

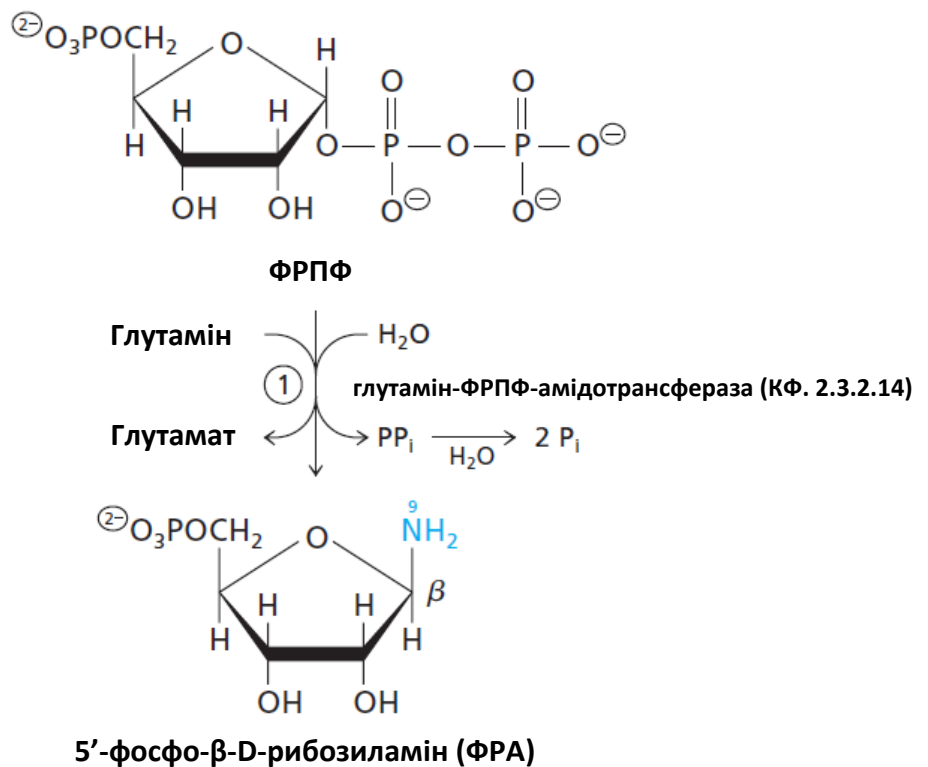


Рис. 114. Реакція перетворення ФРПФ на фосфорибозиламін (ФРА).

Цікавим є те, що **конфігурація аномерного атома вуглецю** у даній реакції нуклеофільного заміщення змінюється з **α-форми на β**, яка властива природним нуклеотидам. У наступній реакції до аміногрупи **ФРА** додається **гліцин**, приєднуючись з боку свого ацильного залишку (рис. 115, А). Дана реакція нагадує каталізовану **глутамінсинтетазою** з утворенням проміжного **глутамілфосфату**.

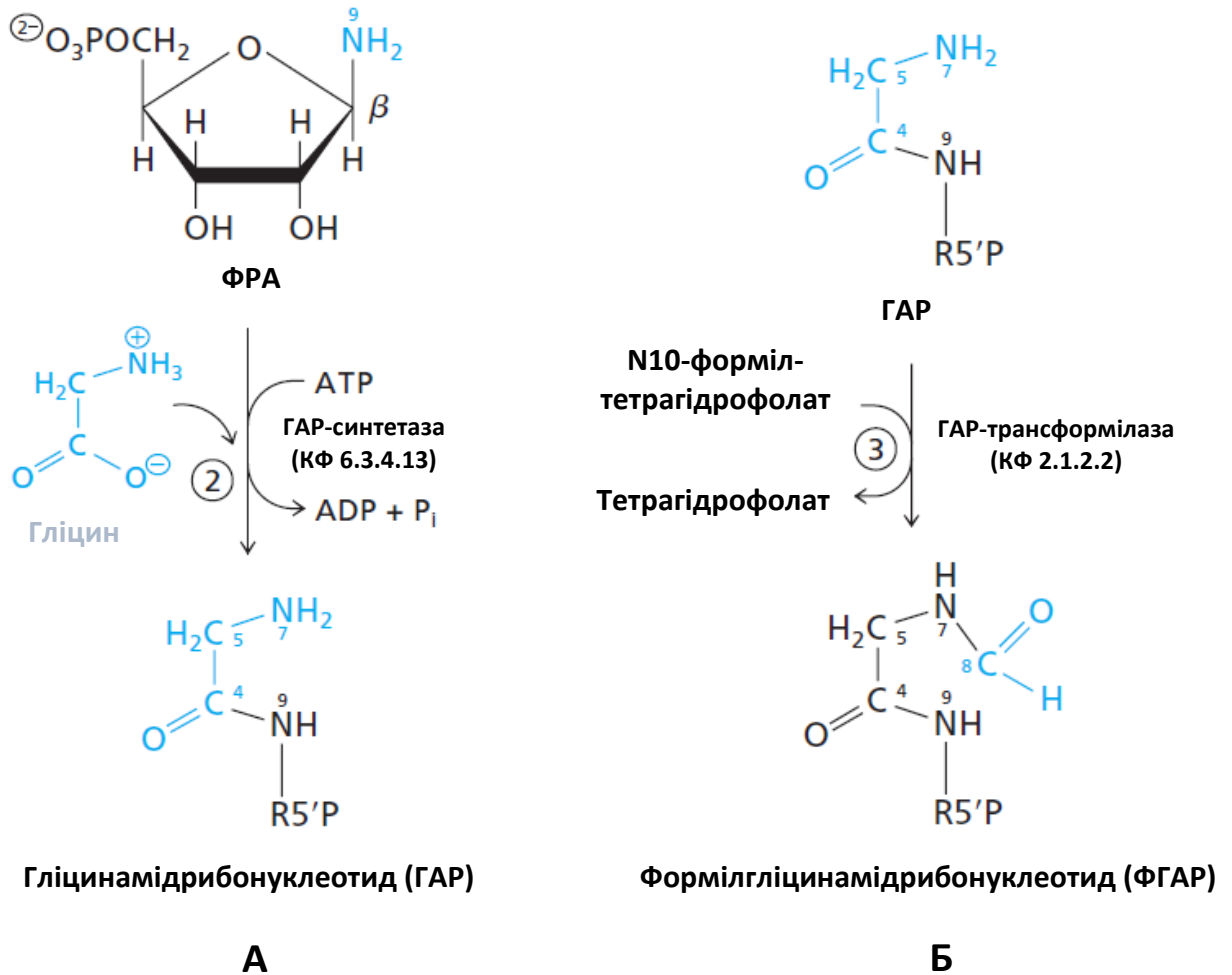


Рис. 115. Утворення гліцинамідрибонуклеотиду, ГАР (А), та форміл-ГАР (Б).

Третьою стадією біосинтезу пуринів є пересення формільної групи з **N¹⁰-тетрагідрофолату** на аміногрупу **ГАР** з утворенням **N-формілгліцинамідрибонуклеотиду (ФГАР, рис. 115, Б)**. Далі сформований амід перетворюється на **амідинову групу** в **АТФ-залежній** реакції з **глутаміном** у якості донора азоту (рис. 116, А). П'ята стадія, яка також потребує **АТФ**, полягає у **замиканні першого – імідазольного – кільця пурину** (рис. 116, Б). Далі відбувається залучення **СО₂**, який дає початок **С₆** пуринового кільця (рис. 116, В). Хоча, по суті, дана реакція є **активним карбоксилуванням**, вона **не потребує біотину**. Спочатку бікарбонат енергозалежно приєднується до аміногрупи в положенні **N-3 майбутнього пурину**, а потім, в результаті перебудови молекули, переноситься у **положення С₅**.

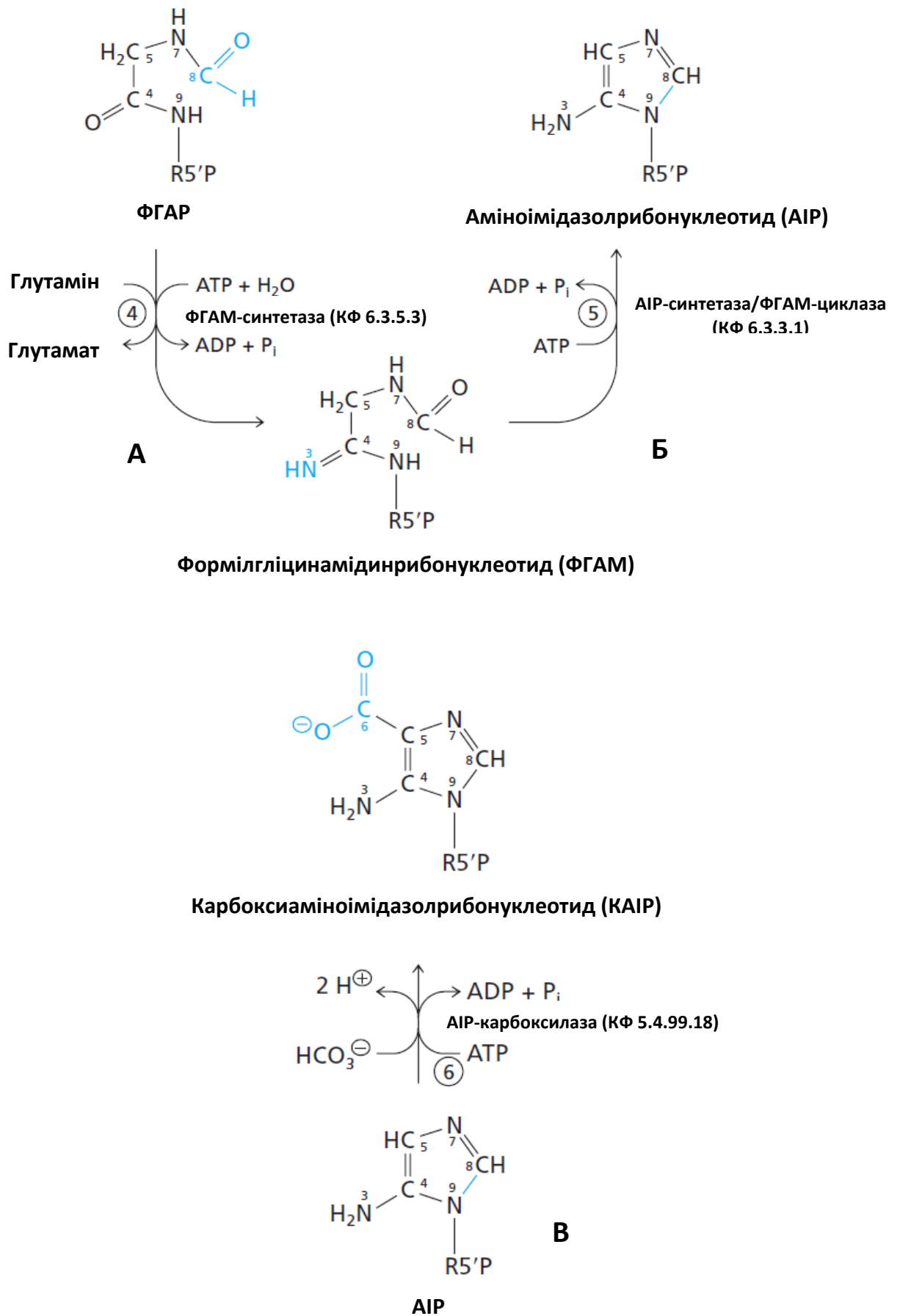


Рис. 116. Утворення формілгліцинамідинрибонуклеотиду ФГАМ (А), аміноімідазолрибонуклеотиду (AIP) (Б) та карбокси-AIP (KAIP) (В).

Варто відмітити, що даний механізм реакції (рис. 117) каталізується двома різними ферментами у *Escherichia coli*, а у ссавців – лише одним мультифункціональним ензимом. Гомолог АІР-карбоксилази хребетних (КФ 5.4.99.18) переносить карбоксилат прямо на положення С5 майбутнього ІМФ, формуючи карбоксаміноімідазолрибонуклеотид (КАІР). Причому, фермент ссавців є набагато швидшим і ефективнішим за рахунок лише однієї реакції.

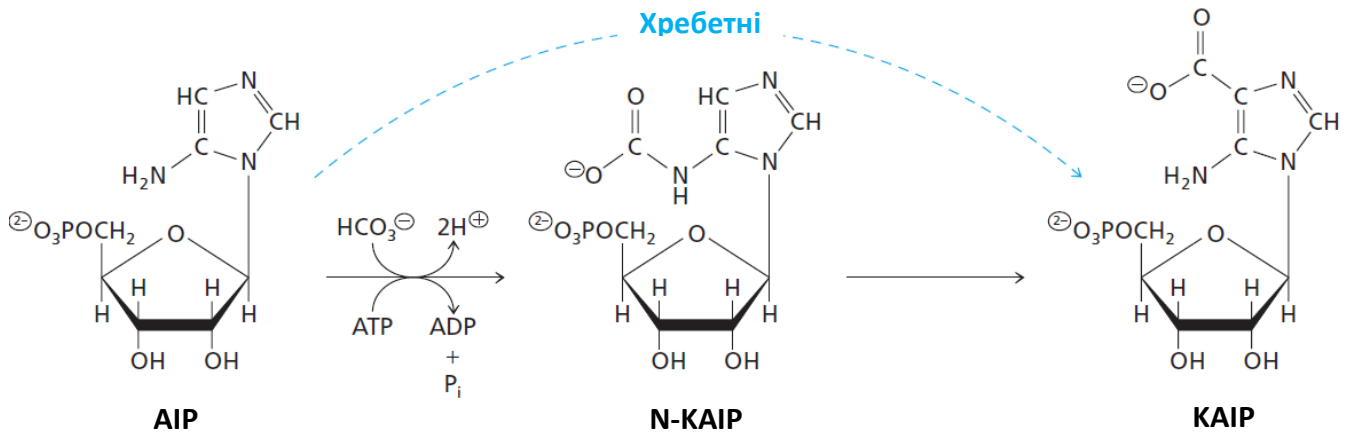


Рис. 117. Схема двох альтернативних механізмів карбоксилування АІР.

Наступною реакцією є інкорпорація аміногрупи аспартату в пуринове кільце, яка проходить у дві стадії. Спершу аспартат через свою аміногрупу зв'язується з з доданою в результаті попередньої реакції карбосильною групою КАІР, формуючи сукцинілокарбоксамід (рис. 118, А). Далі фермент аденіло сукцинатліаза (КФ 4.3.2.2) каталізує негідролітичне розщеплення цієї сполуки з вивільненням фумарату (рис. 118, Б). Такий двохстадійний процес є подібним до другої та третьої реакцій циклу сечовини, хоча у даному випадку АТФ розщеплюється до АДФ та неорганічного фосфату, а не до АМФ і пірофосфорної кислоти. У дев'ятій реакції, яка нагадує третю цього ж шляху (рис. 115, Б), косубстрат у вигляді N10-формілтетрагідрофолієвої кислоти знову виступає у якості донора формільної групи, яка приєднується до нуклеофільної аміногрупи аміноімідазолкарбоксамідрибонуклеотиду (рис. 118, В). Нарешті, амідний азот фінального інтермедіату кондесується з формільним залишком, що призводить до замикання другого кільця пуринової системи і утворення повної молекули ІМФ (рис. 118, Г).

Підраховано, що синтез ІМФ є достатньо витратним у енергетичному плані. Так, перетворення АТФ на АМФ відбувається під час синтезу ФРПФ, а формування АДФ з АТФ – на стадіях 2, 4, 5, 6 та 7. Сюди також можна додати дві одиниці АТФ, які витрачаються на синтез двох залишків глютаміну з глютамату та аміаку у глютамінсинтезній реакції. Таким чином, одна молекула ІМФ, утворена з рибозофосфату, в цілому «коштує» клітині 11 макроергічних зв'язків.

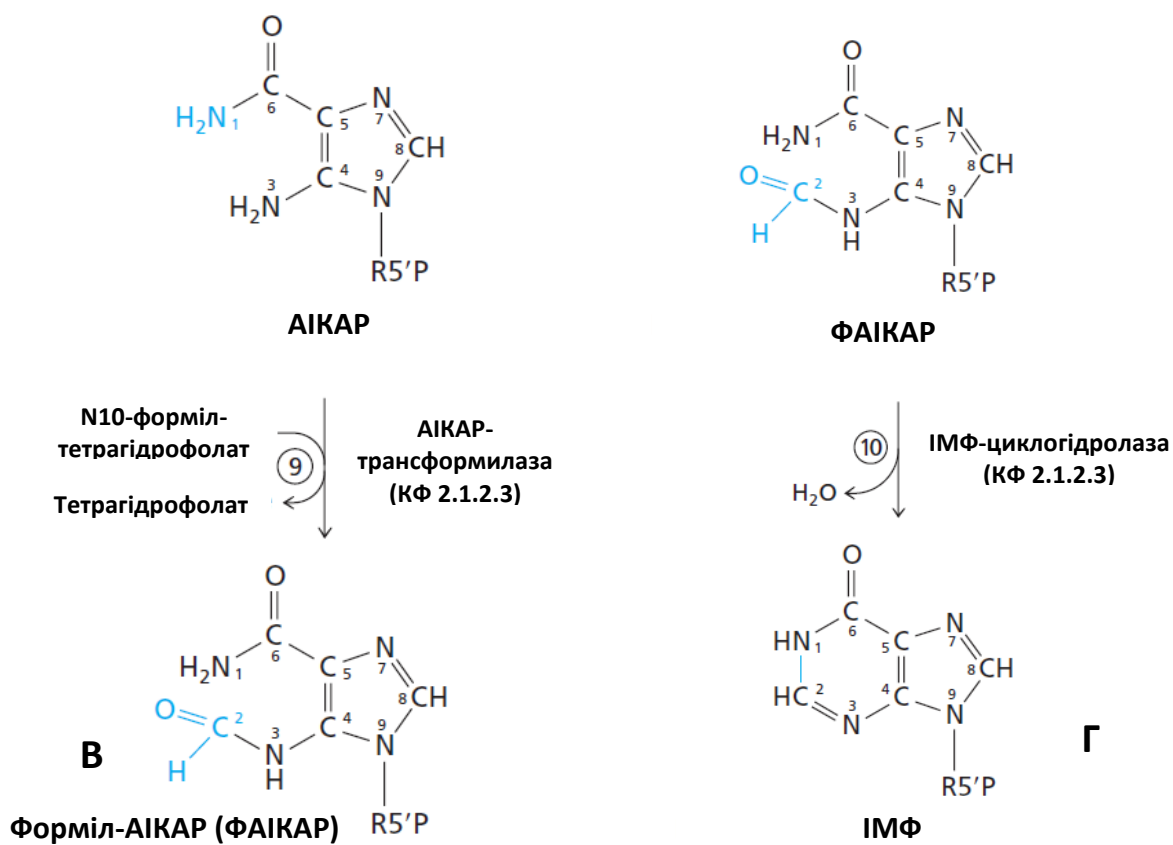
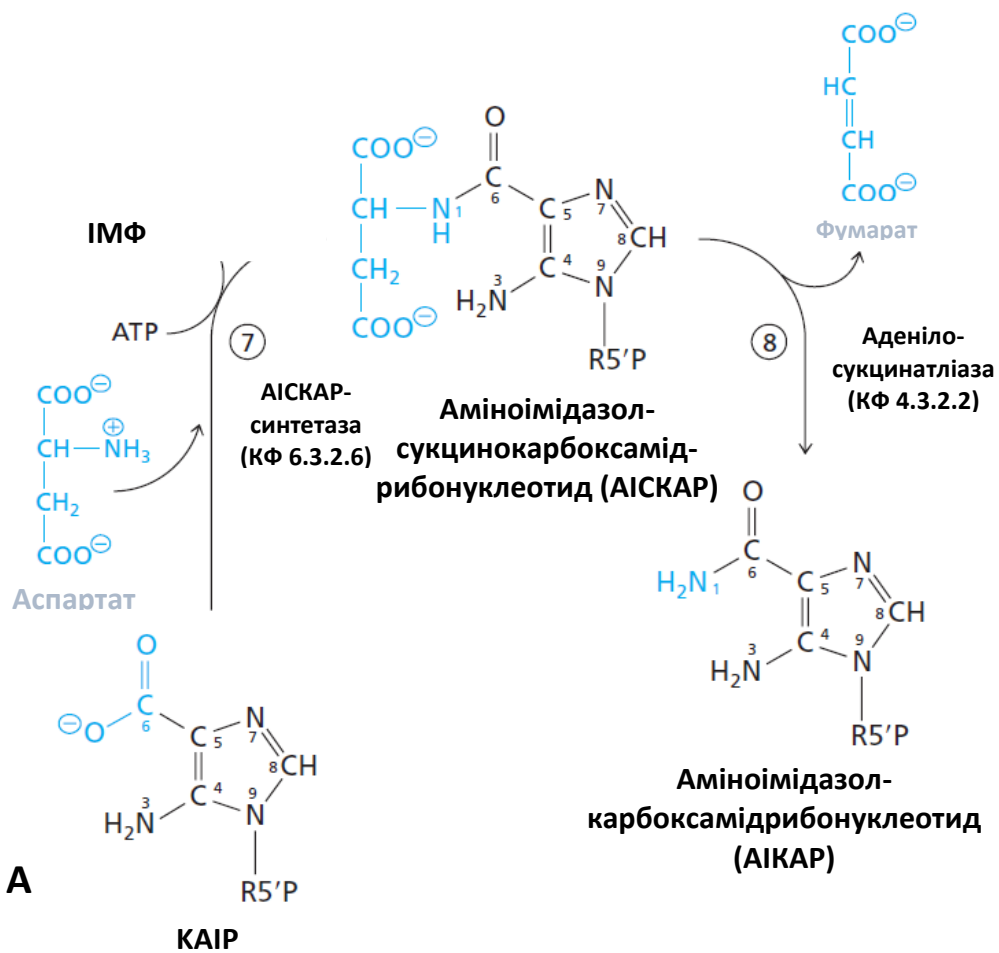


Рис. 118. Утворення АІКАР (**А та Б**), ФАІКАР (**В**) та інозинмонофосфату (**Г**).

9.2. Перетворення ІМФ на інші пуринові нуклеотиди

Шляхи перетворення **ІМФ** на **АМФ** або **ГМФ** представлені на **рис. 119**.

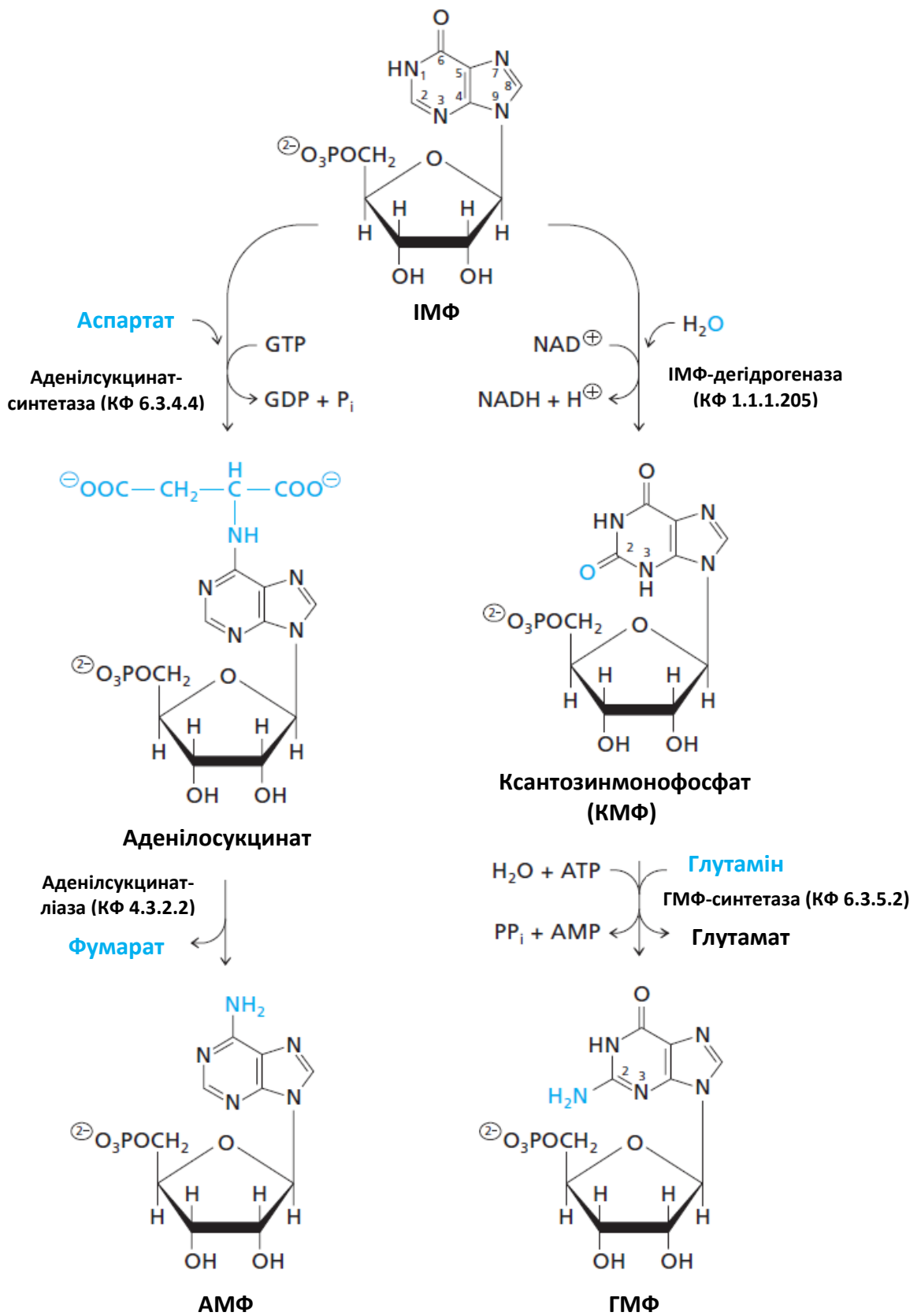


Рис. 119. Схема формування АМФ та ГМФ з інозинмонофосфату.

Як видно з рисунку, для кожного з перетворень потрібно по дві ферментативні реакції. Після них **АМФ та ГМФ** можуть фосфорилуватися до власних ди- та трифосфатів за рахунок дії специфічних **аденілат-** (КФ 2.7.4.3) **та гуанілаткіназ** (2.7.4.8) відповідно, а також за допомогою широкоспецифічної **нуклеотиддифосфаткінази** (КФ 2.7.4.6). Дві стадії, що потрібні для перетворення **ІМФ** на **АМФ** (рис. 119), нагадують сьому та восьму стадії біосинтезу **ІМФ** (рис. 118, А та Б). Спершу аміногрупа **аспартату** конденсується з **кетогрупою Об** у складі **ІМФ** в реакції, каталізованій **ГТФ-залежною аденілосукцинатсинтетазою** (КФ 6.3.4.4). Далі відбувається елімінація **фумарату** зі складу **аденілосукцинату**, яка каталізується **аденілосукцинатліазою** (КФ 4.3.2.2) – ферментом, ідентичним до того, що каталізує восьму стадію утворення **ІМФ de novo** (рис. 118, Б). У свою чергу, **перша стадія перетворення ІМФ на ГМФ** (рис. 119) полягає у окисненні положення С2 пуринового кільця, каталізованому **НАД-залежною ІМФ-дегідрогеназою** (КФ 1.1.1.205). Ця реакція проходить через приєднання **молекули води** за подвійним зв'язком між положеннями С2 та N3 з послідовним окисненням утвореного **гідрату**. Продуктом цієї стадії виступає **ксантозин-5'-монофосфат (КМФ)**. Наступною реакцією є заміна **кисню** у положенні С2 на **амідний азот з глутаміну**, що проходить з витратою АТФ і каталізується **ГМФ-синтетазою** (КФ 6.3.5.2). Цікавим є той факт, що використання **ГТФ** як джерела енергії синтезу **АМФ з ІМФ**, так само, як і **АТФ** у якості кофактору формування **ГМФ з ІМФ**, направлене на **підтримку балансу кількостей пуринових нуклеотидмонофосфатів** у клітинах.

Відомо, що синтез пуринів у клітині регулюється (рис. 120) за допомогою **інгібування за зворотнім зв'язком (ретроінгібування)**. Декілька ферментів цього шляху є алостеричними, як було встановлено *in vitro*. **Рибозофосфатдифосфокіназа**, наприклад, пригнічується підвищеними концентраціями пуринових нуклеотидів, хоча й вищими за фізіологічні. Відомо також, що **ФРПФ** може виступати донором **рибозо-5'-фосфату** не лише для синтезу нуклеотидів, а і у інших реакціях, тому розглядати його концентрацію як регулюючу саме для синтезу пуринових нуклеотидів не варто. Фермент, який каталізує першу реакцію біосинтезу пуринів - **глутамін-ФРПФ-амідотрансфераза** (рис. 114) – алостерично інгібується з боку **ІМФ, АМФ та ГМФ** за їх фізіологічних концентрацій. Ця ланка вважається принциповою для регуляції всього шляху. Стадії утворення **АМФ** або **ГМФ з ІМФ** також є об'єктом ретроінгібування (рис. 120). Так, відомо, що **аденілосукцинатсинтетаза** пригнічується **АМФ** в умовах *in vitro*, а **КМФ та ГМФ** з однаковою ефективністю інгібують **ІМФ-дегідрогеназу**.

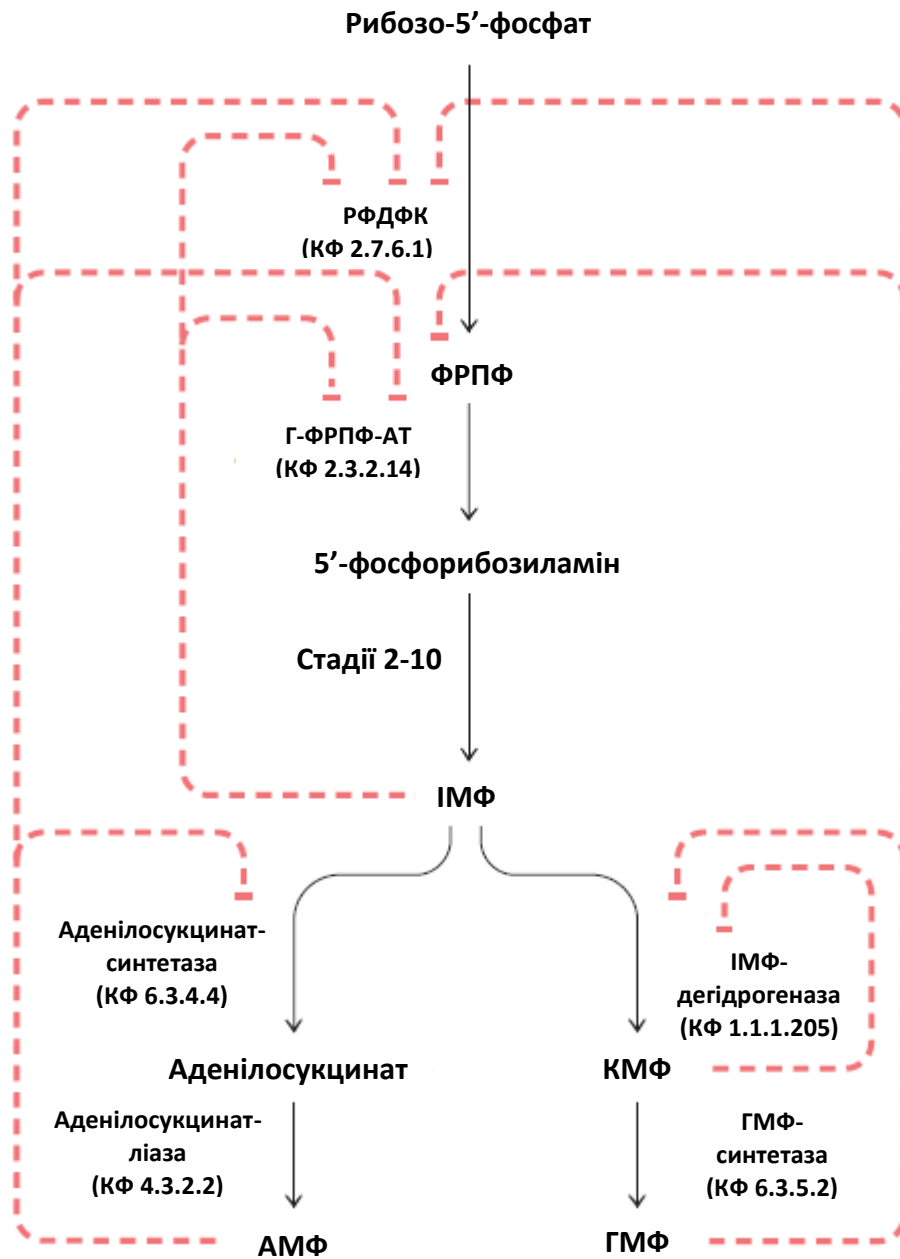


Рис. 120. Регуляція шляхів утворення пуринових нуклеотидів. РФДФК – рибозофосфатдифосфокіназа, Г-ФРПФ-АТ – глутамін-ФРПФ-амідотрансфераза.

9.3. Біосинтез уридинмонофосфату

Попередником всіх піримідинових нуклеотидів є **уридин-5'-монофосфат**. Шлях синтезу **УМФ** простіший, ніж у випадку пуринів і є менш енерговитратним. Атоми піримідинового кільця походять лише з трьох джерел: **вуглекислий газ – С2**, **амідна група глутаміну – N3**, та **повна молекула аспартату** – решта вуглецю та ще один атом азоту (**рис. 121**). Положення С2 та N3 інкорпуються в молекулу у складі специфічного макроергічного інтемедіату – **карбамоїлфосфату**.

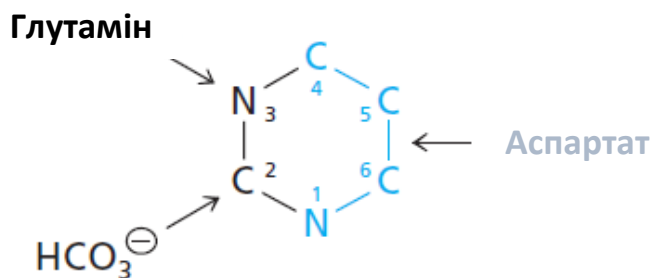


Рис. 121. Джерела атомів кільця піримідинів.

ФРПФ також потрібен для синтезу піримідинів, але **рибозо-5'-фосфат** у його складі приєднується до майбутньої молекули **УМФ** не одразу, а лише після формування та замикання кільця. Причому, з **ФРПФ** реагує **оротат (6-карбоксіурацил)** - сполука з повним піримідиновим кільцем – що відбувається лише на п'ятій стадії біосинтезу, що і призводить до утворення першого рибонуклеотиду.

Весь процес синтезу **УМФ** з **аспартату, карбамоїлфосфату та ФРПФ** займає **шість реакцій**. На перших двох стадіях формується аліфатичний інтермедіат, який вже має всі атоми, потрібні для утворення кільця піримідину – **карбамоїласпартат**. Згодом ця проміжна сполука ферментативно замикається в кільце, формуючи продукт дигідрооротат, який окислюється до **оротової кислоти**. **Оротат**, як уже відмічалось, перетворюється на рибонуклеотид **оротидин-5'-монофосфат (ОМФ або оротидилат)**, який після свого формування декарбоксілюється з утворенням **УМФ (уридилової кислоти)**. Цей нуклеотид є попередником не лише всіх інших піримідинів з рибозою, а також і дезоксирибонуклеотидів піримідинового ряду. Ферменти, потрібні для біосинтезу піримідинів, у прокариот та еукаріот організовані і регулюються по-різному.

Першою стадією шляху біосинтезу піримідинових основ є формування **карбамоїлфосфату з бікарбонату та амідного азоту глутаміну**, а також **неорганічного фосфату** молекули АТФ (рис. 122, А). Реакцію каталізує **карбамоїлфосфатсинтетаза**, яка у тваринних тканинах має індекс II (КФ 6.3.5.5). Фермент використовує одразу дві молекули АТФ – одну для формування ковалентного зв'язку, а другу – як джерело неорганічного фосфору. Цей ензим відрізняється від тієї **карбамоїлфосфатсинтетази**, яка каталізує формування **карбамоїлфосфату в циклі сечовини** і має індекс I (КФ 6.3.4.16). Основна різниця полягає в тому що фермент I використовує **вільний амоній**, а не зв'язаний з **глутаміном**, до того ж він **розщеплює лише одну АТФ** до АМФ та пірофосфату.

Активованій за рахунок макроергічного зв'язку **карбамоїлфосфат** у **другій реакції** переноситься на **аміногрупу аспарагінової кислоти** з формуванням **карбамоїласпартату** та вивільненням **неорганічного фосфору** (рис. 122, Б).

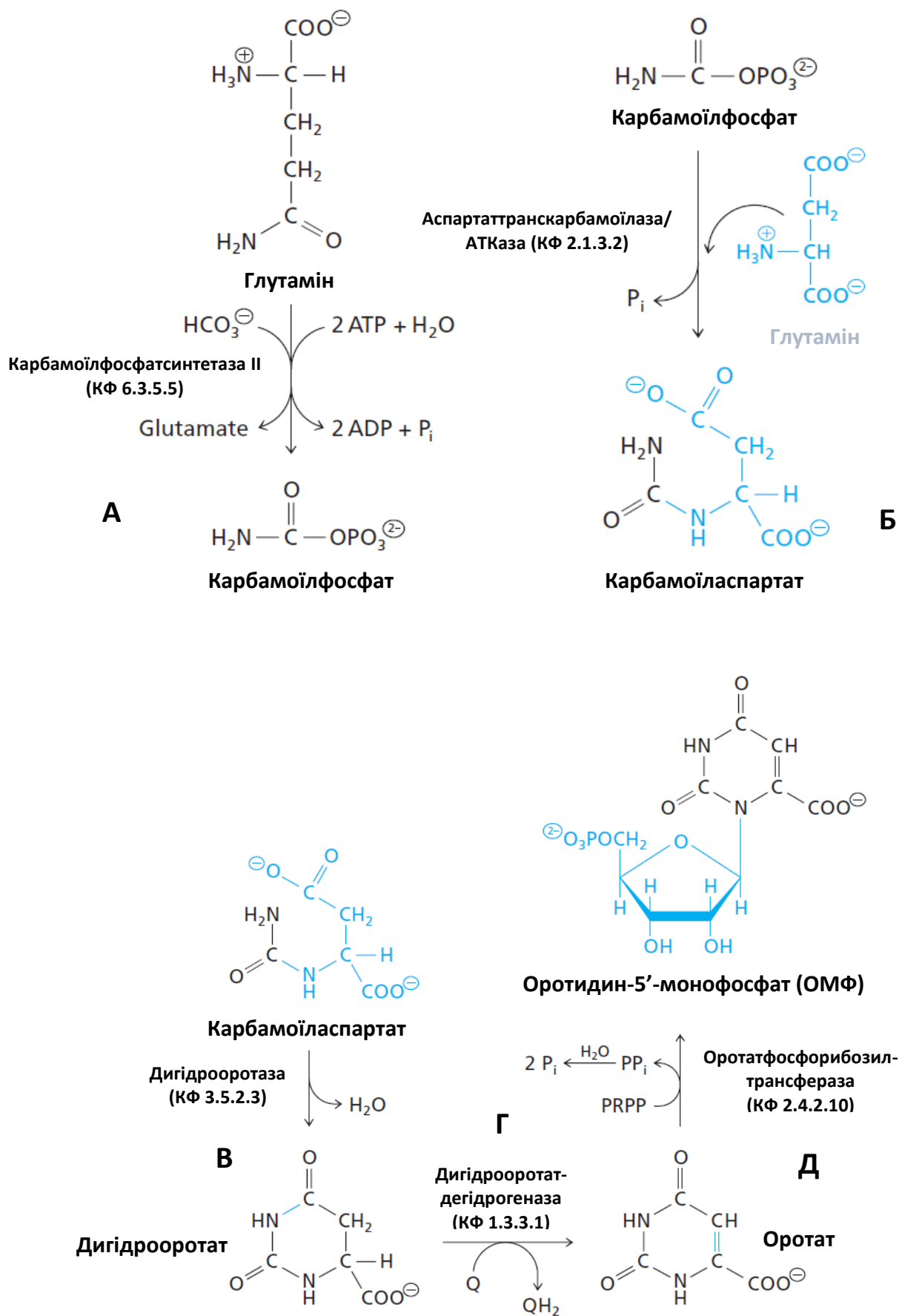
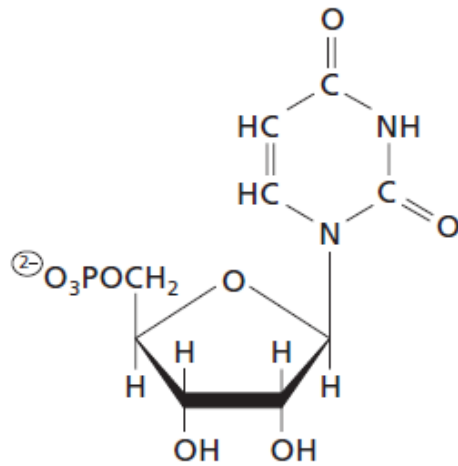


Рис. 122. Формування карбамоїлфосфату (А), карбамоїласпартату (Б), дигідрооротату (В), оротату (Г) та оротидин-5'-монофосфату (Д).

Ця реакція каталізується **аспартаттранскарбамоїлазою (АТКазою)**, яку іноді також називають **аспартаткарбамоїлтрансферазою** (КФ 2.1.3.2). Механізм даної реакції включає в себе нуклеофільну атаку з боку **аміногрупи аспартату** на **карбонільну групу карбамоїлфосфату**. Третю реакцію біосинтезу **УМФ**, яка полягає у зворотньому замиканні піримідинового кільця з утворенням **дигідрооротату** (рис. 122, В), каталізує **дигідрооротаза** (КФ 3.5.2.3). Далі **дигідрооротова кислота** окислюється **дигідрооротатдегідрогеназою** (КФ 1.3.3.1) до **оротової** (рис. 122, Г). У еукаріот формування **дигідрооротату** (стадії 1-3) відбувається у цитозолі, після чого він потрапляє у міжмембранний простір мітохондрії, де окислюється **дигідрооротатдегідрогеназою**, асоційованою з внутрішньою мітохондріальною мембраною. Відповідно, активний сайт цього ферменту направлений у простір між мембранами. Сам ензим є залізо-вмісним флавопротеїном, що переносить електрони з **дигідрооротату** на **убіхінон (Q)**, формуючи **дигідрoubіхінон або убіхінол (QH₂)**. Потім електрони з **QH₂** потрапляють на **O₂** і відновлюють його до **води** внаслідок роботи дихального ланцюга.

Одразу після свого формування **оротат** заміщує **пірофосфатну групу ФРПФ**, що призводить до утворення **оротидилату (ОМФ, рис. 122, Д)**, у реакції, каталізованій **оротатфосфорибозилтрансферазою** (КФ 2.4.2.10). Гідроліз вивільненої **пірофосфорної кислоти** до двох залишків неорганічного фосфату забезпечує незворотність процесу. Нарешті, у останній реакції **ОМФ** декарбоксилується до **УМФ** за допомогою **ОМФ-декарбоксилази (КФ 4.1.1.23, рис. 123)**. У еукаріот **оротат**, сформований в мітохондріях, знову переміщується у цитозоль, де і перетворюється на **УМФ**. Біфункціональний фермент, відомий під назвою **УМФ-синтази** (КФ 2.4.2.10 та 4.1.1.23) каталізує реакції як приєднання оротату до **ФРПФ** з формуванням **ОМФ**, так і швидкого декарбоксилування утвореного **ОМФ** до **УМФ**. Цікавим є те, що у ссавців інтермедіати, що утворюються на перших двох стадіях, включаючи формування **карбамоїласпартату** (рис. 122, А-Б), а також **ОМФ** на п'ятій стадії, не вивільняються у середовище, а залишаються міцно приєднаними до ферментного комплексу. Це дозволяє ченнелінг між активними центрами ферментів. У деяких організмах в такі ферментні комплекси організовані ензими біосинтезу пуринових основ.

Енергетичний кошт синтезу **УМФ**, включаючи утворення **ФРПФ** з **рибозофосфату** та формування **карбамоїлфосфату** складає **4** **викосоенергетичні зв'язки АТФ**, що майже втричі менше витраченого на синтез **ІМФ** (підрозділ 9.1).



Уридин-5'-монофосфат (УМФ)

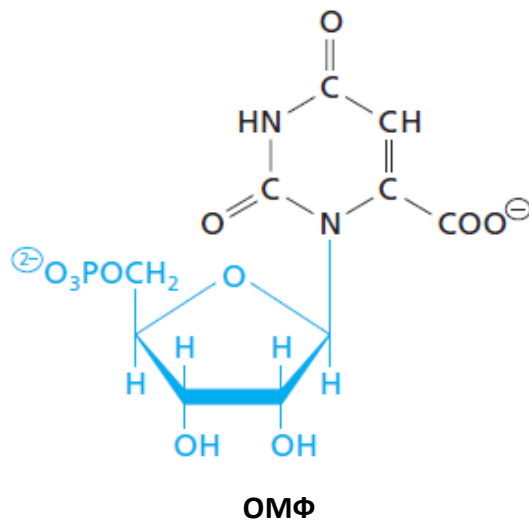


Рис. 123. Утворення УМФ з оротидинмонофосфату.

9.4. Регуляція синтезу УМФ

Регуляція біосинтезу піримідинів також відрізняється у про- та еукаріот. Хоча шість стадій синтезу **УМФ** є ідентичними у всіх видів організмів, ензими організовано по-різному. У *E. coli* кожна з шести реакцій каталізується окремим ферментом. У еукаріот існує мультифункціональний цитозольний білок – **дигідрооротатсинтаза** – який містить три відокремлені каталітичні сайти, що мають активності **карбамоїлфосфатсинтетази II, АТКази та дигідрооротази**, і, таким чином, каталізує **перші три реакції** шляху (рис. 122, А-В). **Карбамоїлфосфат**, окрім того, що є інтермедіатом синтезу піримідинів, також метаболіт біосинтезу **аргініну у орнітиновому циклі** завдяки дії **карбамоїлфосфатсинтетази I**. Цікаво, що у прокаріот

існує лише **один фермент**, який синтезує **карбамоїлфосфат у обох випадках**. Відомо, що цей ензим алостерично інгібується піримідиновими рибонуклеотидами, в тому числі і кінцевим продуктом шляху – **УМФ**. Також встановлено, що фермент активується **L-орнітином**, попередником **цитрулліну**, а також **пуриновими нуклеотидами**. Еукаріотична **карбамоїлфосфатсинтетаза II** також є об'єктом алостеричної регуляції. Так, **ФРПФ** та **ІМФ** активують ензим, в той час як **декілька типів піримідинових нуклеотидів** – пригнічують.

Наступним регуляторним ферментом біосинтезу піримідинів є **аспартаттранскарбамоїлаза (АТКаза)**. Цей ензим з *E. coli* є одним з найкраще вивчених алостеричних ферментів. **АТКаза** каталізує першу реакцію у біосинтезі піримідинових нуклеотидів за участі **карбамоїлфосфату (рис. 122, Б)**, а у бактерій ще і **синтез аргініну у циклі сечовини**. **АТКаза** інгібується **піримідиновими нуклеотидами**, в той же час, активується **АТФ in vitro**. Встановлено, що **АТКаза** *E. coli* лише частково (від 50 до 70%) пригнічується найбільш потужним інгібітором, **ЦТФ**, але таке пригнічення може бути майже повним з присутності ще й **УТФ** разом з **ЦТФ**. Сам по собі **УТФ** не здатен інгібувати **АТКазу**.

Таким чином, **алостеричний контроль**, що полягає у інгібуванні ферментів біосинтезу **піримідиновими нуклеотидами**, в той час, як активація перших проходить за допомогою **пуринових нуклеотидів**, надає можливість **карбамоїлфосфатсинтетазі та АТКазі** підтримувати **баланс пулів пуринових та піримідинових нуклеотидів** в *E. coli*. Співвідношення концентрацій цих двох типів алостеричних модуляторів визначає рівень активності **АТКазі**. Такий фермент у *E. coli* має складну структуру з сайтами для приєднання субстрату та алостеричних модуляторів, розташованими на різних субодиницях. Фермент містить **шість каталітичних субодиниць**, які організовані у вигляді **трьох димерів**. Кожна субодиниця у складі каталітичного тримеру з'язана з такою ж субодиницею іншого тримеру через **регуляторний димер**. Коли відбувається приєднання до активного центру ферменту однієї молекули **аспартату** в присутності **карбамоїлфосфату**, всі шість каталітичних субодиниць змінюють конформацію, що призводить до підвищення ензиматичної активності. Цікаво, що еукаріотична **АТКаза**, навпаки, не піддається ретроінгібуванню. Регуляція за цим типом не є необхідною, оскільки піримідиновий шлях може контролюватися ще через один фермент, розташований вище від **АТКазі**, а саме - **карбамоїлфосфатсинтетазу II**. До того ж, субстрат **АТКазі** у клітинах еукаріот не є точкою розгалуження синтетичних шляхів, оскільки синтез **карбамоїлфосфату** та **цитрулліну** для **циклу сечовини** відбувається лише у **мітохондріях**, в той час як синтез **карбамоїлфосфату** для формування піримідинових нуклеотидів проходить у **цитозолі**. Таким чином, у еукаріот є два відмежовані один від одного пули **карбамоїлфосфату**, які розташовуються у різних компартментах клітин, що відповідним чином полегшує їх регуляцію.

9.5. Формування цитидинтрифосфату

УМФ перетворюється на **ЦТФ** у трьохстадійному процесі. Спершу **уридилаткіназа**, яку ще називають **УМФ-кіназою** (КФ 2.7.4.22), каталізує перенесення γ -фосфорного залишку **АТФ** на **УМФ** з формуванням **УДФ**, а далі **нуклеозиддифосфаткіназа** (КФ 2.7.6.4) приєднує ще одну γ -фосфорну групу з іншої молекули **АТФ**, що дає **уридин-5'-трифосфат**. У ході цього процесу утворюються дві молекули **АДФ**:



Третя стадія полягає у дії **ЦТФ-синтетази** (КФ 6.3.4.2), яка каталізує **АТФ**-залежний трансфер амідного азоту глутаміну в положення С4 **УТФ**, формуючи **ЦТФ** (рис. 124).

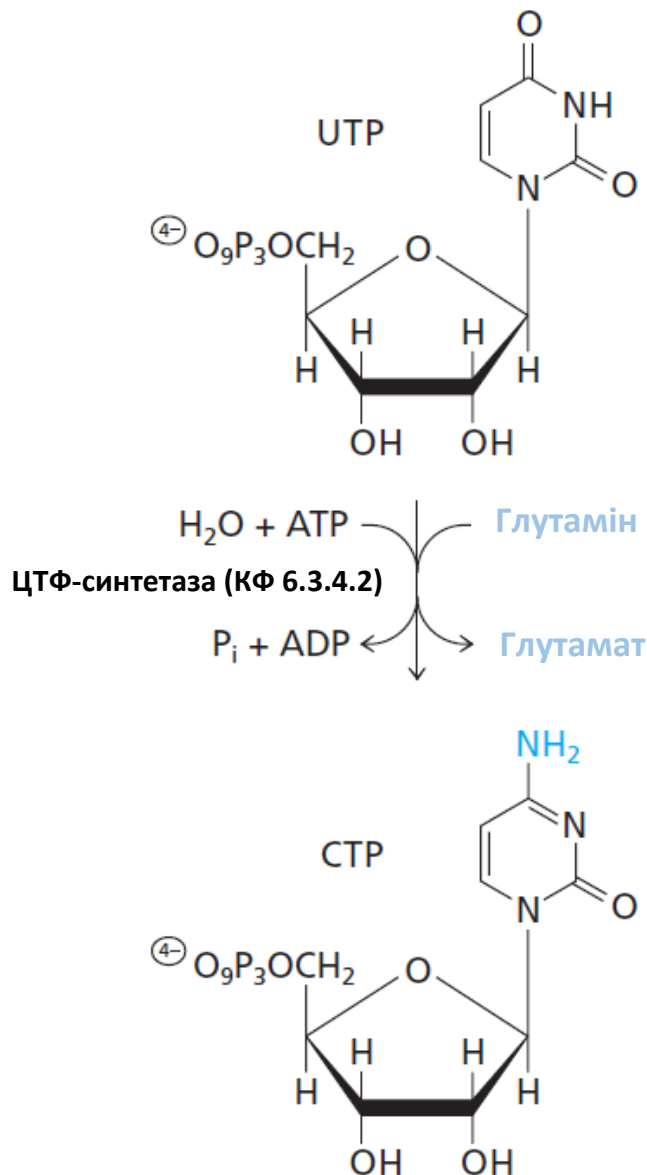


Рис. 124. Формування ЦТФ з УТФ.

Варто відмітити що ця реакція є аналогічною четвертій стадії пуринового синтезу (рис. 116, А), а також реакції утворення ГМФ з КМФ, каталізованій ГМФ-синтетазою (рис. 119). Відомо, що ЦТФ-синтетаза алостерично пригнічується власним продуктом, а у E. coli ще й активується ГТФ (рис. 125).

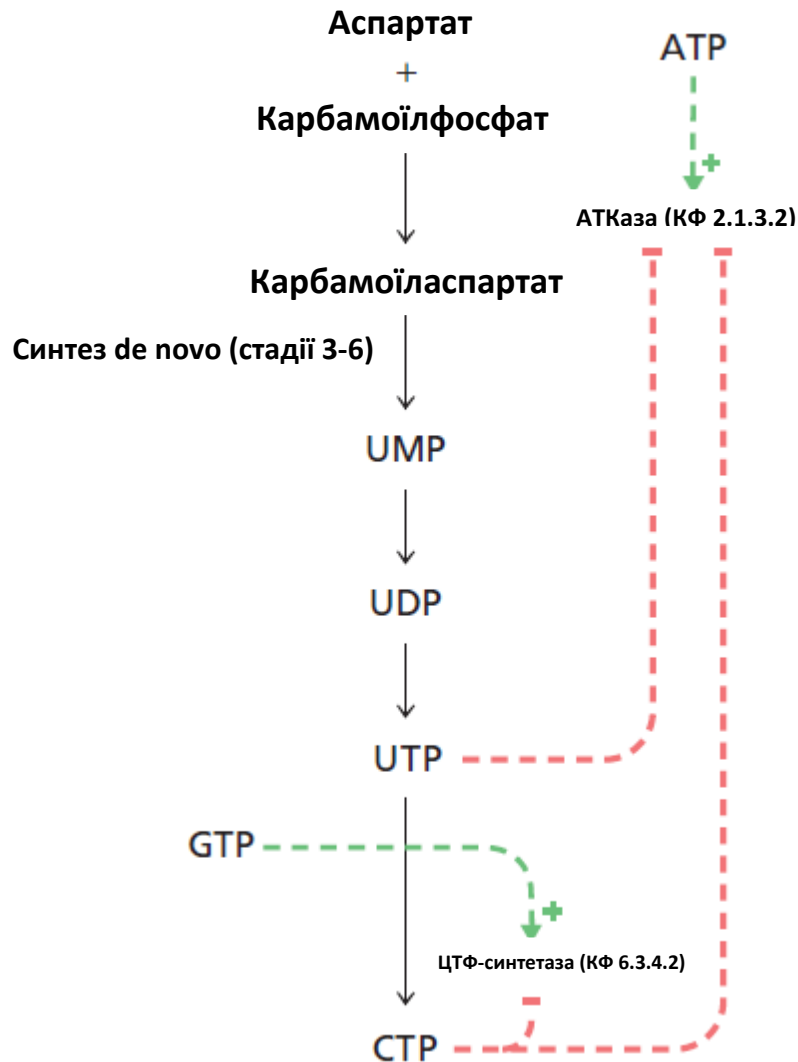


Рис. 125. Регуляція синтезу ЦТФ.

Таким чином, баланс ендогенного синтезу піримідинів забезпечується, в основному, завдяки контролю активності двох ферментів - **АТКаз** та **ЦТФ-синтетази**. Підвищені рівні **ЦТФ** блокують його подальший синтез за рахунок інгібування **ЦТФ-синтетази**. За цих умов синтез **УМФ** уповільнюється, але не зупиняється повністю, оскільки **ЦТФ** лише частково блокує **АТКазу**. Тому у даному випадку **УМФ** все ж може бути використаний для синтезу РНК або у якості попередника **дТТФ** (розділ 9.7). **АТКаз** повністю пригнічується лише коли концентрації **УТФ** і **ЦТФ** одночасно підвищуються. Відомо також, що збільшені концентрації пуринових нуклеотидів **АТФ** та **ГТФ** інтенсифікують швидкість біосинтезу

піримідинів, що допомагає підтримувати загальний баланс кількостей попередників нуклеїнових кислот.

9.6. Відновлення рибонуклеотидів

2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфати синтезуються шляхом ензиматичного відновлення рибонуклеотидів. Таке відновлення у більшості організмів здійснюється лише на рівні дифосфатів. Пітер Рейчард з колегами показали, що всі чотири рибонуклеозиддифосфати – **АДФ, ГДФ, ЦДФ та УДФ** – є субстратами одного ферменту – **рибонуклеозиддифосфатредуктази** (КФ 1.17.4.1). У деяких мікроорганізмах, наприклад, родів *Lactobacillus*, *Clostridium* та *Rhizobium*, субстратами відновлення є трифосфати рибонуклеозидів, і каталізує цей процес кобаламін-залежна редуктаза. Обидва типи ферментів, однак, називаються **рибонуклеотидредуктазами (РНР) класу I та II**, хоча більш точними назвами були б **нуклеозидди- та нуклеозидтрифосфатредуктаза** відповідно. Коферментом реакції відновлення дифосфатів у **редуктаз класу I є НАДФН**. Встановлено, що у ході реакції дисульфідний «місток» у активному центрі цього ферменту віднолюється до двох тіолових груп, які, у свою чергу, відновлюють положення С2 рибозного залишку нуклеотидного субстрату за допомогою складного вільнорадикального механізму (рис. 126).

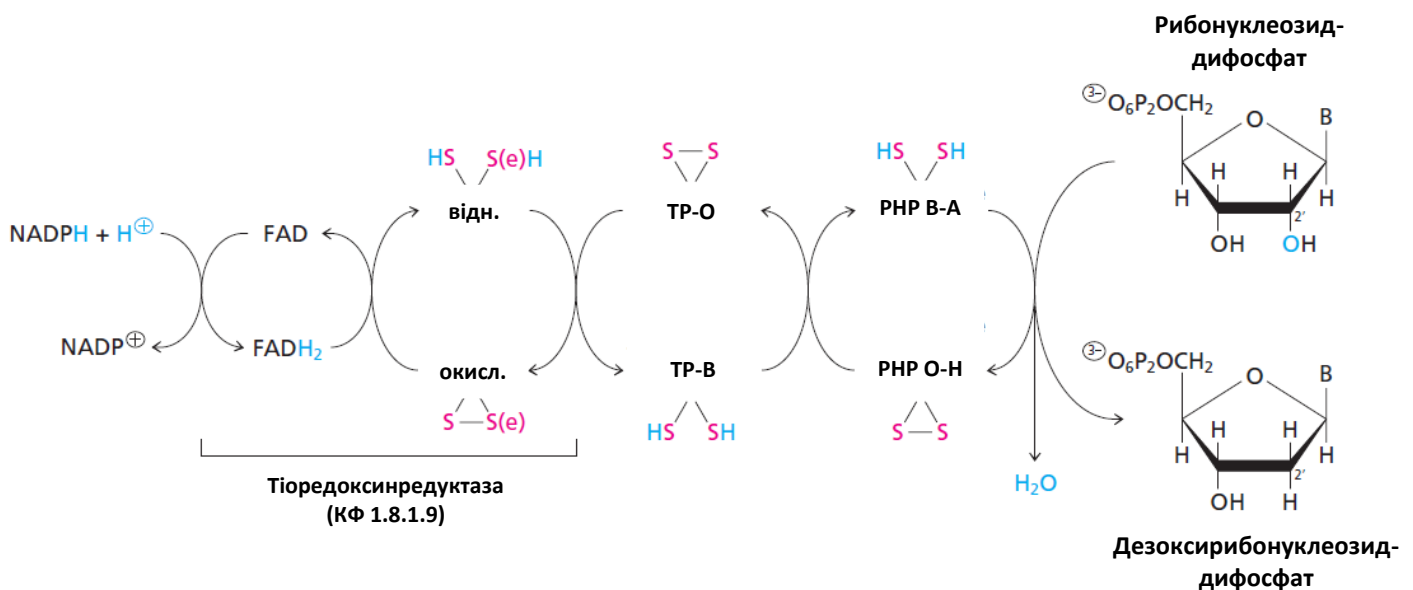


Рис. 126. Схема відновлення рибонуклеозиддифосфатів. РНР В-А – рибонуклеотидредуктаза відновлена активна, РНР О-Н – окислена неактивна, ТР-О – тіоредоксин окислений, ТР-В – відновлений.

Як видно з рисунку, електрони переносяться з **НАДФН** на **РНР** через **флавін-залежну тіоредоксинредуктазу** (КФ 1.8.1.9), а далі - на дитіольний білковий

кофермент **тіоредкосин**. **Тіоредоксинредуктаза** прокариот та дріжджів має у активному сайті пару цистеїнових залишків - так звану дитіол-дисульфідну групу. У **тіоредоксинредуктазі** ссавців центр окислення-відновлення відрізняється присутністю у парі лише одного залишку «чистого» цистеїну, інший – це **селеноцистеїн**. Після свого формування внаслідок дії цього ферменту, **дАДФ**, **дГДФ** та **дЦДФ** фосфорилюються до трифосфатів завдяки **нуклеозиддифосфаткіназам**. **дУДФ**, як буде видно у наступному підрозділі, дає початок **дТМФ** через стадію утворення **дУМФ**.

Варто відмітити, що існує також **клас III РНР**, який використовує **S-аденозилметіонін SAM (S-adenosylmethionine)** у якості кофактора, але такі ферменти менш розповсюджені, ніж перші два класи. Відомо також, що **РНР** є об'єктом складної алостеричної регуляції, покликаної на дотримання балансу кількостей дезоксирибонуклеотидів для синтезу ДНК. І субстратна специфічність, і швидкість каталізу РНК у клітинах еукаріот регулюються зворотнім приєднанням до ферменту нуклеотидних метаболітів. Алостеричними модуляторами **РНР** є **АТФ**, **дАТФ**, **дТТФ** та **дГТФ**. Всі вони здатні зв'язуватися з ферментом у будь-якому з двох основних регуляторних алостеричних ділянок. Одна з них - так званий сайт активності – контролює активність РНК, а інша – сайт специфічності – субстратну специфічність ензиму. Приєднання **АТФ** до сайту активності призводить до активації **РНР**, в той час як зв'язування **дАТФ** у цій ділянці інгібує фермент (**таблиця 27**). У випадку, коли в першому алостеричному центрі приєднано **АТФ**, а у сайті специфічності – **дАТФ** або **АТФ**, редуктаза отримує підвищену спорідненість до **піримідинових рибонуклеотидів**, і переважно каталізує перетворення **ЦДФ** та **УДФ** на відповідні дезоксиформи. Нарешті, зв'язування **дТТФ** із сайтом специфічності активує відновлення **ГДФ**, в той час як приєднання **дГДФ** до цього регіону індукує відновлення **АДФ**. Таким чином, за допомогою складної регуляції **РНР** забезпечується **баланс кількостей дезоксирибонуклеотидів** відповідно до змін потреби клітини у нових молекулах ДНК.

Таблиця 27. Алостеричні ефектори рибонуклеотидредуктази еукаріот.

Ліганд у сайті активності	Ліганд у сайті специфічності	Активність каталітичного сайту
дАТФ	-	Немає
АТФ	АТФ/дАТФ	ЦДФ або УДФ
АТФ	дТТФ	ГДФ
АТФ	дГТФ	АДФ

9.7. Утворення дТМФ з дУМФ

Дезокситимідилат (дТМФ) формується з УМФ шляхом чотирьох стадій. Спершу УМФ фосфорилується до УДФ, який потім відновлюється до дУДФ. Далі дУДФ дефосфорилується до дУМФ і піддається метилюванню до дТМФ:



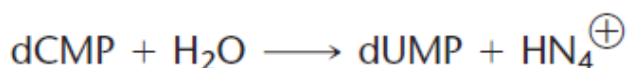
Причому перетворення дУДФ на дУМФ відбувається двома шляхами. Перший з них полягає у реакції дУДФ з АДФ у присутності нуклеозидмонофосфаткінази (КФ 2.7.4.4), що дає дУМФ та АТФ:



Другий шлях йде через фосфорилування дУДФ до дУТФ з допомогою нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6) та з витратою АТФ. Потім відбувається швидкий гідроліз утвореного дУТФ до дУМФ та пірофосфату, каталізований дУТФазою - дезоксиуридинтрифосфатдифосфогідролазою (КФ 3.6.1.23):



Гідроліз дУТФ попереджає випадкову інкорпорацію цього нуклеотиду у ДНК замість дТТФ, тому й відбувається дуже швидко. Ще одним джерелом дУМФ може слугувати дЦМФ за рахунок гідролізу останнього дЦМФ-дезаміназою (КФ 3.5.4.12):



Перетворення дУМФ на дТМФ каталізується тимідилатсинтазою (КФ 2.1.1.45). Донором одновуглецевої метильної групи у даній реакції виступає **N5-N10-метилентетрагідрофолієва кислота (рис. 127)**. Метильна група у складі дТМФ є більш відновленою, ніж метиленовий залишок в **N5-N10-метилентетрагідрофоліаті**, стан окислення якого є еквівалентним до зв'язаного з азотом гідроксиметилу у формальдегіді. Таким чином, **метилентетрагідрофоліат** є не лише коферментом трансферазної реакції, а також і відновлюючим агентом. У процесі перенесення метилену на дУМФ, **5,6,7,8-тетрагідрофолієва кислота** віддає два протони і тим самим окислюється до **7,8-дигідрофоліату**. Цікаво, що це єдиний приклад реакції, в якій трансфер одновуглецевого залишку від **тетрагідрофоліату** відбувається одночасно з його окисленням за положеннями N5 та C6 і формуванням **дигідрофолієвої кислоти**.

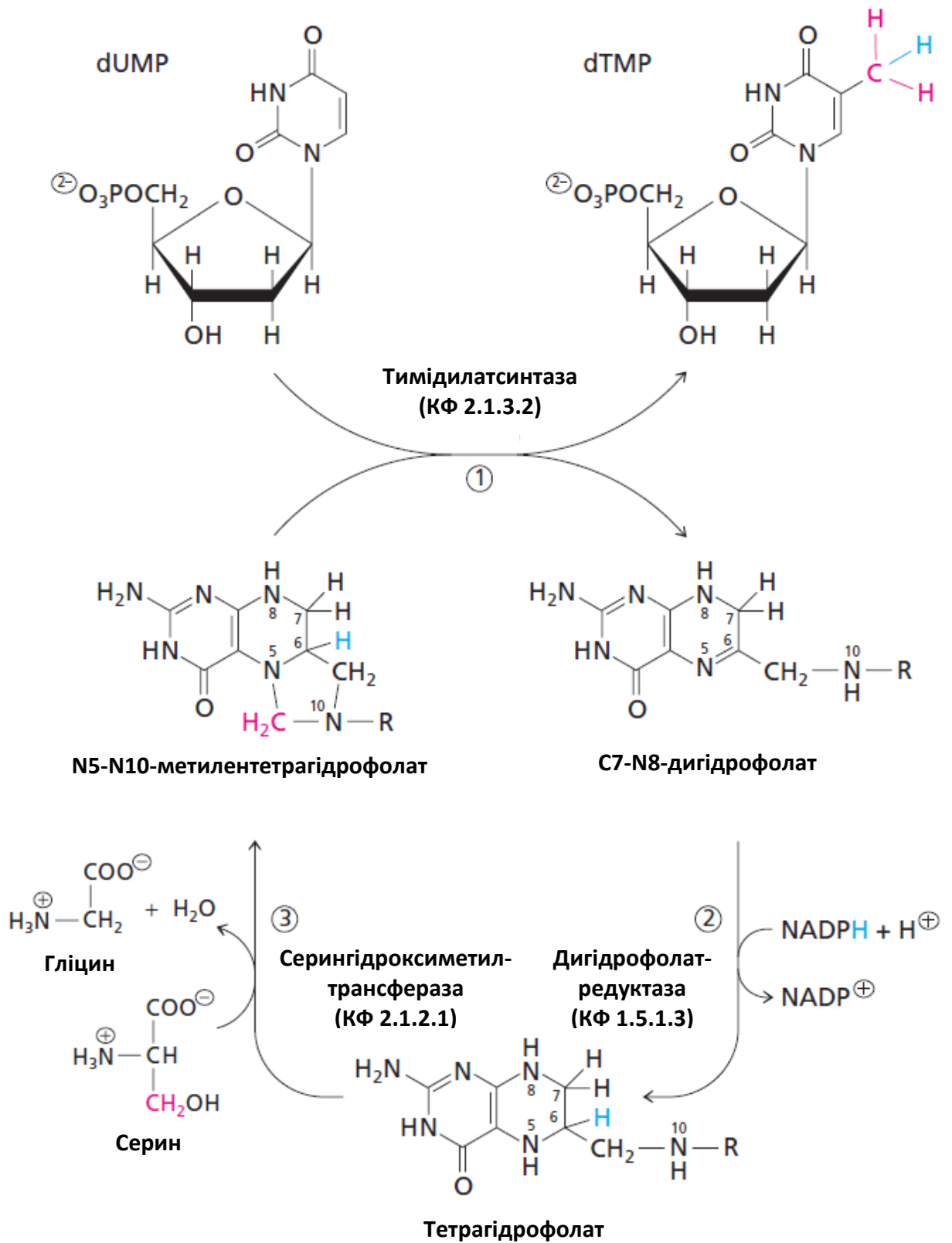
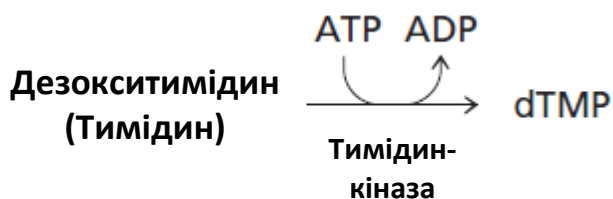


Рис. 127. Схема реакції формування дТМФ з дУМФ та пов'язаних з нею перетворень тетрагідрофолієвої кислоти.

Утворений **дигідрофолат** перед зв'язуванням з наступним одноуглецевим фрагментом має відновитися до **тетрагідрофолату**. Зв'язок між положеннями N5 та C6 у молекулі **дигідрофолату** відновлюється внаслідок НАДФН-залежної реакції, каталізованої **дигідрофолатредуктазою** (КФ 1.5.1.3). Далі фермент **серингідроксиметилтрансфераза** (КФ 2.1.2.1) здійснює перенесення γ -гідроксиметильної групи серину на **тетрагідрофолат** з регенерацією вихідного коферменту – **N5-N10-метилентетрагідрофолієвої кислоти** (рис. 127). **Тимідилатсинтаза та дигідрофолатеруктаза**, як правило, є двома окремими білковими молекулами, однак, у найпростіших ці дві ферментативні активності належать одному поліпептидному ланцюгу. У такому ферменті дигідрофолатний продукт першої реакції піддається ченнелінгу з активного сайту **тимідилатсинтази** до каталітичного регіону **дигідрофолатредуктази**. Електростатичні взаємодії між позитивно-зарядженими ділянками поверхні біфункціонального ензиму та негативно-зарядженим **дигідрофолатом** (який містить залишки γ -глутамату), направляють продукт у активний сайт для відновлення.

Відомий і інший шлях синтезу **дТМФ** – через фосфорилування екзогенного **тимідину (дезокситимідину) АТФ-залежною тимідинкіназою** (КФ 2.7.11.21):



Нарешті, у якості високоспецифічної «мітки» або трейсера для моніторингу внутрішньоклітинного синтезу ДНК часто використовують **радіоактивний тимідин**, оскільки ця сполука вільно проникає у клітини і з високою ймовірністю перетворюється на **тимідилат** і «вбудовується» в ланцюги ДНК під час її синтезу.

9.8. Реутилізація пуринів та піримідинів

Нуклеїнові кислоти, які потрапляють у організм з їжею через ШКТ, розщеплюються до **мононуклеотидів, нуклеозидів**, і, у кінцевому рахунку, **гетероциклів основ** у процесі нормального метаболізму клітини (рис. 128). Реакції такого катаболізму каталізуються **рибо- та дезоксирибонуклеазами** (КФ 3.1.x.x), низкою **нуклеотидаз** (КФ 3.1.3.x) і **неспецифічних фосфатаз** (КФ 3.1.3.x), а також **нуклеозидазами** (КФ 3.2.2.x) і **нуклеозидфосфорилазами** (КФ 2.4.2.x). Деякі з пуринових та піримідинових основ, що формуються цими шляхами, надалі розщеплюються до **сечової кислоти** та інших кінцевих продуктів, але значна їх частина використовується клітиною для власних потреб, тому одразу перетворюється знову

на **5'-монофосфатні нуклеотиди**. Основним донором у таких реакціях реутилізації є вже згаданий раніше **ФРПФ**.

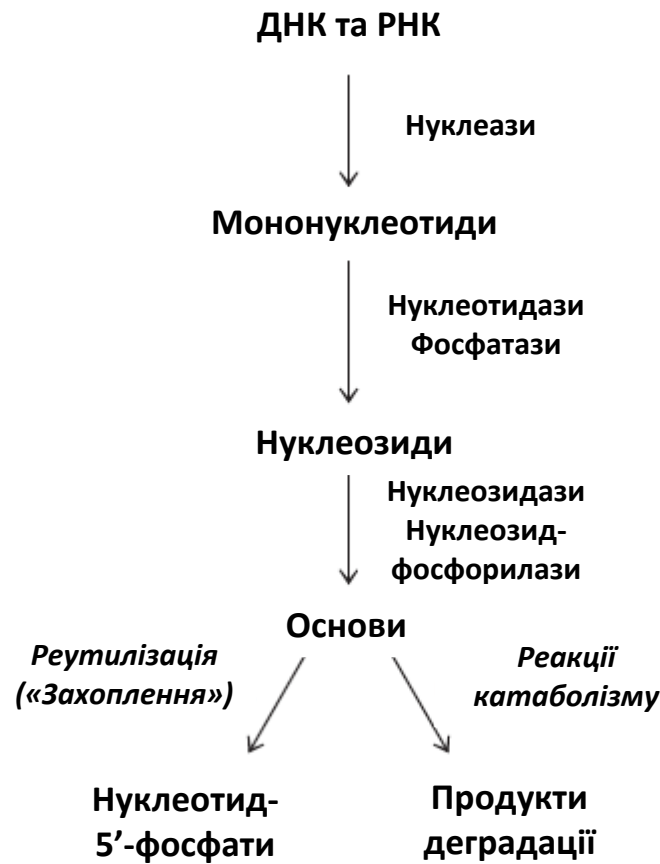


Рис. 128. Використання екзогенних пуринів та піримідинів.

Відомо, що шляхи деградації є частиною енергетичного метаболізму тварин. Пурини та піримідини, отримані з реакцій катаболізму екзогенних нуклеїнових кислот, частіше піддаються подальшій деградації, ніж сформовані *de novo* у клітинах. Такі основи та нуклеотиди частіше приймають участь у реакціях біосинтезу. Реутилізація основ призводить до економії енергії клітин. Деградація пуринових нуклеотидів до відповідних пуринів та шляхи їх реутилізації за участі **ФРПФ (PRPP)**, показані на **рис. 129** (ГГ-ФРТ – гіпоксантин-/гуанінфосфорибозилтрансфераза).

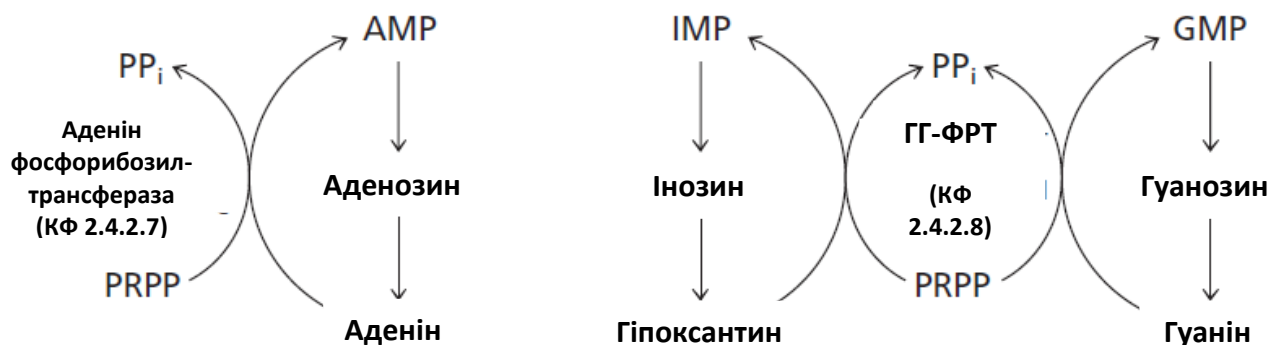


Рис. 129. Деградація пуринових нуклеотидів та реутилізація пуринів.

Як видно з рисунку, **аденінфосфорибозилтрансфераза** (КФ 2.4.2.7) каталізує реакцію **аденіну** з **ФРПФ**, що формує **АМФ** та **пірофосфат**. Гідроліз **пірофосфорної кислоти** здійснюється неорганічною пірофосфатазою, що забезпечує незворотність реакції. **Гіпоксантин/гуанінфосфорибозилтрансфераза** (КФ 2.4.2.8) каталізує дві подібні реакції, а саме – перетворення **гіпоксантину** на **ІМФ** та **гуаніну** на **ГМФ**, знову ж таки, з формуванням **пірофосфорної кислоти**. **Піримідини** реутилізуються за допомогою **оротатфосфорибозилтрансферази** (КФ 2.4.2.10), яка каталізує передостанню стадію їх біосинтетичного шляху (**рис. 122, Д**). Цей фермент також може перетворювати на піримідинові нуклеотиди і інші, окрім **оротату, піримідини**.

Отже, нуклеотиди та їх компоненти піддаються численним взаємоперетворенням. **Дія фосфатаз, нуклеотидаз та нуклеозидаз** чи **нуклеозидфосфорилаз** призводить до вивільнення азотистих основ зі складу нуклеотидів. Реакції, каталізовані **фосфорибозилтрансферазами** або **нуклеозидфосфорилазами**, беруть участь у реутилізації основ на нуклеозидів на нуклеотидному рівні. Основи, які не реутилізуються, піддаються катаболізму. Схеми взаємоперетворень компонентів пуринових та піримідинових нуклеотидів представлені на **рис. 130 та 131** відповідно. **ХМР** – ксантозин-5'-монофосфат.

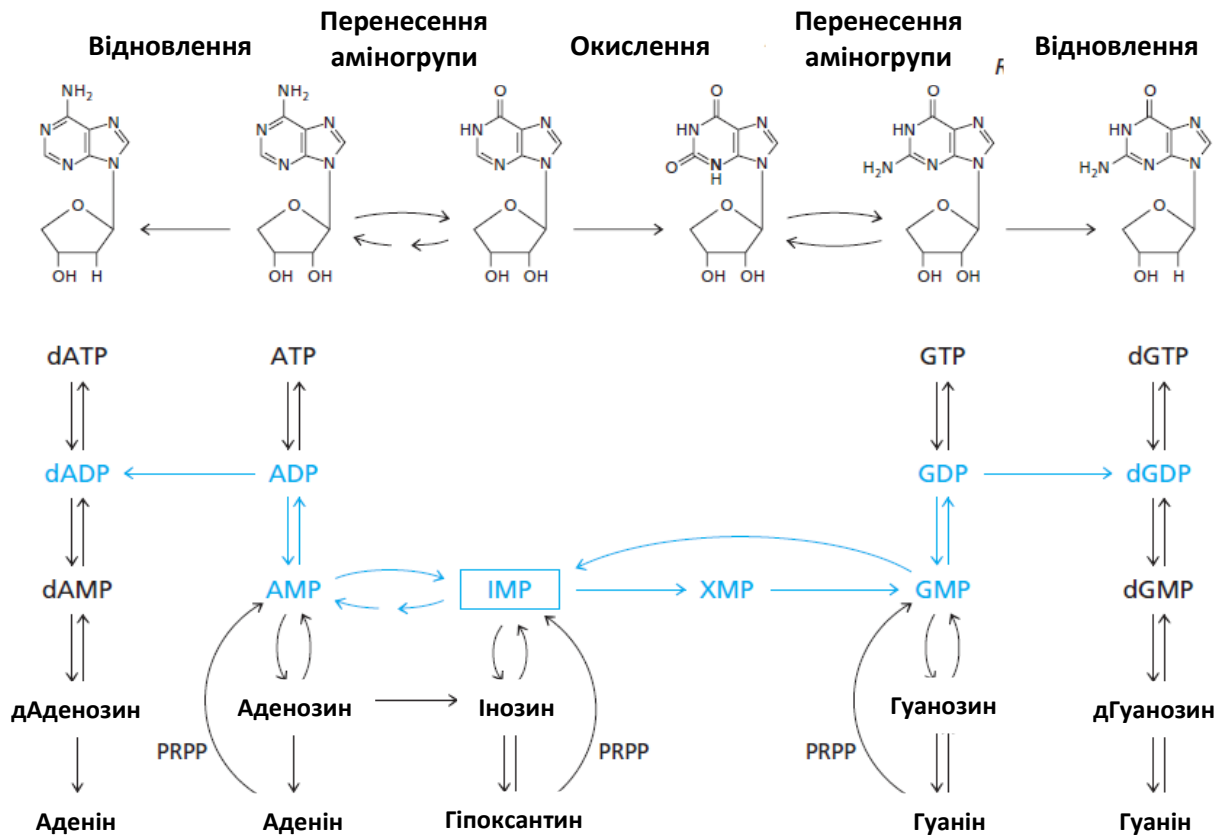


Рис. 130. Схема взаємоперетворень пуринових нуклеотидів та їх компонентів.

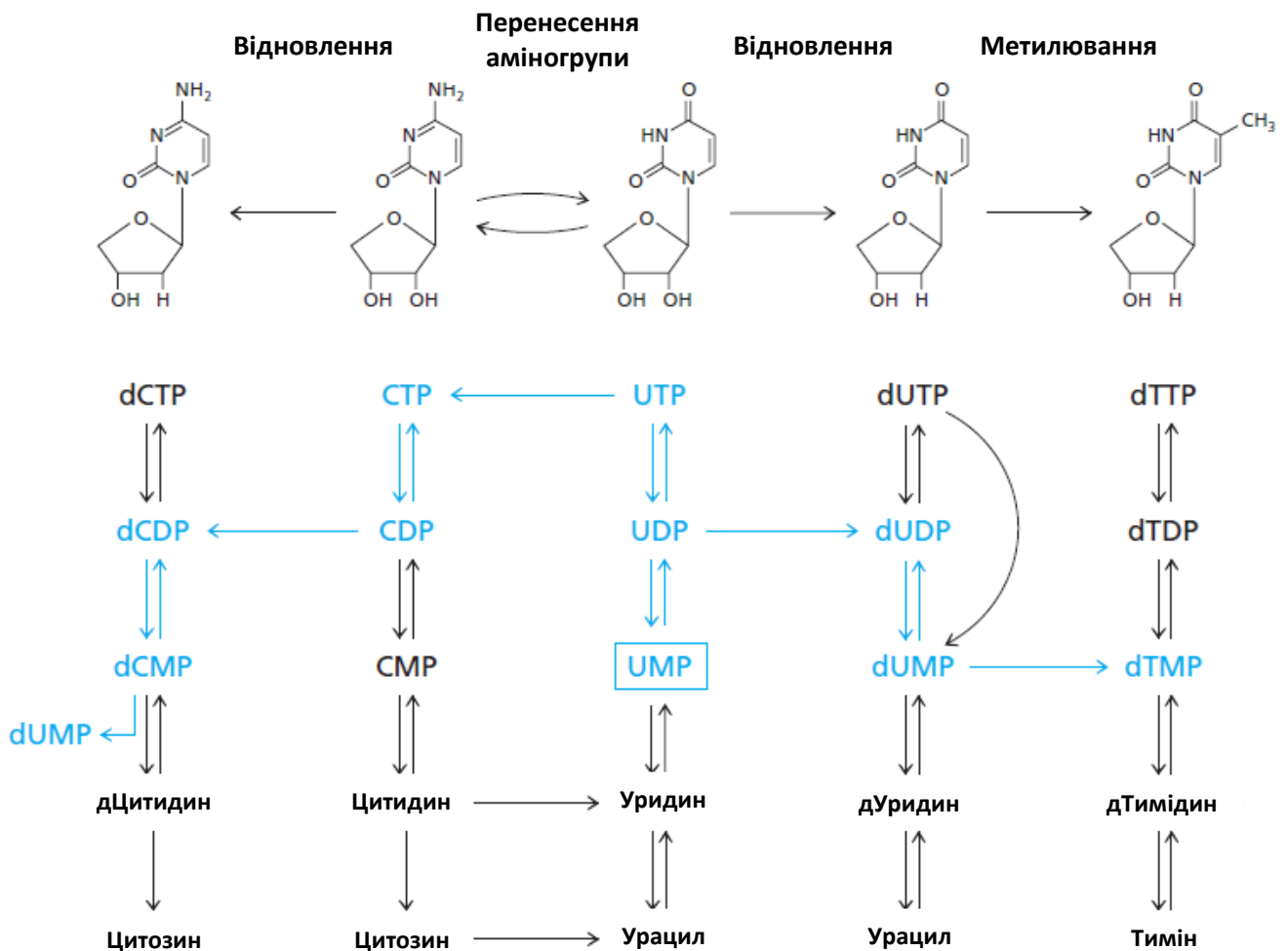


Рис. 131. Схема взаємоперетворень піримідинових нуклеотидів та їх складових.

9.9. Катаболізм пуринів

Більшість з вільних пуринових та піримідинових основ піддаються реутилізації, яка була розглянута у попередньому підрозділі. Однак чимала частина метаболізує далі, розщеплюючись до простіших речовин – кінцевих продуктів обміну нуклеїнових кислот. **Птахи, деякі рептилії та примати, включаючи людей,** перетворюють пуринові нуклеотиди на **сечову кислоту або урат**, яка піддається екскреції. У **птахів та рептилій** катаболізм амінокислот також приводить до **сечової кислоти**, у **ссавців** же кінцевим продуктом азотистого обміну є, як відомо, **сечовина**. Птахи та рептилії не здатні катаболізувати урат, але багато живих організмів інших типів мають ферментні системи, що каталізують деградацію урату до простіших продуктів. Відомо, що **АМФ** може спочатку розщеплюватися до **гіпоксантину**, а **ГМФ** – до **гуаніну**. В той же час, гідролітичне **відщеплення фосфату** від положення C5' рибози **АМФ** та **ГМФ** дає **аденозин** та **гуанозин** відповідно (рис. 130). Далі **аденозин** може **дезамінуватися** до інозину за дії **аденозиндезамінази** (КФ 3.5.4.4). Альтернативно **АМФ** може перетворюватися на **ІМФ** під впливом **АМФ-дезамінази** (КФ 3.5.4.6), і вже потім відбувається гідроліз **ІМФ** до **інозину**. Фосфороліз **інозину** дає **гіпоксантин**, а **гуанозину** – **гуанін**. Обидві ці реакції, так само, як і фосфороліз деяких

дезоксирибонуклеозидів, каталізуються **пурипнуклеозидфосфорилазою** (КФ 2.4.2.1) і призводять до формування **α -D-рибозо-1'-фосфату** або **α -D-2'-дезоксирибозо-1'-фосфату**, а також вільної пуринової основи. Цікаво, що **аденозин** не може бути субстратом цього ферменту у ссавців. **Гіпоксантин**, утворений з **інозину**, надалі окислюється до **ксантину**, а **ксантин** – до **урату** (рис. 132). Обидві реакції проводяться **ксантиноксидазою** (КФ 1.17.3.2) або **ксантиндегідрогеназою** (КФ 1.17.1.4).

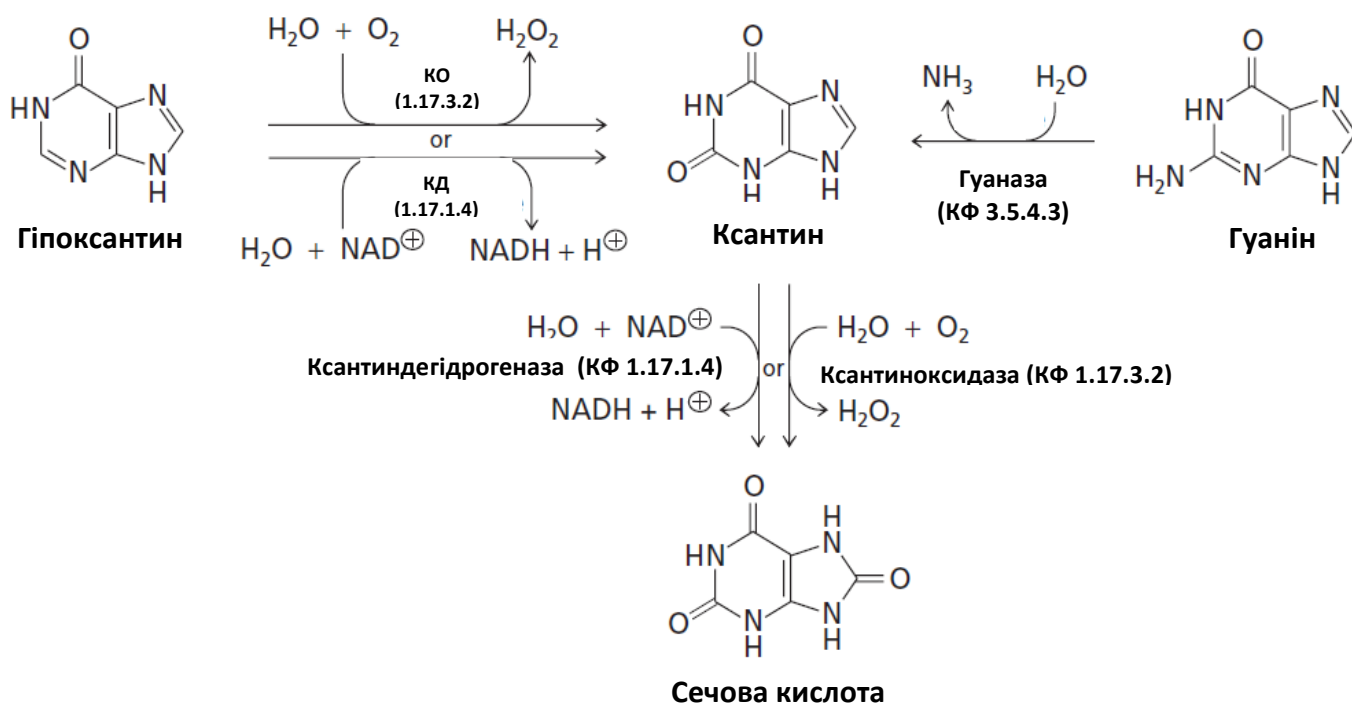


Рис. 132. Схема катаболізму пуринових основ до сечової кислоти.
КД – ксантиндегідрогеназа, КО – ксантиноксидаза.

В реакціях, каталізованих **ксантиноксидазою**, електрони в ході окислення переносяться від субстрату безпосередньо на **O₂** з формуванням **H₂O₂**, який під дією **каталази** (КФ 1.11.1.6) перетворюється на **H₂O** та знову на **O₂**. **Ксантиноксидаза** є внутрішньоклітинним ферментом у ссавців, який, схоже, являє собою змінену форму **ксантиндегідрогенази**, яка генерує ті ж продукти, але не здатна прямо відновлювати молекулярний кисень, тому передає електрони на **НАД**. Ці два ферменти широко розповсюджені в живій природі і мають дуже широку субстратну специфічність. Їх активні сайти, як правило, містять складні системи передачі електронів, які включають в себе **залізо-сірчані кластери**, **птериновий коензим** з координованим атомом молібдену, а також **ФАД**.

У більшості клітин **гуанін** дезамінується до **ксантину** під впливом **гуанази** (КФ 3.5.4.3). Тварини, у яких немає активної **гуанази**, екскретують **гуанін**. Наприклад,

свині виділяють **гуанін**, але здатні метаболізувати **аденін** до **алантоїну** – головного кінцевого продукту катаболізму пуринів у більшості тварин.

Після утворення, **урат** у більшості організмів окислюється далі. Донедавна вважали, що **уратоксидаза** (КФ 1.7.3.3) перетворює **урат** безпосередньо на **алантоїн**, але наразі стало відомо, що цей шлях складніший. Перетворення **урату** на стереоспецифічну сполуку **(S)-алантоїн**, окрім **уратоксидази**, потребує ще двох додаткових ферментів. Відомо також, що у цих реакціях відбувається виділення **H₂O₂** та **CO₂** (рис. 133).

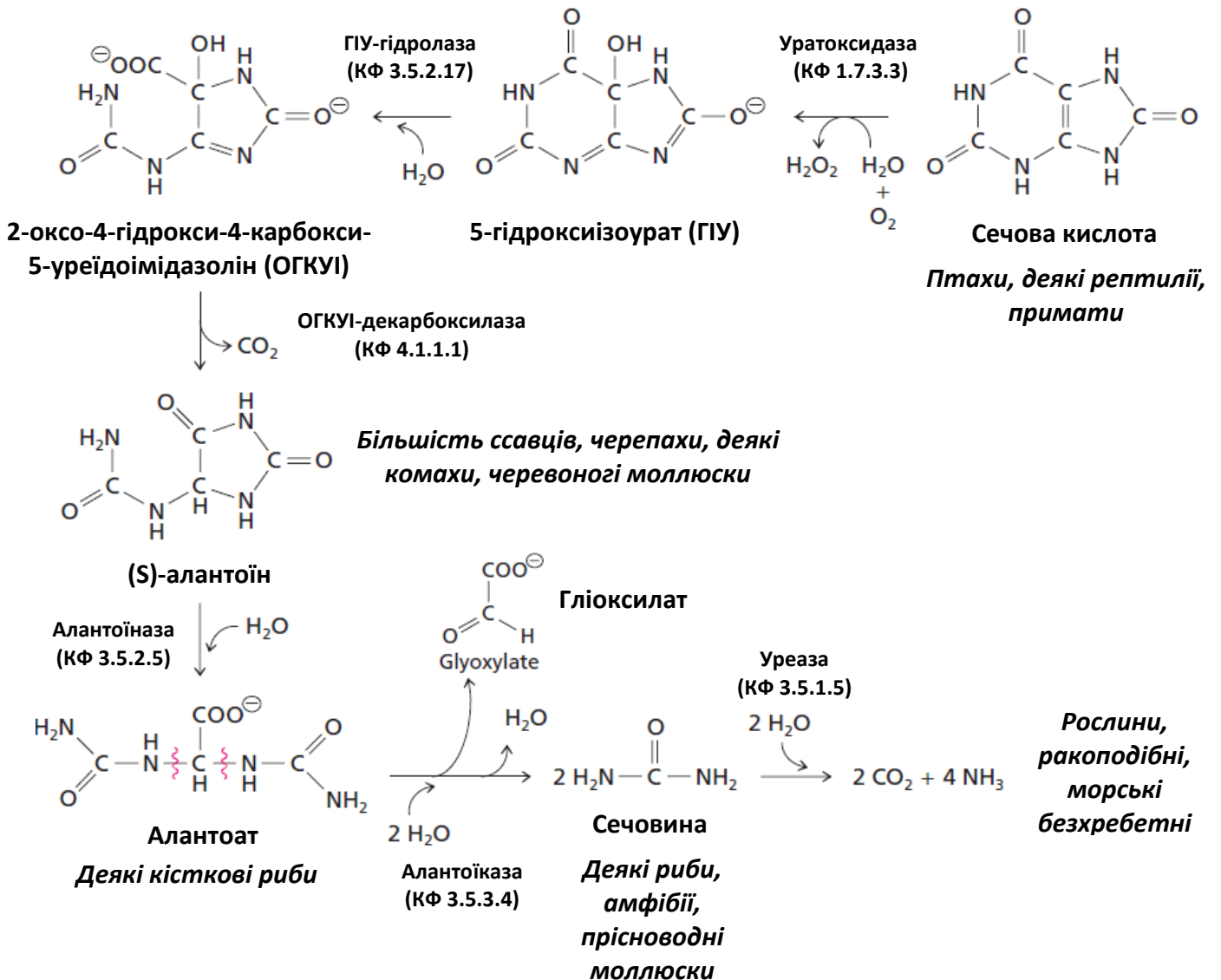


Рис. 133. Схема катаболізму сечової кислоти з вказанням кінцевих метаболітів обміну пуринів у різних організмів.

Як уже відмічалось, **алантоїн** є кінцевим продуктом пуринового катаболізму у більшості тварин, але **не у людей і приматів**, які виділяють **урат**. **Алантоїн** також

екскретується **черепахами, деякими комахами і черевоними моллюсками**. Фермент **алантоїназа** (КФ 3.5.2.5) каталізує гідролітичне розмикання імідазольного кільця **алантоїну** з утворенням **алантоату** – кон'югованої основи **алантоїнової кислоти** (рис. 133). Деякі з кісткових риб (телеостів) характеризуються активною **алантоїназою**, тому секретують **алантоат** у якості **кінцевого продукту метаболізму пуринових основ**. **Більшість риб, амфібії** та прісноводні моллюски мають ферменти, які гідролітично розщеплюють **алантоат** до молекули **гліюксилату** і двох молекул **сечовини**. Таким чином, кінцевим продуктом їх пуринового обміну є **сечовина**. Нарешті, декілька типів організмів, включаючи всі **рослини, ракоподібних та більшість морських безхребетних**, гідролізують **сечовину** до **вуглекислого газу та вільного аміаку** за рахунок активності **уреази** (КФ 3.5.1.5). Причому, **уреазу** знайдено лише у тих організмах, клітини яких захищені від токсичної дії **амонію**. Наприклад, у рослин **аміак**, утворений із **сечовини**, швидко включається в молекулу **глутаміну** завдяки дії **глутамінсинтетази** (КФ 6.3.1.2). **Морські тварини** мають механізми екскреції **амонію** на поверхню певних органів, наприклад, **жабр**, які контактують з водою і тому сприяють вимиванню **аміаку** до досягнення ним токсичних рівнів. У випадку наземних організмів, навіть така початкова концентрація призвела б до отруєння. Саме тому ферменти катаболізму **урату** були втрачені у процесі еволюції тварин, які екскретують **сечову кислоту**.

9.10. Особливості розщеплення піримідинів

Катаболізм піримідинових нуклеотидів починається з їх гідролізу до відповідних **нуклеозидів** та **неорганічного фосфату**, який каталізується **5'-нуклеотидазою**. Утворений таким чином **цитидин** дезамінується до **уридину** **цитидиндезаміназою** (КФ 3.5.4.5). Глікозидні зв'язки **уридину** та **тимідину** розщеплюються фосфоролітично за **участю уридинфосфорилази** (КФ 2.4.2.3) та **тимідинфосфорилази** (КФ 2.4.2.4) відповідно. **Дезоксиуридин** також може піддаватися фосфоролізу з боку **уридинфосфорилази**. Продуктами таких реакцій є **α -D-рибозо-1'-фосфат** або його **2'-дезокси-форма**, **тимін** та **урацил**.

Катаболізм піримідинів, на відміну від пуринового, закінчується інтермедіатами інших шляхів, тому визначених продуктів екскреції тут немає. Розщеплення як урацилу, отриманого з **цитозину**, так і **тиміну**, включає в себе декілька спільних стадій (рис. 134). Спершу піримідинове кільце відновлюється до **5,6-дигідропіримідину** у реакції, каталізованій **дигідроурацилдегідрогеназою** (КФ 1.3.1.1). Відновлене таким чином кільце надалі **гідролітично розмикається** за участі **дигідропіримідинази** (КФ 3.5.2.2). В результаті утворюється похідне **карбамойл- β -амінокислоти** – **β -уреїдопропіонат** у випадку **урацилу** або **β -уреїдоізобутират** у випадку **тиміну**.

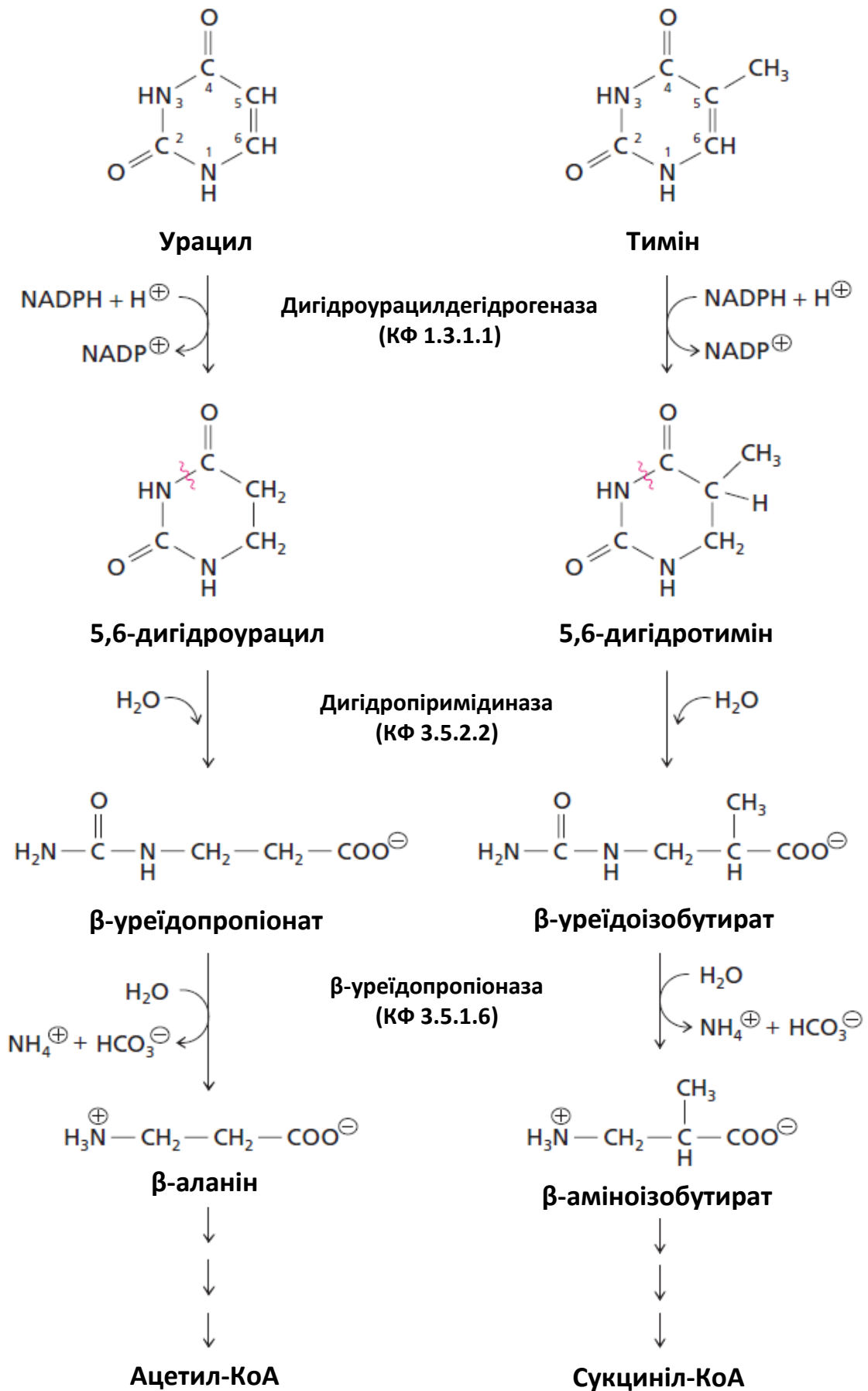


Рис. 134. Схема катаболізму урацилу та тиміну.

β -урейдопропіонат та **β -урейдоізобутират** надалі розщеплюються до **вільного аміаку**, оксиду **вугільної кислоти** та амінокислот **β -аланіну** та **β -аміноізобутирату** відповідно. І, нарешті, перший перетворюється на **ацетил-КоА**, а другий – на **сукциніл-КоА**. Обидва продукти можуть потрапляти до циклу Кребса, виконуючи анаплеротичну функцію, тобто, поповнюючи пули інтермедіатів цього шляху. У бактерій **β -аланін** також використовується у біосинтезі **пантотенової кислоти** – попередника **коензиму А**.

9.11. Патології, пов'язані з порушенням обміну нуклеотидів

Дефекти метаболізму нуклеотидів, особливо – пуринового ряду, можуть мати згубні наслідки. У 1964 році Майкл Лех та Уільям Найхен вперше описали прояви тяжкої метаболічної хвороби, що полягали у затримці розумового розвитку, спазматичних нападах та прагненні до самоспотворення. Пацієнти з цією хворобою, яка отримала назву **синдрому Леха-Найхена**, рідко доживали до дорослого віку. Біохімічними особливостями даного синдрому є екскреція **сечової кислоти** у кількостях, які принаймні в шість разів перевищують норму, а також підвищена швидкість біосинтезу пуринів. Як стало відомо дещо пізніше, хвороба Леха-Найхена спричиняється спадковою недостатністю ферментативної активності **гіпоксантин-/гуанінфосфорибозилтрансферази**. Така недостатність, як правило, характерна для чоловіків, оскільки мутації гену даного ферменту є рецесивними, а сам ген локалізований у Х-хромосомі. Пацієнти з цією хворобою мають менше 1% нормальної активності ферменту, а у деяких вона взагалі відсутня. За умови блокування активності **гіпоксантин-/гуанінфосфорибозилтрансферази** **гіпоксантин** та **гуанін** розщеплюються до **сечової кислоти** без реутилізації до **ІМФ** та **ГМФ** відповідно. **ФРПФ**, який у нормі використовується для такої реутилізації, йде на синтез додаткових кількостей **ІМФ**, який, у свою чергу, також катаболізує до урату. Досьогодні невідомо, як саме дефект одного лише ферменту спричиняє такий широкий спектр поведінкових симптомів. Тяжкі наслідки дисфункції вказують на те, що у деяких клітинах шлях реутилізації пуринів є не просто засобом збереження енергії, а, можливо, виконує й інші важливі функції.

Ще однією хворобою, пов'язаною з порушенням метаболізму пуринових нуклеотидів, є **подагра**, яка виникає внаслідок надлишкового утворення або порушення регуляції екскреції **урату**. Дана сполука, накопичуючись у формі відносно нерозчинної натрієвої солі (**рис. 135, А**), може кристалізуватися у м'яких тканинах, особливо, у нирках, а також у суглобах та пальцях ніг. Подагра має декілька причин, включаючи недостатність **гіпоксантин-/гуанінфосфорибозилтрансферази**, що призводить до зниженої реутилізації пуринів та збільшеної продукції **сечової кислоти**. Основною різницею між подагрою і вищезгаданим синдромом

Леха-Найхена є те, що у першому випадку активність цього ферменту складає до 10% нормальної. Подагра також може спричинятися **дисрегуляцією біосинтезу пуринів**.

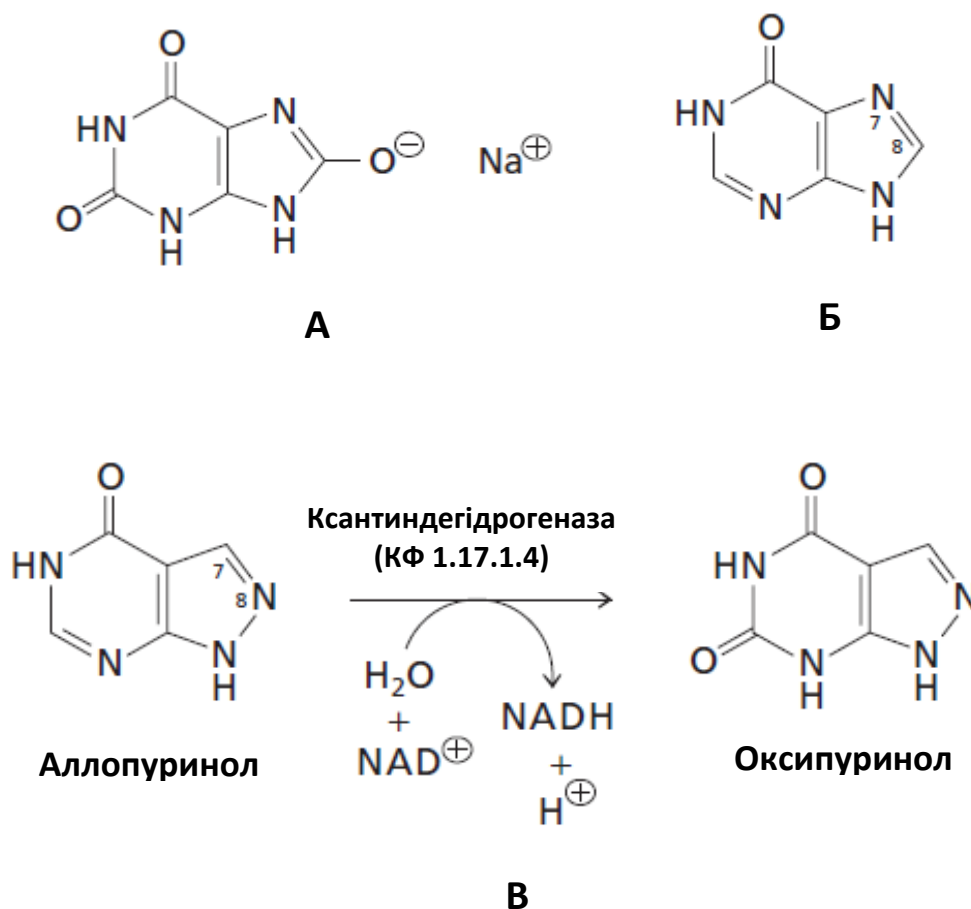


Рис. 135. Структура урату натрію (А) та гіпоксантину (Б), а також схема перетворення аллопуринолу на оксипуринол під дією ксантиндегідрогенази (В).

Лікування подагри можна провести за допомогою алопуринолу, який являє собою синтетичний ізомер **гіпоксантину** за позиціями положень С7 та N8 (рис. 135, Б). У клітинах **аллопуринол** перетворюється на оксипуринол (рис. 135, В), а останній є потужним інгібітором **ксантиноксидази**. Отже, введення **аллопуринолу** хворим на подагру попереджає підвищення рівнів **урату**. **Гіпоксантин** і **ксантин** є більш розчинними у воді, ніж **сечова кислота**, тому їх надлишки легко екскретуються, якщо вони не використовуються у реутилізаційних реакціях.

РОЗДІЛ 10. Реплікація ДНК

У даному розділі розглядаються механізми окремих стадій подвоєння генетичного матеріалу у вигляді ДНК у процесі її реплікації у порівняльному аспекті між прокаріотичними та еукаріотичними організмами. Також описуються особливості регуляції цих процесів.

10.1. Загальні відомості про реплікацію та її особливості

Реплікація – процес самоподвоєння ДНК, який забезпечує відтворення спадкової інформації та передачу її до дочірніх клітин при мітозі й мейозі. Реплікація, як і процеси **транскрипції та трансляції**, включає в себе **три основні стадії**:

- 1) **Ініціація реплікації,**
- 2) **Елонгація ланцюгів ДНК,**
- 3) **Термінація синтезу.**

Існує декілька **основних особливостей** реплікації. **По-перше**, синтез ДНК відбувається з використанням обох полінуклеотидних ланцюгів як матриць за так званим напівконсервативним механізмом. Після його завершення дві дочірні молекули-копії ДНК містять один материнський ланцюг, який слугував матрицею, і один ланцюг, синтезований *de novo*. **По-друге**, включення нуклеотидів до ланцюга ДНК, що синтезується, визначається матрицею за принципом комплементарності. **По-третє**, зростання ланцюга відбувається виключно в напрямку від 5'- до 3'-кінця, а ферментативне «зчитування» матриці – навпаки, тобто антипаралельно. **По-четверте**, субстратами реакції полімеризації за реплікації є 3'-термінальна гідроксильна група дезоксирибози зростаючого ланцюга, а також набір чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів. **Нарешті**, ферментом, що каталізує цю реакцію є **ДНК-залежна ДНК-полімераза DNAP (DNA-Polymerase, КФ 2.7.7.7)**.

Невеличка ділянка геному, з якої починається реплікація ДНК, називається **оріджином (origin, ori)**. На ній «збирається» реплісома, з неї ж починається розходження ланцюгів, тобто ця ділянка є сайтом подій першої фази, тобто, ініціації реплікації. Відомо також, що, внаслідок розходження ланцюгів ДНК під час реплікації за допомогою реплісоми утворюється так званий реплікативний «міхур», оточений з обох боків **реплікативними «вилками» (рис. 136)**. **Реплісомою** називають комплекс полімеразного та допоміжних ферментів, що обслуговують його **(рис. 137)**. Відповідно, **репліконом** називають ділянку ДНК, яка зазнає реплікації з однієї точки ініціації реплікації. У бактерій, як правило, існує один або декілька репліконів, еукаріоти ж мають полірепліконну будову геному.

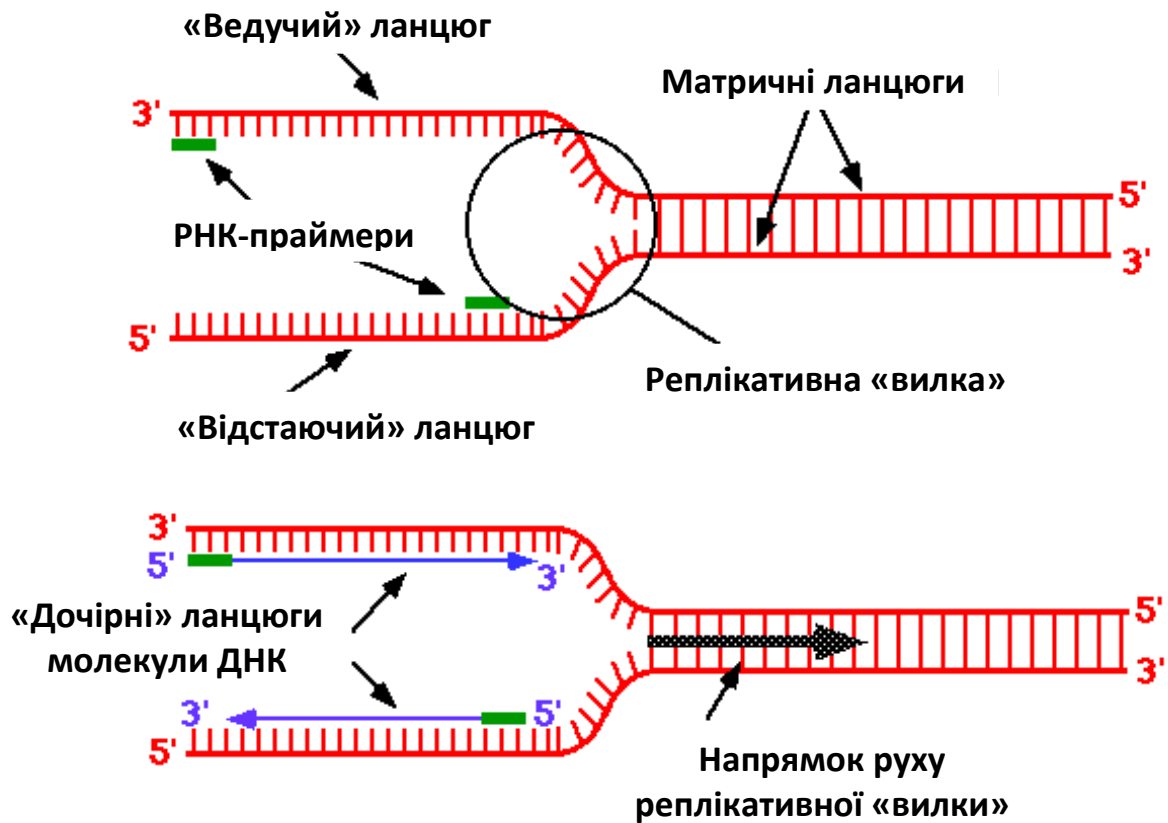


Рис. 136. Структура реплікативної «вилки».

Як видно з рис. 136, у кожній реплікативній «вилці» - дві молекули ДНК-полімерази, що здійснюють синтез двох полінуклеотидних ланцюгів.

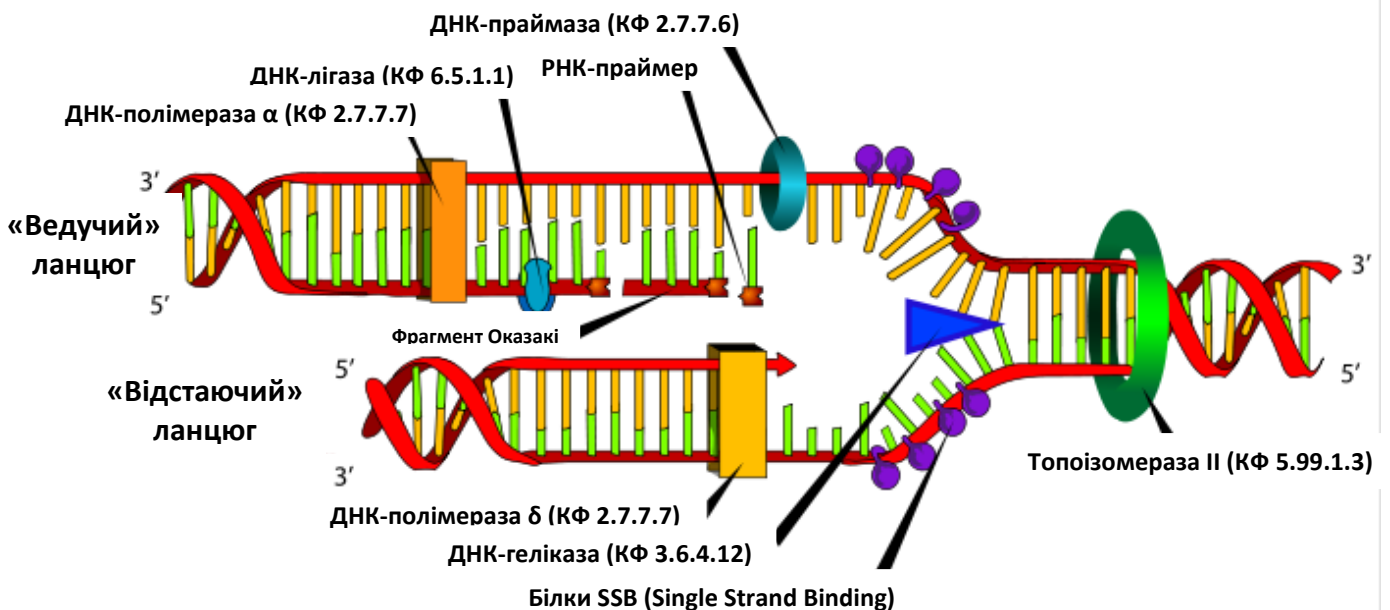


Рис. 137. Схема взаємної організації факторів реплісоми еукаріот.

Синтез ДНК відбувається лише у напрямку від 5'- до 3'-кінця, тому **один з ланцюгів, «ведучий»**, починаючи від *ori*, синтезується безперервно, синтез іншого періодично переривається у процесі поступового руху реплікативної вилки – це **«відстаючий» ланцюг (рис. 136 та 137)**. Через періодичне поновлення ініціації реплікації з використанням нових праймерів «відстаючий» ланцюг існує у вигляді так званих **фрагментів Оказаки**, які у бактерій мають довжину 1-2 тис пар основ. Згодом такі фрагменти поєднуються за допомогою **ДНК-полімерази та ДНК-лігази** (КФ 6.5.1.1). Підраховано, що **швидкість реплікації** з використанням однієї реплікативної «вилки» для прокариот становить **750 пар нуклеотидів за секунду. У еукаріот** через присутність нуклеосом такий показник **знижено до 60-90 парн нуклеотидів за секунду.**

10.2. ДНК-полімерази прокариот

Серед прокариотичних ДНК-залежних ДНК-полімераз виділяють такі **основні типи:**

- **ДНК-полімераза I (полімераза Корнберга)** – окрім полімеразної активності має також 3'- та 5'-екзонуклеазну, в чому є унікальною. Виконує допоміжні функції під час синтезу ДНК, наприклад, забудовує фрагменти Оказаки.
- **ДНК-полімераза II** – має полімеразну та 3'-екзонуклеазну активності, приймає участь у процесах репарації (див. розділ 8).
- **ДНК-полімераза III** – володіє полімеразною та 3'-екзонуклеазною активністю, є основною полімеразою, залученою до реплікації геному прокариот.

Встановлено, що так званий кор-фермент ДНК-полімерази III являє собою димерну структуру, яка складається з **трьох основних субодиниць:**

- 1) α – полімеразна,
- 2) ϵ – екзонуклеазна,
- 3) θ – структурна.

Варто відмітити, що функціонально-активна частина ДНК-полімерази Корнберга, який характеризується полімеразною та 3'-екзонуклеазною активністю, відома під назвою **фрагменту Кленова**. Також відомо, що активний центр ферменту існує в двох основних конформаціях – відкритій, яка передбачає рух полімерази вздовж матриці і швидкий підбір потрібних **нуклеотидтрифосфатів (НТФ)**, а також закритій, що потрібна для жорсткої фіксації нуклеотидів у активному центрі та забезпечує каталіз полімеразної реакції.

Механізм полімеразної реакції (рис. 138) є ідентичним для ДНК- та РНК-полімераз і складається з трьох стадій:

- 1) **Зв'язування субстрату у вигляді дезоксирибонуклеотидтрифосфатів – відбувається у** відповідності з принципом комплементарності, також забезпечується, правильна орієнтація нуклеотидів субстрату по відношенню до гідроксильної 3'-кінця ланцюга ДНК.
- 2) **Утворення фосфодієфірного зв'язку –** проходить за рахунок нуклеофільної атаки 3'-термінальної ОН-групи зростаючого ланцюга на α -фосфат чергового НТФ.
- 3) **Вивільнення пірофосфату та розщеплення неорганічною пірофосфатазою** - забезпечує незворотність процесу та енергію на його здійснення.

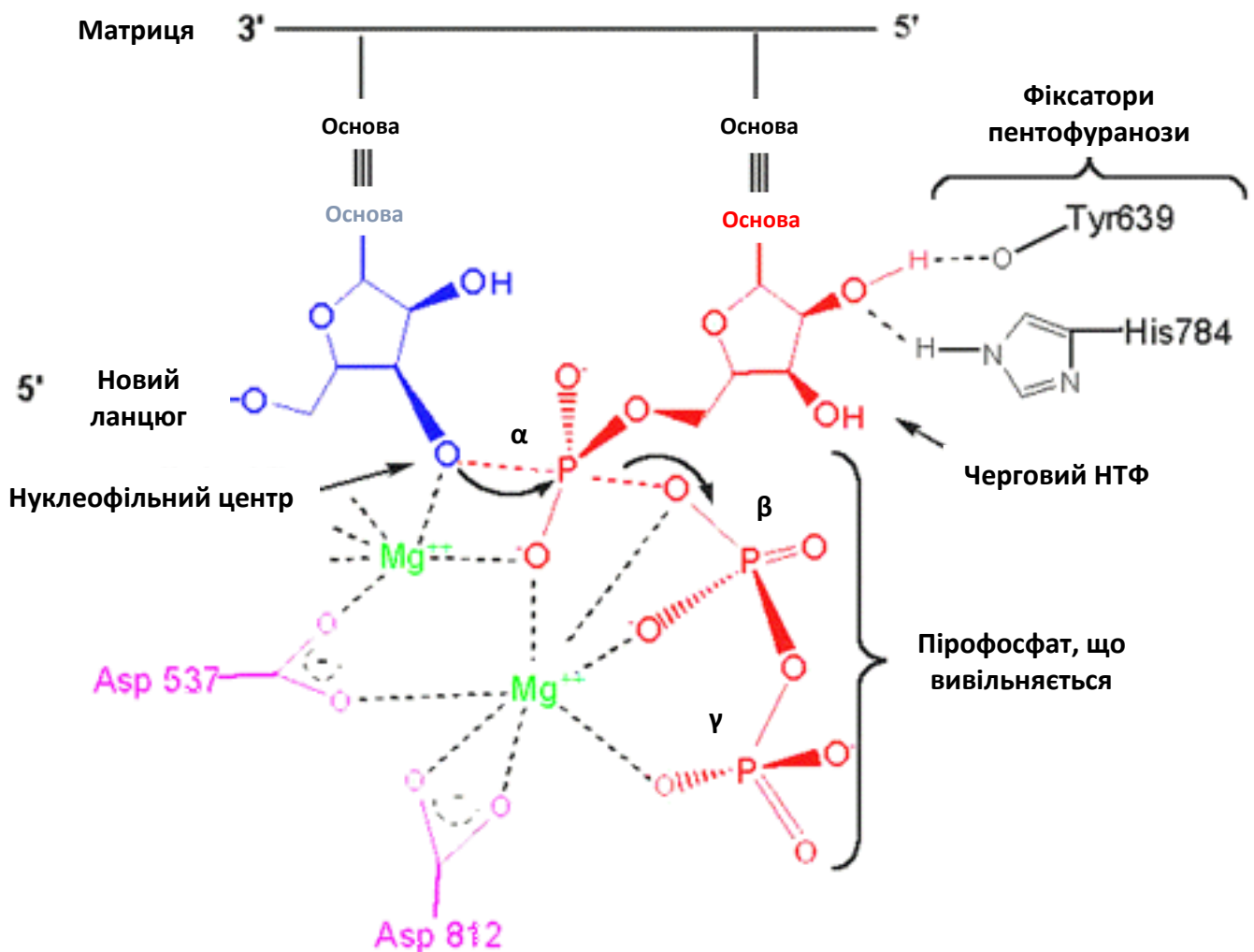


Рис. 138. Схема полімеразної реакції на прикладі РНК-полімерази.

Як уже відмічалось раніше, можливим є помилкове впізнавання та включення нуклеотидів, в основному, внаслідок переходу між мезомерними формами основ. У цьому випадку на 100000 пар основ виявляється одна «помилкова». Для боротьби з такими неточностями і потрібна 3'-екзонуклеазна активність ДНК-полімераз. Вона властива для виключно всіх прокариотичних полімераз, результатом її є негайне відщеплення «неправильного» нуклеотиду, а потім повторення інкорпорації іншого згідно принципу комплементарності. Таке явище отримало назву **проофрідінгу (proofreading)** і знижує ймовірність появи помилок до однієї на 1×10^8 пар основ.

10. 3. Еукаріотичні ДНК-полімерази

Насьогодні відомо цілу низку **класів еукаріотичних ДНК-полімераз**, серед них:

- **ДНК-полімераза α** – основна, складається з чотирьох субодиниць, які виконують три функції – ДНК-полімеразну, РНК-полімеразну (праймазну) та структурну. Праймер, синтезований цією полімеразою, має довжину від 6 до 10 рибонуклеотидів. Дана полімераза має відносно низьку процесивність (спорідненість до субстратів реакції), і, на відміну від прокариотичної ДНК-полімерази III, не має екзонуклеазної активності, тобто, не володіє проофрідінгом.
- **ДНК-полімераза β** – є мономерним ферментом, який приймає участь у ексцизійній репарації основ та нуклеотидів, в основному – системі короткої патч-репарації та системі репарації вертикальних «зшивок»/фотореактивації (див. розділ 8).
- **ДНК-полімераза γ** – реплікативна полімераза мітохондрій, має дві субодиниці, володіє екзонуклеазною активністю у обох напрямках, як і прокариотична ДНК-полімераза I.
- **ДНК-полімераза δ** – поряд з полімеразою α , є ще однією основною полімеразою реплікації геному еукаріот. Також складається з чотирьох субодиниць і може працювати у реплікативній вилці на обох ланцюгах та заповнювати фрагменти Оказакі. Не здатна синтезувати праймери, приймає участь у репарації ДНК (див. розділ 8).
- **ДНК-полімераза ϵ** – складається з 3-5 субодиниць. Функціонально майже не відрізняється від полімерази δ . Є єдиною полімеразою, яка може слугувати сенсором пошкоджень ДНК.
- **ДНК-полімерази низької точності (полімерази ζ , η , ι та κ)** – ферменти системи обхідної репарації, забезпечують реплікацію пошкоджених ділянок ДНК, на яких звичайні полімерази високої точності зупиняються (див. розділ 8). Існують для швидкої елімінації значних пошкоджень з метою подальшої репарації.

- **Міnorні ДНК-полімерази** – вузькоспецифічні, направлені на певну функцію: полімераза θ приймає участь у репарації міжланцюгових зшивок), полімераза λ відповідає за синтез ДНК під час гомологічної рекомбінаційної репарації, полімераза μ залучена до рекомбінації генів імуноглобулінів.

10. 4. Відмінності між ДНК- та РНК-полімеразами

Незважаючи на подібний механізм дії, існують певні **відмінності між ДНК- та РНК-полімеразами** (КФ 2.7.7.6).

По-перше, для ДНК-полімерази і матриця, і продукт синтезу хімічно ідентичні. Під час транскрипції у активному центрі РНК-полімерази тимчасово формується гібридна подвійна спіраль ДНК-РНК, тому фермент може легко «відрізнити» гібрид від звичайної подвійної спіралі ДНК.

По-друге, підвищена спорідненість оточення активного центру **РНК-полімерази** до гібриду та каналу виходу транскрипту до РНК забезпечує **високу процесивність ферменту**, тобто, здатність працювати без дисоціації після одного акту ініціації транскрипції. **ДНК-полімераза** як у оточенні свого активного центру, так і поза межами полімеразного комплексу контактує з подвійною спіраллю ДНК, тому існує велика ймовірність її дисоціації. Саме з цієї причини процесивність **ДНК-полімерази** є дуже низькою – фермент за один акт ініціації синтезує ланцюг лише у 10 - 20 нуклеотидів довжиною.

По-третє, висока спорідненість **РНК-полімерази** до гібрида ДНК-РНК дозволяє легко руйнувати подвійну спіраль ДНК по ходу руху полімерази. У ході цього транскрипт «витісняє» нематричний ланцюг ДНК з дуплексу. Для **ДНК-полімерази** такий механізм неможливий, оскільки, як уже відмічалось, дуплекси ДНК у комплексі з полімеразою та попереду і позаду від реплісоми нічим не відрізняються один від одного. У даних умовах **ДНК-полімераза** обов'язково потребує наявності одноланцюгової матричної ДНК, яка має бути вилучена з подвійної спіралі.

Нарешті, **ДНК-полімераза** здатна лише подовжувати або редагувати вже існуючу 3'-термінальну ділянку ланцюга ДНК, вона не може ініціювати синтез, тобто, створити перші декілька фосфодієфірних зв'язків. Тому існує потреба у початковій короткій ділянці з рибонуклеотидів, яку називають **праймером (primer)**. Праймер синтезується специфічною **ДНК-залежною РНК-полімеразою – праймазою** (КФ 2.7.7.6). Є декілька причин використання саме РНК для праймеру. Одна з них полягає у забезпеченні додаткової стадії регуляції точності синтезу, друга – у тому, що концентрація рибонуклеотидів у клітині, як правило, є вищою, ніж їх дезокси-форм, тому легше синтезувати РНК. Пізніше праймери вилучаються та проміжки і у прокариот

заповнюються відповідними дезоксирибонуклеотидами за допомогою **ДНК-полімерази I** та «зшиваються» **ДНК-лігазою** (КФ 6.5.1.1).

10. 5. Допоміжні фактори реплісоми прокариот

ДНК-геліказа або DnaB (КФ 3.6.4.12) – АТФ-залежний фермент, здійснює «розплітання» подвійної спіралі з утворенням реплікативної вилки (**рис. 137**). **Геліказа** також приймає участь також у транскрипції ДНК та сплайсингу. **У прокариот основною** реплікативною геліказою є кільцевий шестисубодиничний комплекс білків, який охоплює ДНК в місці розходження ланцюгів та каталізує їх «розплітання», що супроводжується гідролізом АТФ у шістьох активних центрах одного комплексу. Підраховано, що за **один акт гідролізу АТФ геліказа просувається вздовж ДНК на 3-5 нуклеотидів. Швидкість розходження ланцюгів ДНК з допомогою DnaB становить 35 пар основ на секунду**, тому геліказа трохи уповільнює рух **ДНК-полімерази** під час реплікації.

Білки SSB (Single Strand Binding) – являють собою фактори, які мають високу спорідненість до утворених геліказою одноланцюгових ділянок матриці ДНК, та, з разунк тимчасового приєднання до останніх, стабілізують хелікс у «розплетеному» вигляді, забезпечуючи існування та форму реплікативних «вилок» та «мішура».

Праймаза або DnaG (КФ 2.7.76) – фермент, який здійснює синтез РНК-праймерів довжиною 10-12 нуклеотидів для активації **ДНК-полімерази**. Разом з **геліказою** формує праймасому. Відомо, що активність праймази регулюється **геліказою** та **SSB**.

ДНК-лігаза (КФ 6.5.1.1) – АТФ-залежний фермент, функція якого полягає у «зшиванні» розривів у «відстаючому» ланцюзі ДНК (**рис. 139**) після заповнення проміжків між фрагментами Оказакі за допомогою **ДНК-полімерази I**.

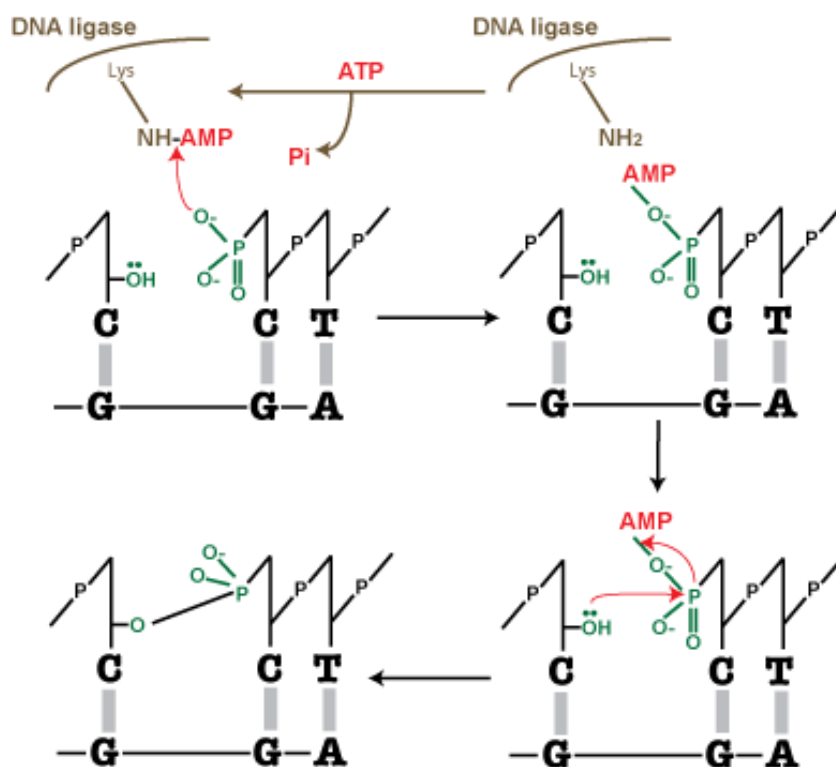


Рис. 139. Схема реакції, каталізованої ДНК-лігазою. DNA-ligase – ДНК-лігаза.

ДНК-топоізомерази класу I (КФ 5.99.1.2), II (КФ 5.99.1.3), III (КФ 5.99.1.4) та IV (5.99.1.5) – топологічні ферменти, основна функція яких полягає у релаксації надспіралізованої ДНК перед реплікацією. Таким чином, топоізомерази за рахунок формування одностанцюгових та двостанцюгових розривів регулюють частоту позитивних та негативних супервитків, тобто або підвищують, або знижують ступінь надспіралізації ДНК. У прокаріот таку функцію зняття надспіралізації виконує лише топоізомераза II, яку ще називають гіразою, оскільки топоізомераза I не здатна елімінувати позитивну надспіралізацію. Гіраза збільшує негативну надспіралізацію, а, отже зменшує позитивну. У еукаріот функцію елімінації надспіралізації може виконувати як топоізомераза I, так і II. Ще однією функцією ДНК-топоізомерази є позбавлення від так званих катенанів, які є топологічно «зчепленими» між собою кільцевими молекулами ДНК (рис. 140, А).

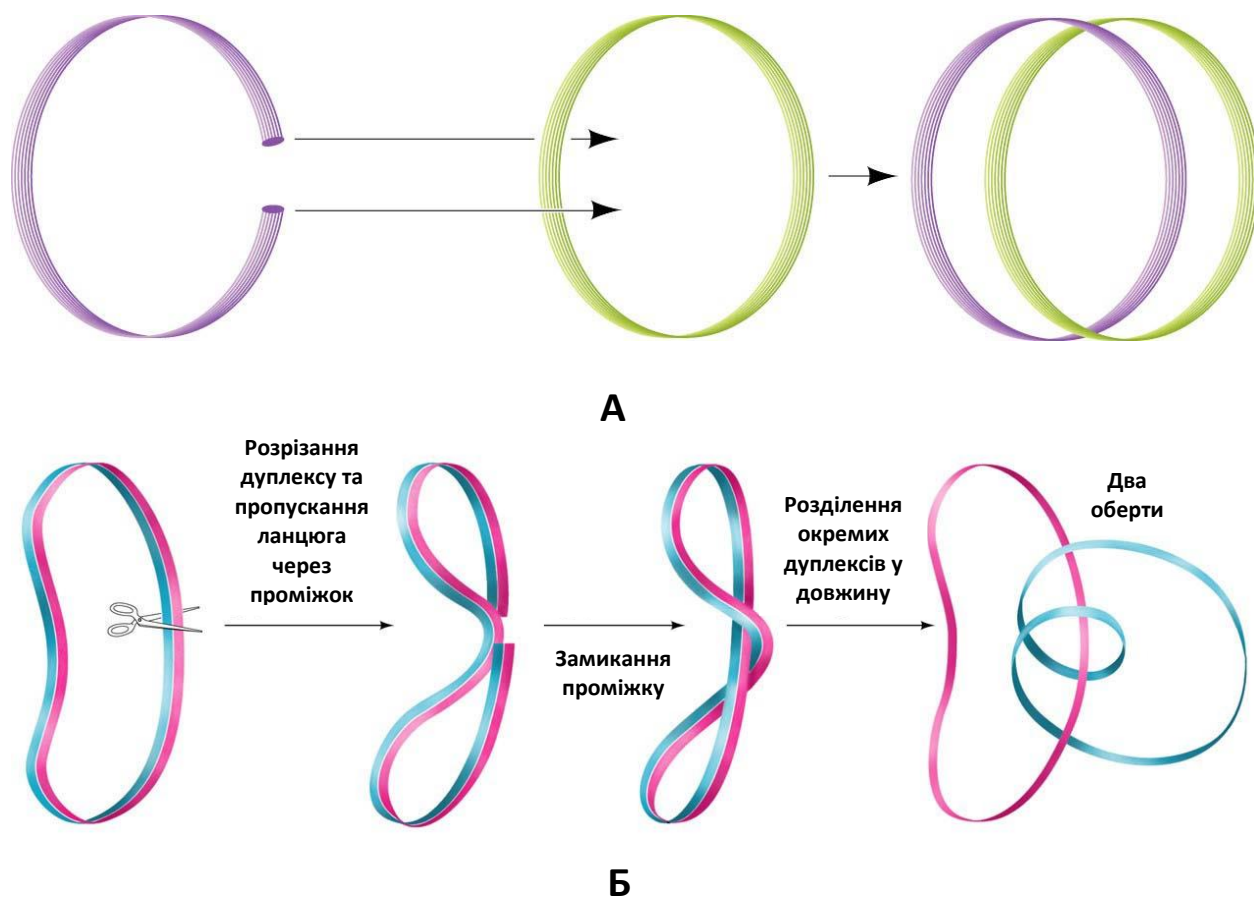


Рис. 140. Утворення катенанів та механізм декатенації.

Катенани утворюються внаслідок «перекручування» «дочірніх» ланцюгів у процесі реплікації. **Декатенація** відбувається з утворенням тимчасового дволанцюгового розрізу у ДНК за допомогою **топоізомераз** (рис. 140, Б), причому у **прокаріот** цю функцію виконує **фермент класу IV**, а у **еукаріот** - **класу II**.

10.6. Структура голоферменту ДНК-полімерази III прокаріот

Структура голоферменту основної ДНК-полімерази прокаріот (рис. 141) складається з наступних частин:

- **Димер** вже згаданого **кор-ферменту ДНК-полімерази III**, який має по три субодиниці - α , ϵ та θ , і здійснює полімеразну (α) та екзонуклеазну (ϵ) реакції.
- **Дві β -субодиниці** - по одній на кожен мономер **полімерази III**. Формують так зване «ковзаюче кільце» - тороїд або «обруч» діаметром 3,5 нм, який охоплює спіраль ДНК, але практично не взаємодіє з нею. **β -субодиниці** відповідають за загальну процесивність ферменту.
- **Дві τ -субодиниці** – виконують структурну роль завдяки численним взаємодіям з кор-ферментом, «ковзаючим кільцем», геліказою, праймазою

та γ -комплексом. Також забезпечують функціональну координацію компонентів голоферменту.

- **γ -комплекс** - складається з п'яти субодиниць та має U-подібну структуру. Виконує функцію впізнавання гібридного дуплексу матриці ДНК з РНК-праймером, а також АТФ-залежне «завантаження» «кільця» β -субодиниць на ДНК, а також його дисоціацію, що відбуваються за рахунок циклів АТФ-залежного замикання та розмикання «ковзаючого кільця» навколо ДНК.

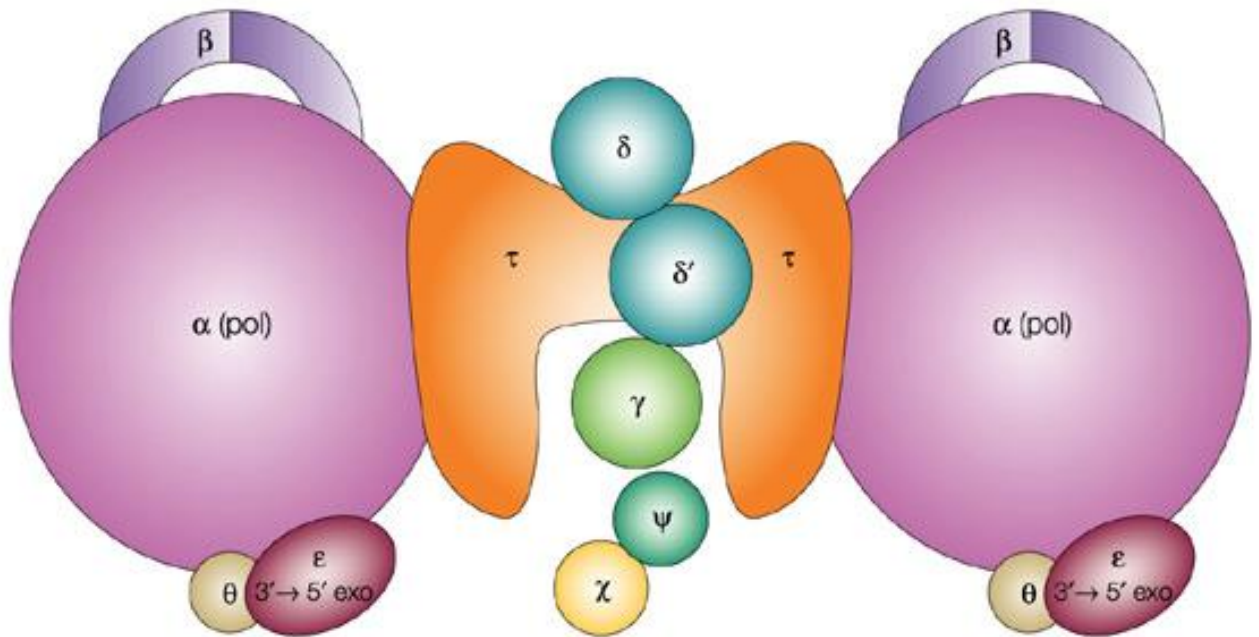


Рис. 141. Схема організації субодиниць голоферменту ДНК-полімерази III.

10.7. Механізм реплікації прокариотичної ДНК

Механізм реплікації ДНК прокариот зручно розглядати на прикладі **подвоєння кільцевої хромосоми *E. coli***. Спершу гіраза «знімає» позитивні супервитки, збільшуючи негативну надспіралізацію, яка сприяє розкручуванню хелікса. Це призводить до дестабілізації подвійну спіраль поблизу *ori* та створює умови для її подальшого «розплетення». Відомо, що ділянка ***oriC*** прокариот має у середньому **245 пар основ** у довжину, з них виділяють **чотири сайти по 9 пар основ кожен**, які споріднені до білку **DnaA**, а також декілька **АТ-збагачених сайтів по 13 пар основ**, які сприяють дестабілізації спіралі. Кілька копій комплексу **DnaA – АТФ** зв'язуються з ***ori*** та індукують АТФ-залежне локальне плавлення подвійної спіралі. Після цього фактор **DnaC** «завантажує» на одноланцюгові ділянки **геліказу DnaB**. Геліказа, у свою чергу,

залучає до реплікативного комплексу **праймазу DnaG** та інші фактори. **DnaG** здійснює синтез **праймерів по 10-12 рибонуклеотидів** спочатку на «ведучому», а трохи згодом і на «відстаючому» ланцюгах. Після синтезу праймера вона замінюється на **ДНК-полімеразу III**.

Залучення **ДНК-полімерази** відмічає **перехід від ініціації реплікації до власне циклу елонгації** – утворені реплікативні «вилки» розходяться у протилежних напрямках за геліказою. Причому остання рухається саме по «відстаючому» ланцюгу, щоб вчасно залучати праймазу для синтезу нових праймерів.

На **рис. 142** представлено організацію типової прокариотичної реплісоми.

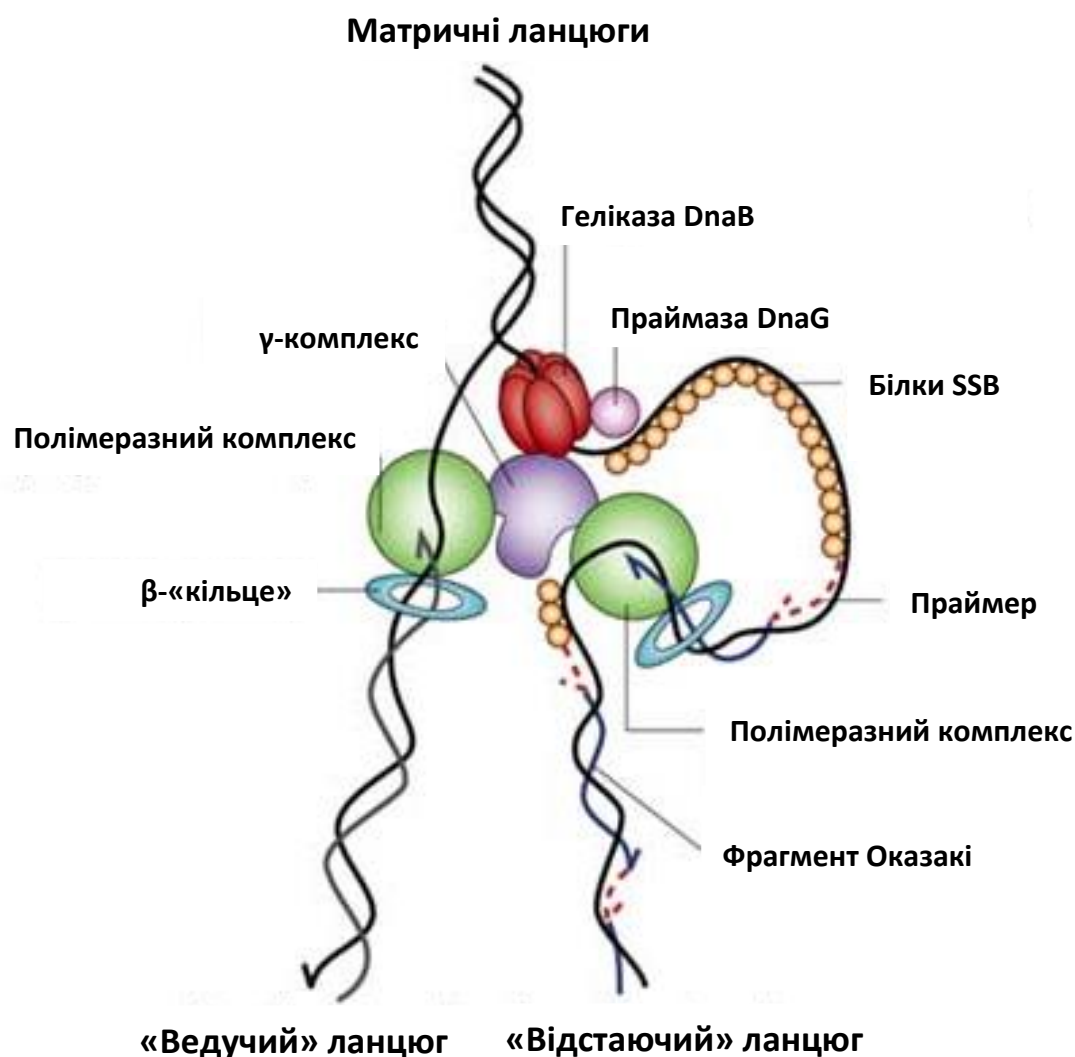


Рис. 142. Схема будови реплісомного комплексу прокариот.

Перехід від елонгації до термінації реплікації забезпечується спеціальним сайтом термінації, який являє собою **шість ділянок - Ter A, B, C, D, E та F - по 22 пари основ в кожній**. Ці регіони розташовані на діаметрально протилежному до **oriC** боці

кільцевої хромосоми. Відомо, що дані сайти є спорідненими до спеціального білку **Tus**. Термінація відбувається лише тоді, коли реплікативна «вилка» зупиняється на такому сайті у комплексі з даним білком. Нарешті, після зупинки реплісоми відбувається локальне плавлення ДНК у межах комплексу, заповнення проміжків між фрагментами Оказакі та **декатенація** за допомогою **ДНК-топоізомерази IV**.

10.8. Особливості реплікації ДНК еукаріот

На **рис. 143** представлено схему **будови реплісомного комплексу** еукаріотичних організмів.

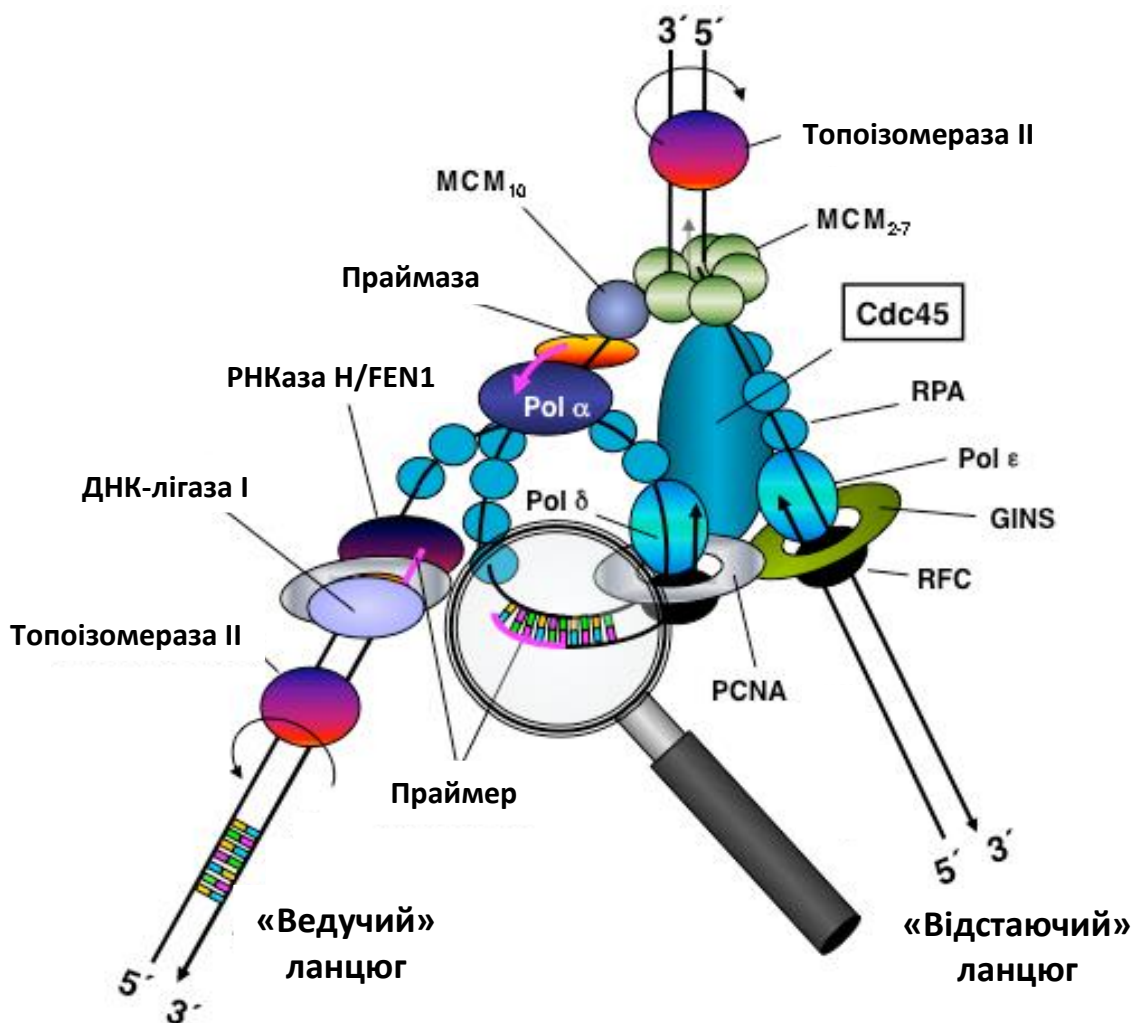


Рис. 143. Компоненти реплісоми еукаріот.

У випадку **еукаріот** існує **декілька особливостей**, що відрізняють механізм реплікації ДНК від прокаріотичного:

- Роль «ковзаючого кільця» у цьому випадку виконується фактором **PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)**, який є комплексом з трьох субодиниць.
- **Фрагменти Оказакі** у еукаріот у довжину складаються з **200-400 пар основ**, тобто є коротшими від прокаріотичних.
- Функціональним аналогом прокаріотичних **τ -білків** та **γ -комплексу** прокаріот у еукаріот виступає мультисубодиничний білковий комплекс **RF-C (Replication Factor C)**.
- Аналогом **реплікативної гелікази DnaB** є еукаріотичний гексамерний білок **MCM (Mini Chromosome Maintenance)**, а замість білків **SSB** діють еукаріотичні білки **RPA (Replication Protein A)**.

10.9. Ініціація та проходження реплікації у еукаріот

Як уже згадувалося, хромосоми еукаріот є **мультирепліконними структурами**. Так, підраховано, що на геном у ссавців припадає близько 40000 точок *ori*. Розміри типового реплікона коливаються від 50 до 200 тис. пар основ, причому серед їх спільних елементів можна відмітити лише АТ-шляхи. Загалом вважається, що один петельний домен (див. **розділ 7**) відповідає одному реплікону, а *ori* знаходиться у регіоні, наближеному до сайту прикріплення цих доменів до ламін у складі ядерного матриксу.

За ініціацію механізму реплікації ДНК еукаріот (рис. 144) відповідає комплекс **ORC (Origin Recognition Complex)**, який впізнає місце локалізації *ori* та зв'язується з ним, здійснюючи таким чином початковий етап ініціації реплікації.

Після приєднання ORC з ним зв'язуються фактори регуляції клітинного циклу **CDC6 та CDC45 (Cell Division Cycle)**, попередньо фосфорильовані **циклін-залежними кінзами CDK (Cyclin Dependent Kinases)**, два симетричні гексамери **MCM10**, а також фактори реплікації **CDT1 (CDC-Dependent Transcript), GINS1 та GINS2, SLD2 та SLD3, DPB11**.

Далі відбувається локальне плавлення спіралі ДНК, причому **MCM та CDC45** у подальшому розміщуються у основах реплікативних «вилок». Одноланцюгові ділянки ДНК зв'язуються і стабілізуються факторами **RPA**. Далі **CDC45** залучає до процесу **ДНК-полімеразу α** , яка починає синтез праймера спочатку на «ведучому», а потім і на «відстаючому» ланцюгах. Потім з основою реплікативної «вилки» зв'язується **фактор RF-C**, який здійснює енергозалежне «завантаження» «ковзаючого кільця» **PCNA** на ланцюг ДНК.

Після «завантаження» **PCNA** на ДНК відбувається так зване «перемикання» полімераз – **ДНК-полімераза α** замінюється на **ДНК-полімеразу δ або ϵ** , в той час як перша переміщується на «відстаючий» ланцюг для періодичного синтезу РНК-

праймерів. У ході всього процесу реплікації гексамерна **геліказа MCM** контролює розходження ланцюгів ДНК.

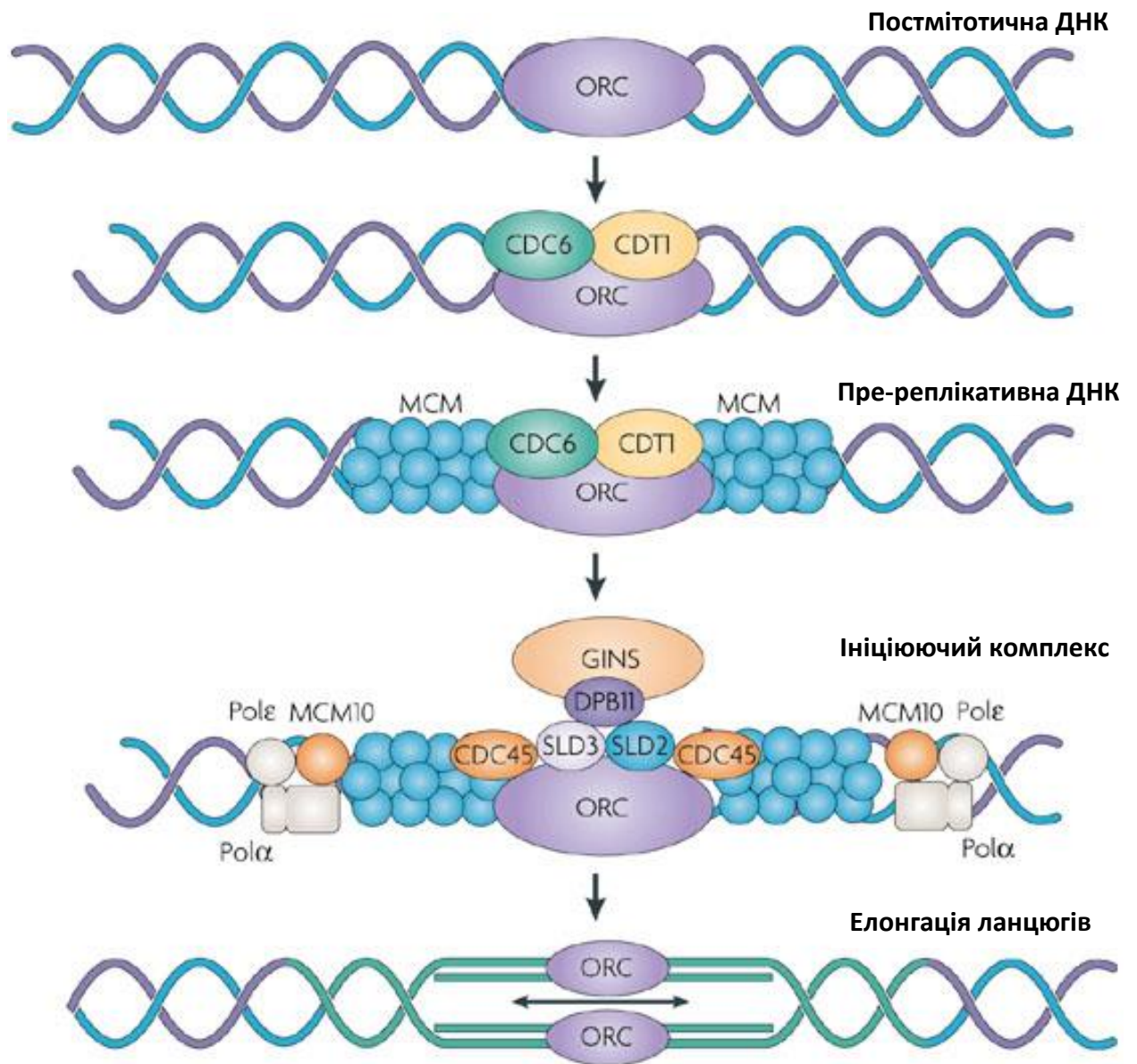


Рис. 144. Схема ініціації реплікації геному еукаріот (пояснення у тексті).

РОЗДІЛ 11. Механізми транскрипції

У даному розділі описано сучасні відомості щодо проходження синтезу РНК на матриці ДНК – процесу транскрипції, та фактори які приймають участь у його регуляції. Транскрипція розглядається у порівняльному аспекті між про- та еукаротичними організмами.

11.1. Основні особливості транскрипції

Транскрипція – це процес синтезу РНК з використанням одного з ланцюгів ДНК у якості матриці, тобто «копіювання» послідовності нуклеотидів ДНК у послідовність рибонуклеотидів. **Основними особливостями транскрипції** є наступні. По-перше, у якості матриці використовується лише один ланцюг, який називають **матричним**, інший має назву **кодуючого**, оскільки за послідовністю є ідентичним до синтезованої РНК. **По-друге**, зростання ланцюга РНК відбувається виключно в напрямку від 5' до 3'-кінця, в той час як «зчитування» матриці ДНК – навпаки, тобто **антипаралельно**. **По-третє**, субстратами реакції є 3'-термінальний гідроксил рибози зростаючого ланцюга та набір з чотирьох основних рибонуклеозидтрифосфатів. **По-четверте**, включення рибонуклеотидів до ланцюга РНК, що синтезується, визначається матрицею ДНК за принципом комплементарності. **І, нарешті**, ферментом, який каталізує реакцію полімеризації рибонуклеотидів є **ДНК-залежна РНК-полімераза RNAP (RNA polymerase, КФ 2.7.7.6)**. Точка початку транскрипції, яка одночасно є сайтом збирання транскрипційного комплексу, називається **промотором (promoter)**, а точка завершення – **термінатором**. Ділянка між промотором і термінатором носить назву **транскриптон**. Відповідно синтезована молекула РНК називається **транскриптом**. Загальна схема процесу транскрипції представлена на **рис 145**.

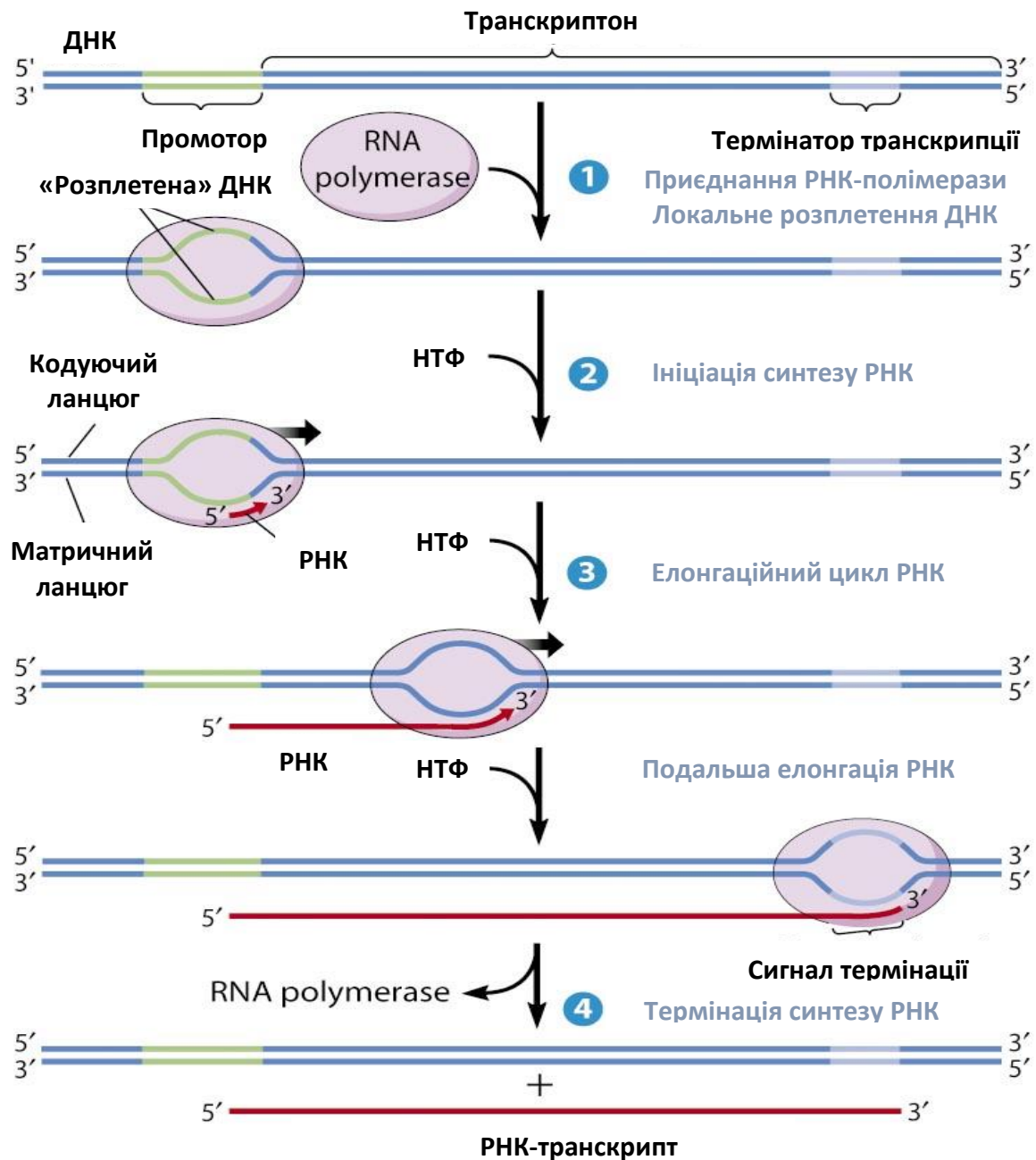


Рис. 145. Загальна схема механізму транскрипції ДНК.

11.2. Будова РНК-полімерази прокариот

Прокаріотична РНК-полімераза (рис. 146) є великим мультисубодиничним ензимом вагою більше 400 кДа. Його кор-фермент складається з наступних частин:

- **Дві субодиниці α** - виконують структурну роль, взаємодіючи між собою і утримуючи разом інші субодиниці ферменту.
- **Субодиниці β та β'** - формують характерні «щелепи», у щілині між якими з ферментом взаємодіє ДНК. «Щелепи» є рухливими елементами, які

здатні «замикатися» або «розмикатися» під час каталітичного циклу **РНК-полімерази**. Глибоко в щілині між «щелепами» розташований активний центр ферменту, що складається з трьох залишків **аспартату**, у тому числі й **Asp537 та Asp812**, як знаходяться у складі **β' -субодиниці**. Ці залишки утримують ключовий для каталізу іон **Mg²⁺** (рис. 138).

- **Субодиниця ω** – її роль поки що невідома.

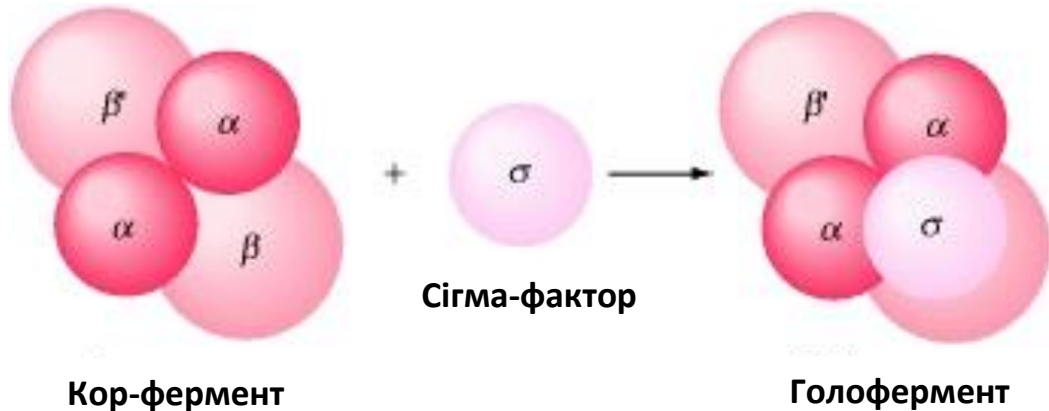


Рис. 146. Схема організації субодиниць прокаріотичної РНК-полімерази.

Голофермент РНК полімерази складається з **кор-ферменту** та ще однієї субодиниці – **σ (сігма-фактора)**. Вважається, що вона виконує роль **загального фактора ініціації транскрипції**. Відомо, що **σ -субодиниця** має мультидоменну структуру і виконує низку важливих функцій. Так, вона взаємодіє з обома субодиницями **β і β'** , чим контролює певне положення щелеп, а також має зв'язки з активним центром і його мікрооточенням. До того ж, **сігма-фактор** розпізнає послідовність промотора, а також взаємодіє з первинним каналом виходу РНК, блокуючи його. Дисоціація цього фактора є необхідною для виходу синтезованої РНК, а, отже, і для вільного руху полімерази вздовж матриці під час елонгації. Існує також вторинний канал, через який відбувається постачання реакції субстратними НТФ.

Промотори, як точки початку транскрипції на матриці ДНК, можна **на основі спорідненості до голоферменту РНК-полімерази** розділити на **дві категорії**: у **сильних промоторів** вона висока, а у **слабких** - низька. Останні, окрім сігма-фактора, впізнаються за допомогою додаткових білкових ефекторів.

11.3. Робочий цикл РНК-полімерази

Як і випадку ДНК-полімерази та біосинтезу білку, **функціонування РНК-полімерази** складається з **трьох основних стадій** (рис. 145).

Ініціація транскрипції – починається зі зв'язування голоферменту з промотором та формування **«закритого» комплексу**, у складі якого ДНК зберігає форму подвійної спіралі. Далі відбувається **локальне плавлення хеліксу** з утворенням **«відкритого» комплексу** та розходженням ланцюгів ДНК, яке дозволяє використовувати один з них як матрицю. Потім йде **включення перших двох нуклеотидів** до молекули РНК – синтез першого фосфодієфірного зв'язку в активному центрі полімерази. Ця стадія процесу транскрипції є найповільнішою, а, отже, лімітуючою. Після цього ініціюється **синтез короткого первинного транскрипту** довжиною 8-9 нуклеотидів. У цей період можливою є так звана **абортивна ініціація**, тобто, дисоціація цього транскрипту, тобто що є ознакою невдалої ініціації. Нарешті, якщо ініціація все ж вдалася, проходить **«очищення» промотора**, тобто, від'єднання σ -фактора від голоферменту. Така подія є визначальною ознакою для переходу від ініціації до елонгації транскрипції.

Елонгація транскрипції або елонгаційний цикл – під час її проходження відбувається **періодичне приєднання чергового нуклеотиду до 3'-кінця РНК** у активному центрі РНК-полімерази, синхронізоване з поступовим **переміщенням кор-ферменту на один нуклеотид** уздовж матриці до її 5'-термінальної ділянки – так звана **транслокація**.

Термінація транскрипції – відбувається після розпізнавання РНК-полімеразою **сигналу термінації** у вигляді спеціального елемента послідовності, що супроводжується вивільненням новосинтезованого транскрипту у середовище. У подальшому відбувається повторна взаємодія кор-ферменту з σ -субодиницею для здійснення **пошуку нового промотора** і залучення РНК-полімерази до синтезу РНК.

11.4. Еукаріотичні РНК-полімерази

У клітинах еукаріот існує **три типи ДНК-залежних РНК-полімераз**:

- **РНК-полімераза I** – здійснює транскрипцію генів **рибосомальної РНК** з утворенням **18S, 28S та 5,8S рРНК**.
- **РНК-полімераза II** – синтезує **мРНК**, а також **маленькі ядерні РНК** та інші види **нетрансльованих РНК**.
- **РНК-полімераза III** – відповідає за синтез **тРНК, 5S рРНК** і інших **низькомолекулярних форм РНК**.

Незалежно від типу, всі РНК-полімерази еукаріот мають подібний **план будови**:

- 1) **Чотири корові субодиниці**, які функціонально відповідають **двом α** , а також **β і β' субодиницям РНК-полімерази** прокаріот.
- 2) **П'ять звичайних субодиниць**, спільних для всіх трьох ферментів.
- 3) **Унікальні набори ензимо-специфічних субодиниць** у кількості **п'яти, чотирьох та семи** для РНК-полімераз I, II та III відповідно (**рис. 147**).

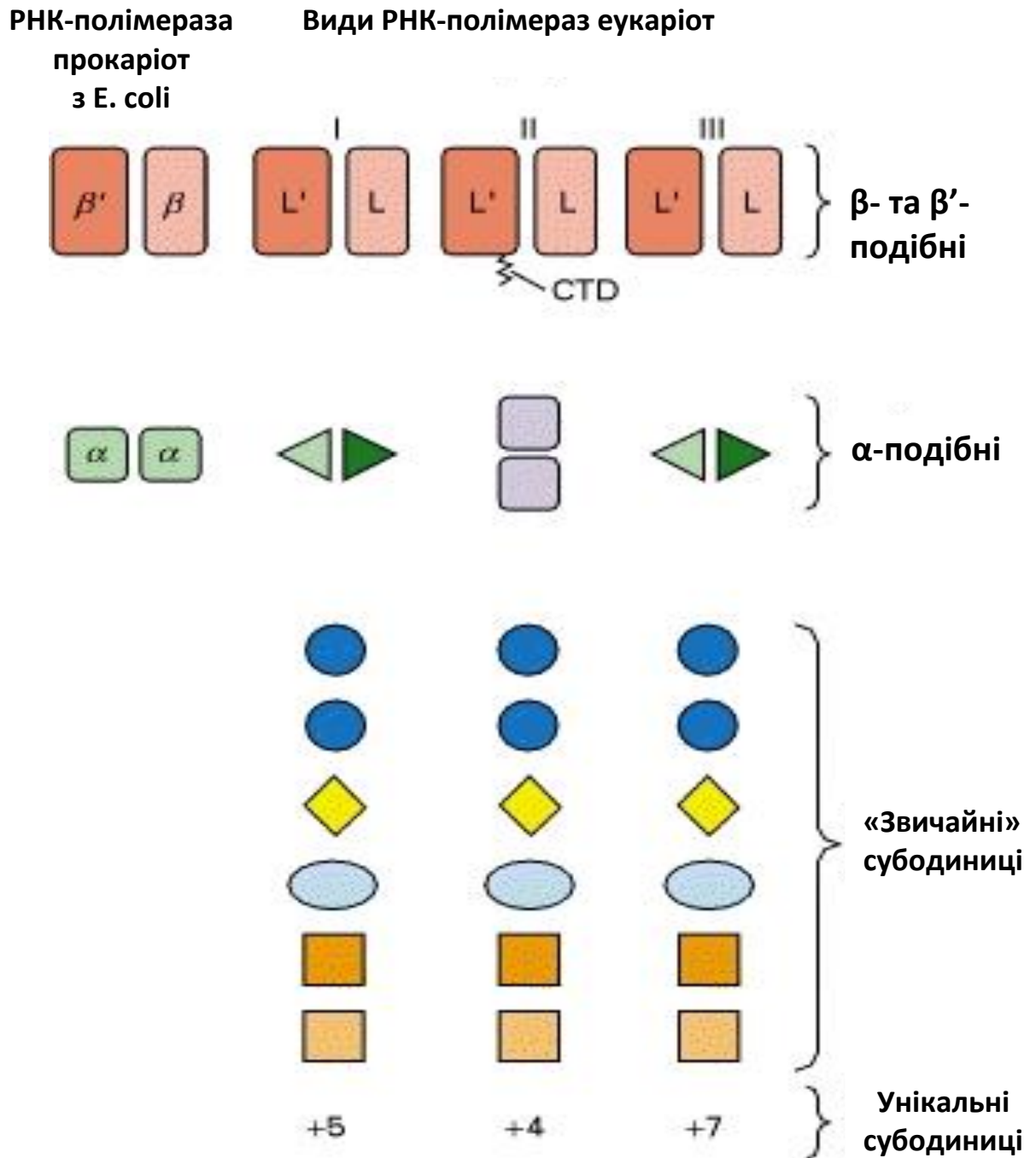


Рис. 147. Порівняльна схема організації субодиниць прокаріотичних та еукаріотичних РНК-полімераз.

Загальна структура та механізм дії еукаріотичних полімераз теж **подібні** до ферментів, характерних для **прокаріот**. Зокрема, наявні **характерні «щелепи»** для фіксації на матриці ДНК, **первинний та вторинний канали для виходу РНК та входу субстратних рибонуклеотидтрифосфатів** відповідно. Також спостерігається

гомологія внутрішніх поверхонь «щілини», ділянок активного центру, і, як уже відмічалось, **ідентичність механізму каталізу полімеризації (рис. 138).**

11.5. Еукаріотична РНК-полімераза II

Основна РНК-полімераза еукаріот складається з 14 субодиниць. В межах найбільшої з них - **гомологу субодиниці β'** прокаріотичної полімерази – знаходиться активний центр ферменту. Відомо, що під час елонгації за умови нестабільності 3'-термінальної ділянки РНК-ДНК гібрида або внаслідок помилок транскрипції, так само, як і у випадку РНК-полімерази прокаріот, можливий **зворотний рух полімерази** з виходом 3'-кінця транскрипту у вторинний канал. Індукція нуклеазної активності для редагування послідовності синтезованої РНК відбувається за рахунок взаємодії з **фактором транскрипції TFIIIS**, який є аналогом факторів **GreA та GreB** прокаріот.

Встановлено, що у складі найбільшої субодиниці РНК-полімерази присутній **С-термінальний домен CTD (C Terminal Domain)**. Цей домен існує у вигляді довгого поліпептидного ланцюга невпорядкованої будови. Амінокислотна послідовність CTD являє собою **гептапептид Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser**, що тандемно повторюється **52 рази**. **Три залишки Ser** у складі гептапептиду є субстратами фосфорилування та дефосфорилування для специфічних кіназ і фосфатаз відповідно. Відомо, що CTD має численні сайти зв'язування регуляторних білків, спорідненість до яких залежить від типу фосфорилування домену (**рис. 148**). CTD відіграє ключову роль у **перемиканні між ініціацією та елонгацією транскрипції та у «збиранні» елементів системи процесингу мРНК** під час елонгації.

Нарешті, відомо, що голофермент РНК-полімерази II на етапі ініціації транскрипції входить у так званий **преініціаторний комплекс PIC (Preinitiation Complex)**, який **«збирається» на промоторі** і містить низку базальних факторів транскрипції (**рис. 149**), серед яких можна відмітити:

- **TFIIA,**
- **TFIIB,**
- **TFIID,**
- **TFIIE,**
- **TFIIF,**
- **TFIIN.**

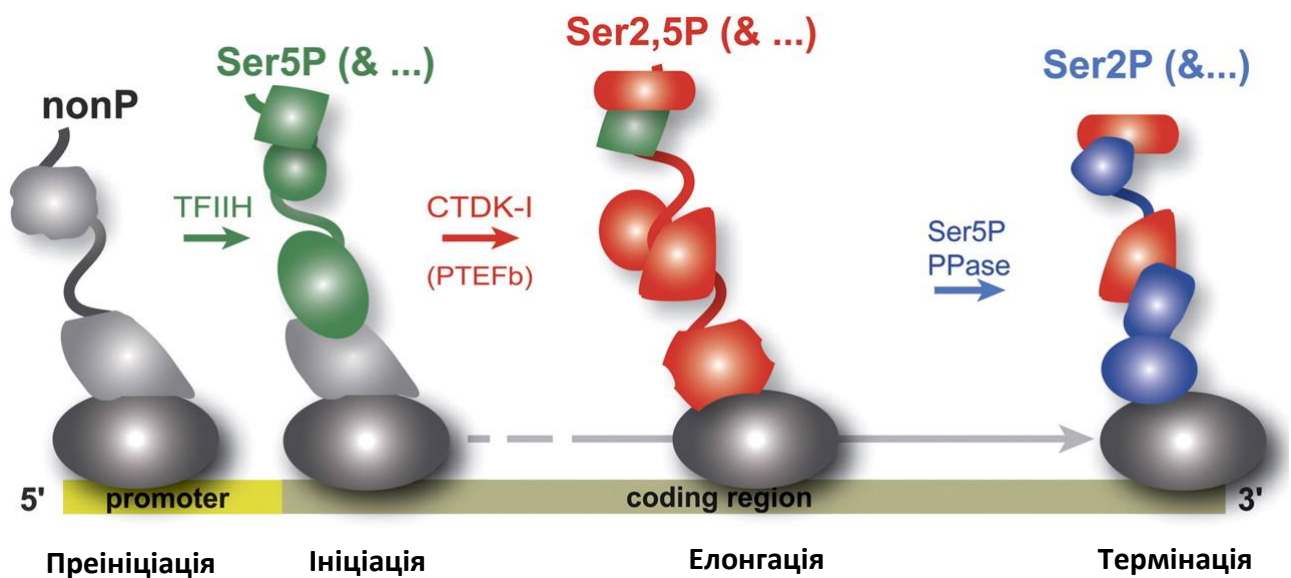


Рис. 148. Схема «перемикання» функціонального стану РНК-полімерази II в залежності від виду фосфорилування СТД на різних стадіях транскрипції.

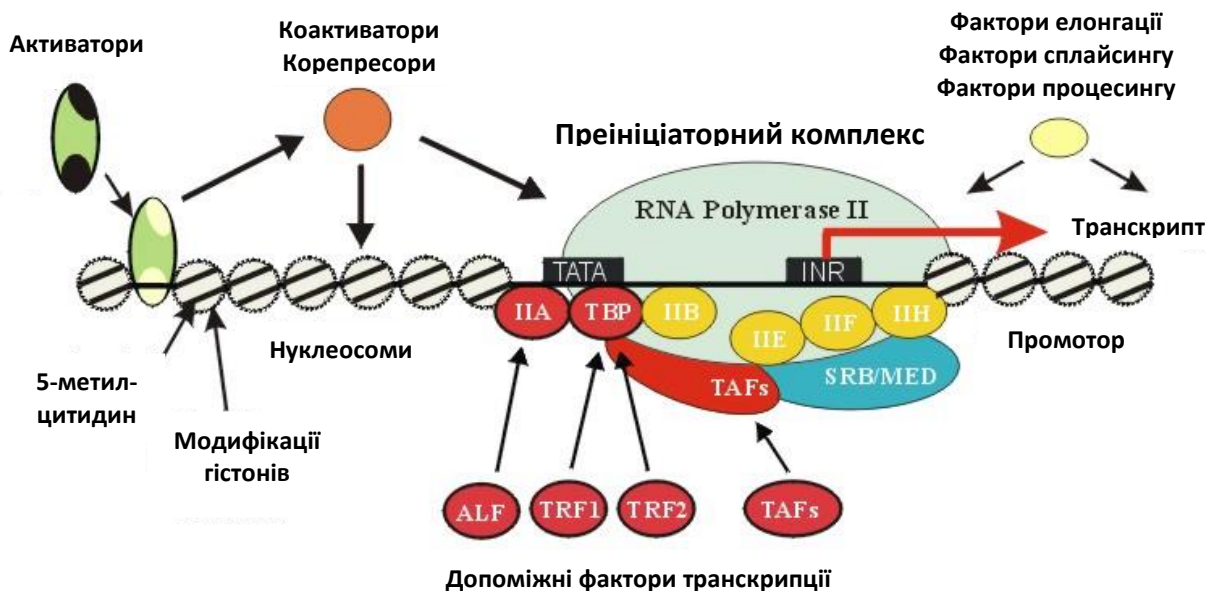


Рис. 149. Структура преініціаторного комплексу РНК-полімерази II еукаріот.

11.6. Промотори РНК-полімераз

Промотор – ділянка початку транскрипції, спрямована на полегшення ініціації останньої. Промотор прокариот має простішу будову і складається з:

- 1) **Послідовності «-35»** - є консенсусною (узагальненою для багатьох різнотипових промоторів) послідовністю, яка знаходиться за 35 нуклеотидів від стартової точки транскрипції у бік 3'-кінця.
- 2) **Послідовності «-10»** або **Прибнов-боксу** – також консенсусна, розміщується за 10 нуклеотидних пар від точки старту транскрипції.

Обидва елементи «впізнаються» різними варіантами фактору σ РНК-полімерази (наприклад, $\sigma 70$) та визначають **ефективність ініціації**, виражену через **силу промоторів та через їх варіабельність**.

Промотор РНК-полімерази II еукаріот є складнішим за будовою і містить дві групи регуляторних елементів послідовності: **проксимальні**, які знаходяться в зоні від -200 до +50 пар основ відносно старту транскрипції, та **дистальні** – можуть бути розташовані у будь-якому місці відносно старту, є спорідненими до специфічних факторів транскрипції. Взаємодія з цими факторами модулює **інтенсивність процесу асоціації компонентів преініціаторного комплексу**. Якщо дистальний елемент підсилює ефективність ініціації, його називають **енхансером**, якщо послаблює або блокує - **сайленсером**.

У безпосередньо наближеній до старту транскрипції зоні знаходиться так званий **базальний промотор РНК-полімерази II (рис. 150)**, на якому, власне, і відбуваються всі процеси «збирання» преініціаторного комплексу.

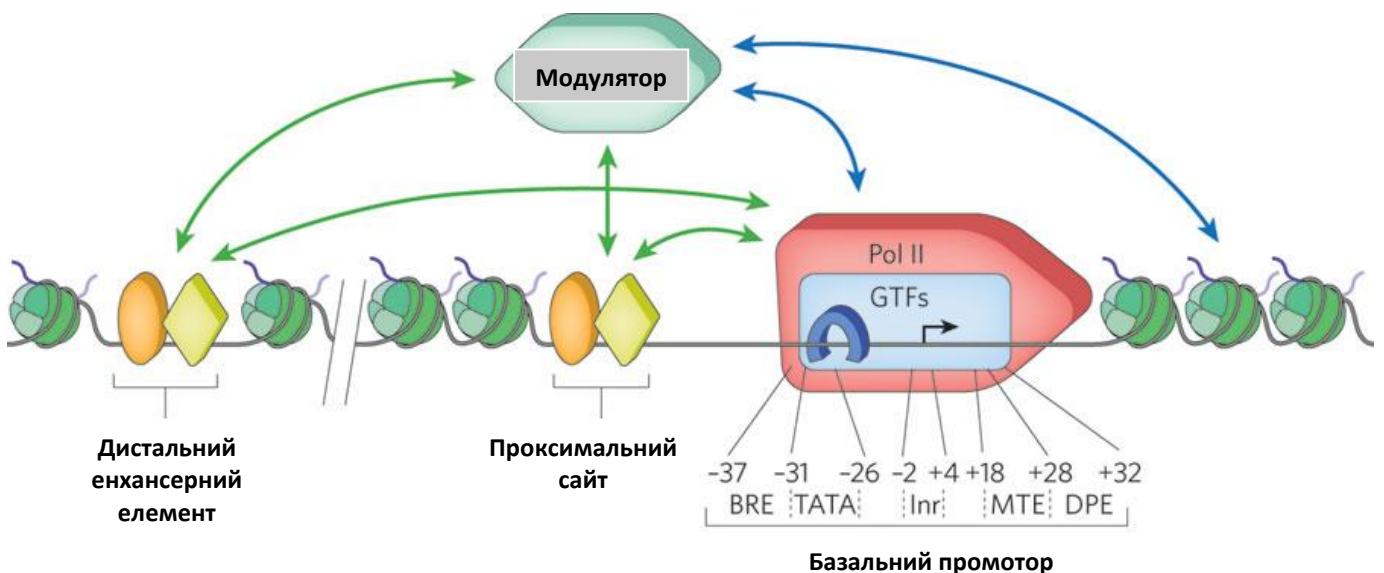


Рис. 150. Елементи промотора еукаріот (пояснення у тексті).

Як видно з рисунку, базальний промотор містить наступні основні елементи:

- 1) **GC-бокс** - розташований, як правило, на ділянці від -100 до -150 пар основ відносно точки старту, присутній не завжди,
- 2) **BRE (B Recognition Element)** – знаходиться на положенні -34 пар основ, містить 7 нуклеотидів,
- 3) **TATA-бокс** – розташований у точці від -26 до -31 пар основ, іноді відсутній,
- 4) **Inr (Initiator Element)** – знаходиться безпосередньо в точці старту, займає положення від -2 до +4 пар основ,
- 5) **MTE (Motif Ten Element)** – займає позицію від +18 до +28 пар основ відносно точки старту транскрипції, має 10 нуклеотидів у довжину,
- 6) **DPE (Downstream Promoter Element)** – знаходиться на відстані приблизно +30 пар основ від точки старту. Як правило, присутній одночасно з Inr.

На **рис. 151** представлено схеми промоторних комплексів про- та еукаріот.

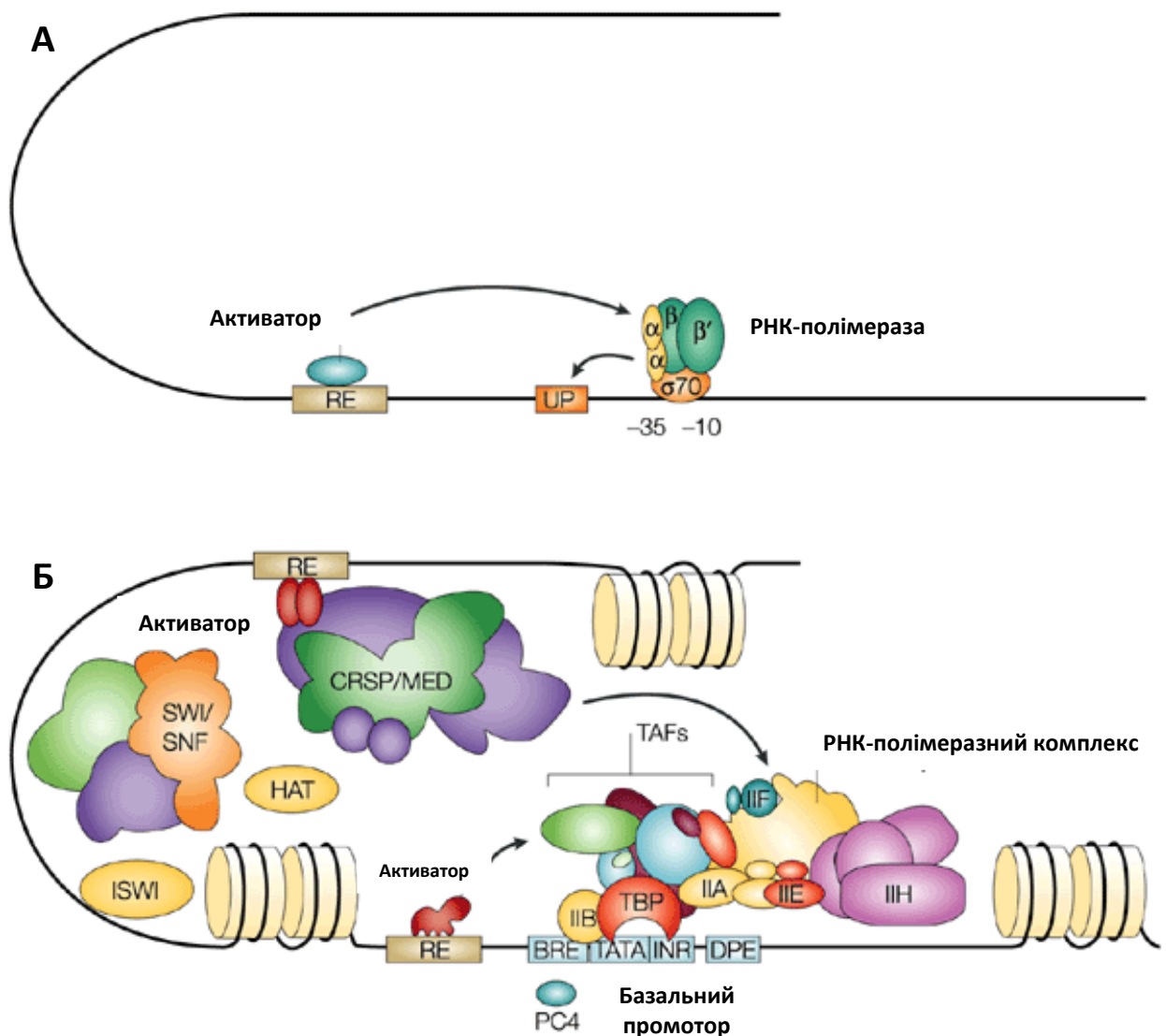


Рис. 151. Схема промоторних комплексів про- (А) та еукаріот (Б).

11.7. Базальні фактори транскрипції

Базальні фактори транскрипції присутні у складі PIC, де є необхідними для подальшого запуску транскрипції. Всі вони є доволі складними білками з різноманітними функціями, і будуть коротко охарактеризовані нижче.

TFIID (рис. 152) – гетеромультимерний білок, який є одним із найважливіших базальних факторів. Саме він визначає **розпізнавання стандартних елементів базального промотора**. Основою структури TFIID є білок **TBP (TATA-box Binding Protein)** зі специфічною спорідненістю до TATA-боксу. Встановлено, що з малою борозенкою у районі TATA-боксу взаємодіє β -складчаста структура TBP. В результаті відбувається суттєва деформація подвійної спіралі з її розкручуванням та **вигином у протилежний від білка бік**. Такий вигин ДНК за рахунок приєднання до TBP, наближує елементи промотора і організує їх в єдиний компактний комплекс, а також підтримує його стабільність. Іноді зв'язування TFIID є сигналом до «збирання» PIC.

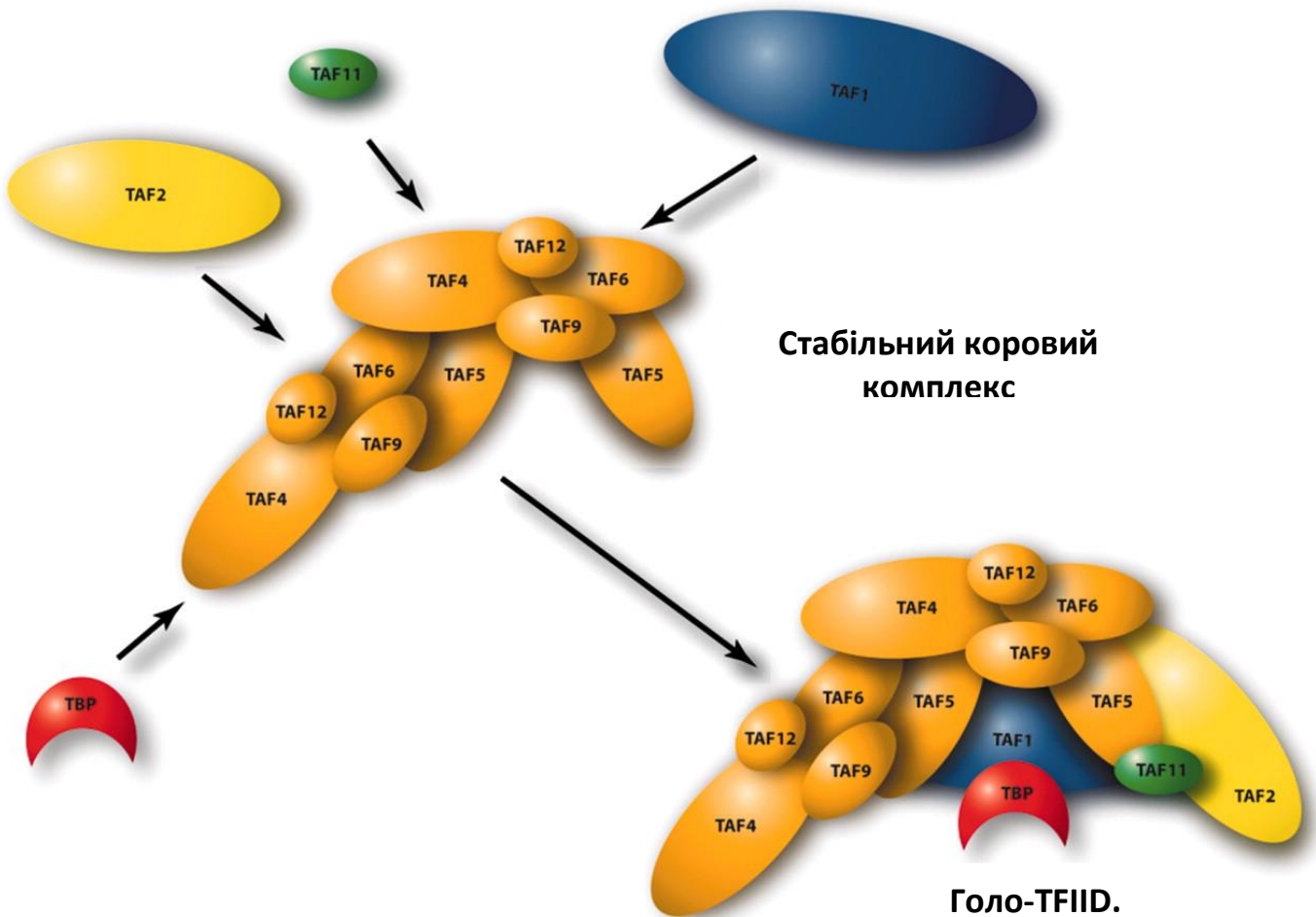


Рис. 152. Схема асоціації компонентів TFIID.

Допоміжними білками TBP є **TAFs (TBP Associated Factors)**, яких нараховують принаймні вісім видів. TAFs взаємодіють з TBP, а також між собою, а деякі з них і з

промоторною ДНК. Основна роль цих білків полягає у забезпеченні розпізнавання промоторних елементів. Так, **TAFII150** зв'язується з **DPE** - особливо така взаємодія важлива тоді, коли у промоторі відсутній ТАТА-бокс, а, отже, приєднання через TBP неможливе. Показано також що транскрипційний фактор **Sp1** «впізнає» **GC-бокс**, посередництвом взаємодії з **TAFII110** та **TAFII250**. Останній є обов'язковим компонентом TFIID у якості основного фактора асоціації компонентів комплексу TAF, з ним взаємодіють майже всі інші види цих білків. Крім того, TAFII250 містить у своєму складі бромодомен і володіє **гістонацетилтрансферазною активністю**, тобто, ацетилює гістони і розпізнає їх ацетильовані форми.

TFIIA - гетеродимерний білок, кофактор, стабілізує комплекс TBP з ДНК. Його відсутність у клітинах дріжджів є летальною.

TFIIB - мономерний білок із мультидоменною структурою. Завдяки своїм доменам визначає положення полімеразного комплексу на матриці та **напрямок транскрипції** ДНК. Здатен **блокувати канал виходу РНК** з активного центру полімерази, тобто аналогічний за функціями до **прокаріотичного σ -фактора**, також **відділяється від комплексу** після закінчення ініціації. У своєму складі містить **два тандемні С-термінальні домени**, які взаємодіють з ДНК по обидва боки сайту зв'язування TBP. Причому, така взаємодія відбувається асиметрично одразу з обома борозенками, саме за рахунок цього і **визначається напрямок транскрипції**. **Н-термінальний домен** TFIIB має нерегулярну структуру і взаємодіє як з РНК-полімеразою II у активному центрі, так і з гібридом ДНК-РНК після початку процесу транскрипції.

TFIIF – гетеродимер, який також **взаємодіє з РНК-полімеразою II** в зоні активного центру). До того ж виявлені контакти цього фактора з ДНК та базальними факторами транскрипції **TFIIE та TFIIH**. Після первинного плавлення ДНК на початку ініціації цей фактор зв'язується з нематричним ланцюгом та **стимулює роботу TFIIH**, а також **запобігає абортивній ініціації**. Після завершення процесу ініціації, він, разом з іншими базальними факторами, дисоціює від PIC та РНК-полімерази, але може знову приєднуватися до нього під час елонгації у випадку зупинки ферменту. Взагалі, TFIIF **стимулює рух РНК-полімерази вздовж матриці**.

TFIIE - гетеродимер, який також **стимулює роботу TFIIH**, до того ж, за умов ініціації транскрипції, взаємодіє з ДНК у регіоні транскрипційного «мішура». Роль цього фактора до кінця не вивчена.

TFIIH - найбільший із базальних факторів, складається з **10 субодиниць** та має молекулярну вагу, співвідносну з вагою РНК-полімерази II. Єдиний базальний фактор, який має **дві ферментативні активності**:

- **АТР-залежну ДНК-геліказу** - частина TFIIH взаємодіє з ДНК нижче активного центру РНК-полімерази II по ходу транскрипції. Конформаційні

зміни, обумовлені гідролізом АТФ, викликають обертання подвійної спіралі навколо своєї осі, що призводить до локального плавлення дуплексу в зоні стартової точки транскрипції. РНК-полімераза II обов'язково потребує такої геліказної активності TFIIH за ініціації транскрипції, і в цьому є унікальною серед полімераз.

- **Кіназу** - TFIIH фосфорилує С-термінальний домен РНК-полімерази під час її переходу від ініціації до елонгації транскрипції (**рис.148**). У дефосфорильованій формі А-РНК-полімерази, яка існує на стадії «збирання» компонентів PIC, CTD взаємодіє з базальними факторами транскрипції, а після фосфорилування певних залишків Ser за допомогою TFIIH полімераза змінює форму на О-РНК-полімеразу, що призводить до дестабілізації PIC та дисоціації певних базальних факторів транскрипції.

Медіатор (mediator) - мультибілковий комплекс, що складається з **більш ніж 20 субодиниць** та виконує структурну функцію. Без цього компоненту неможлива коректна асоціація елементів преініціаторного комплексу. Виявлено, що медіатор взаємодіє лише з білками і функціонує, **передаючи «активаційні сигнали» від регуляторних послідовностей ДНК на РНК-полімеразу II**. До того ж, він також **підвищує структурну стабільність PIC** через опосередковані взаємодії з промотором. Медіатор має витягнуту структуру, яку можна розділити на **три частини**:

- 1) **«Голова» (h)** – взаємодіє з РНК-полімеразою II,
- 2) **Середня частина (m)** – взаємодіє з РНК-полімеразою II та певними факторами транскрипції,
- 3) **«Хвіст» (t)** – взаємодіє зі специфічними факторами транскрипції, зв'язаними з дистальними та проксимальними елементами промотора.

11.8. Механізм ініціації транскрипції ДНК прокариот

Ініціація транскрипції ДНК у прокариот починається з **розпінання промотора σ -фактором** і взаємодії останнього з першим. Це чітко орієнтує РНК-полімеразу відносно ДНК, визначає стартову точку транскрипції, напрямок транскрипції, (вибір одного з двох ланцюгів як матричного), а також стан «щелеп» комплексу полімерази. Фермент, що не приєднаний до ДНК, має **відкриті «щелепи»**, а коли він зв'язується з елементами промотора через сігма-фактор, утворюється **закритий комплекс** навколо ДНК, причому активний центр знаходиться у точці старту, тобто, зоні +1 пара основ (**рис. 153**).

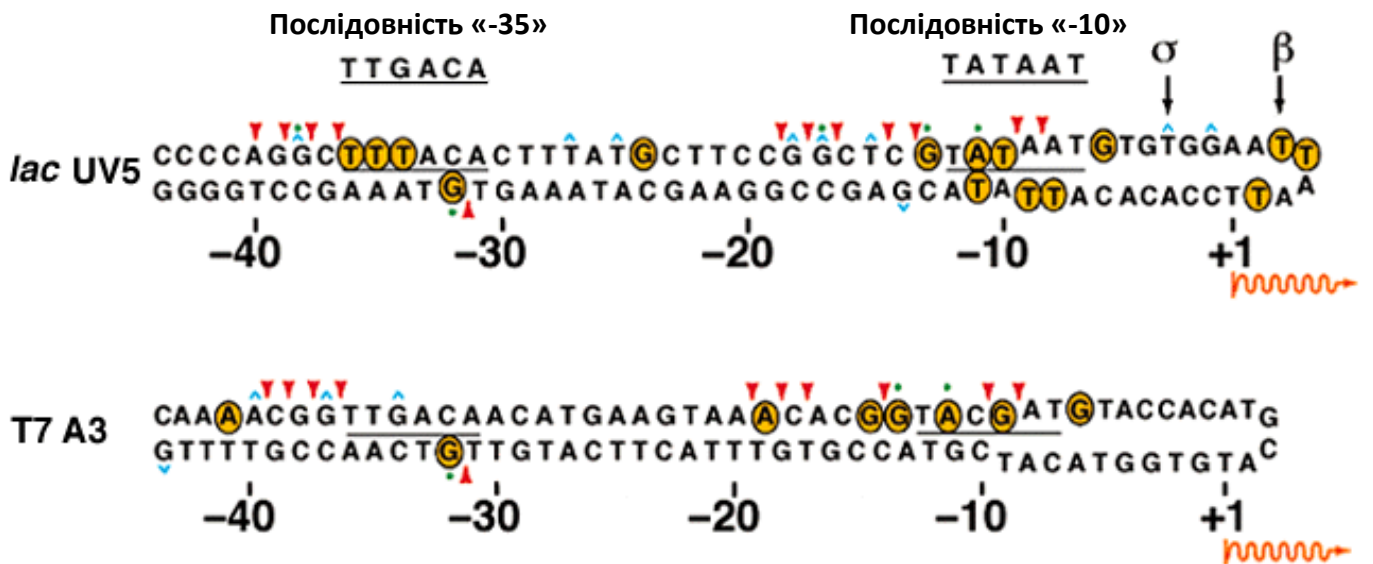


Рис. 153. Основні контакти між промотором та РНК-полімеразою прокаріот.

Однаке, за цих умов **закритий комплекс** швидко перетворюється знову на **відкритий**, оскільки ДНК у щілині між «щелепами» не вистачає місця. У результаті йде формування транскрипційного «міхура» - **локальне плавлення 12-14 пар основ** у зоні від -7 до +5 пар основ відносно стартової точки. Цьому сприяє **збільшення негативної надспіралізації** у кільцевій ДНК бактерії, яке полегшує «розкручування» дуплексу ДНК. Причому РНК-полімераза за рахунок плавлення орієнтується так, що кодуючий ланцюг захоплюється певними структурними елементами ферменту, а матричний опиняється в активному центрі (рис. 154 та 155).

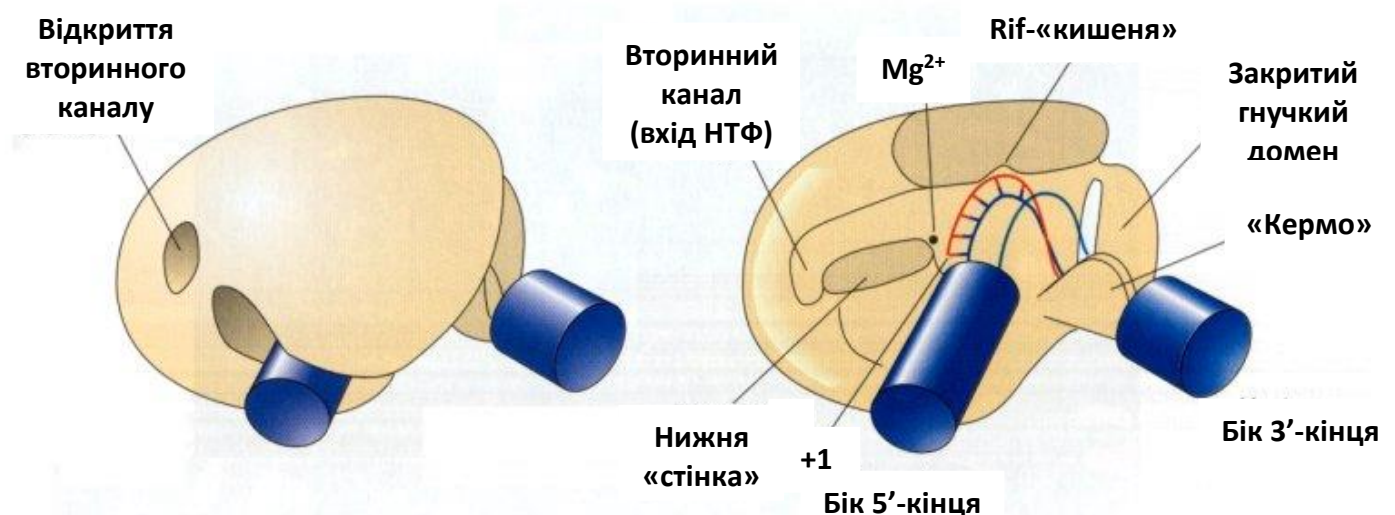


Рис. 154. Орієнтація ДНК відносно активного центру РНК-полімерази. Кінці рахуються відносно матричного ланцюга.

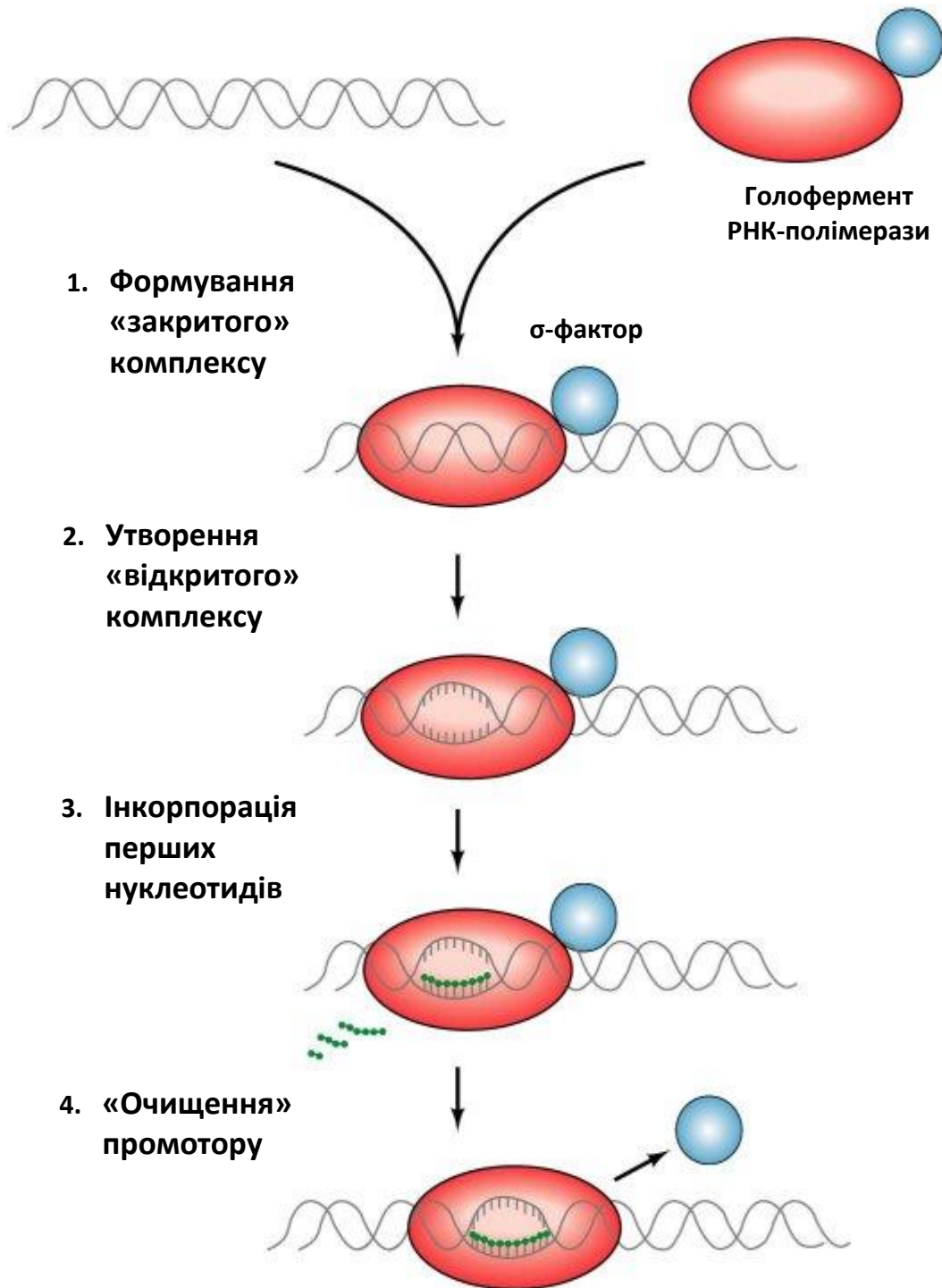


Рис. 155. Події ініціації синтезу РНК у прокаріот.

Синтез першого фосфодієфірного зв'язку – найповільніша, а отже, лімітуюча стадія ініціації синтезу РНК. Відбувається завдяки **унікальній праймазній активності полімерази (рис. 138)**. Першим найскладнішим етапом синтезу є **жорстка фіксація перших двох нуклеотидів** у певній геометрії в активному центрі ферменту. Така фіксація залежить від взаємодій субодиниці σ з активним центром. Перша при цьому

відіграє роль 3'-термінальної ділянки РНК та приймає участь у формуванні **сайту зв'язування чергового нуклеотиду** на більш пізніх етапах елонгації. Далі процес **синтезу** транскрипту **продовжується до 8-9 нуклеотидів – такий транскрипт називається первинним**. Саме ця кількість нуклеотидів у його складі поки що може розміститися в межах РНК-полімеразного комплексу до стадії виходу у первинний канал. На будь-якому етапі синтезу первинного транскрипту можливе його дисоціація - **абортивна ініціація**, яка має декілька причин. **Першою** з них є занадто мала початкова довжина транскрипту. Хоча РНК-полімераза, як уже відмічалось, володіє високою спорідненістю до гібриду ДНК-РНК, невеликий розмір останнього на етапі ініціації дає замало взаємодій з активним центром ферменту, що сильно знижує стабільність асоціації останнього з продуктом реакції полімеризації. Варто відмітити, що існує додаткова стабілізація короткого гібрида завдяки взаємодії з ним σ -фактора. **Друга причина** абортивної ініціації полягає у конкуренції між фактором σ і синтезованою РНК за розміщення у первинному каналі, оскільки після зростання транскрипту до 9-10 нуклеотидів σ -субодиниця стерично заважає і тому під час подальшої елонгації не потрібна. Якщо конкуренцію за первинний канал «виграє» РНК, то після синтезу приблизно 12 нуклеотидів транскрипту фактор σ «витісняється» зі складу комплексу, що носить назву **«очищення» промотора (Promoter Clearance)**, і є ознакою переходу полімеразного комплексу на елонгаційний етап.

11.9. Ініціація транскрипції РНК-полімеразами еукаріот

Ініціація транскрипції РНК-полімеразою II еукаріот є складнішим процесом, і **потребує попереднього «збирання» PIC (рис. 156)**. В кінці такого «збирання» промоторна ДНК зв'язана з полімеразним комплексом головним чином опосередковано, через базальні фактори транскрипції. Після своєї асоціації компоненти PIC утворюють на промоторі **«закритий» комплекс РНК-полімерази**. Далі, як і у прокариот, відбувається перехід комплексу у **«відкритий стан»** за рахунок **локального плавлення ДНК** завдяки геліказній активності **TFIIH**. Потім здійснюється **«захоплення»** кодуючого ланцюга фактором **TFIIF** та **«занурення»** матричного ланцюга у активний центр між «щелепами», яке контролюється взаємодією ДНК з N-термінальною частиною фактора **TFIIB**. Далі відбувається **синтез короткого первинного транскрипту**, у процесі якого гібрид ДНК-РНК стабілізується контактами з N-термінальним доменом **TFIIB**, який при цьому, аналогічно до сігма-фактора прокариот, **блокує первинний канал виходу РНК**. Після синтезу первинного транскрипту відбувається **«перемикання» режиму роботи РНК-полімерази** з ініціації на елонгацію завдяки кіназній активності **TFIIH** по відношенню до **CTD (рис. 148)**. Якщо ініціація пройшла вдало, відбувається **«очищення» промотора**, тобто, втрата зв'язку **CTD** з певними базальними факторами транскрипції, які дисоціюють зі складу полімеразного комплексу, таким чином РНК-полімераза починає **елонгаційний етап**

синтезу РНК (рис. 156, Б). Частина базальних факторів залишається на базальному промоторі для ініціації зв'язування наступних полімеразних комплексів.

Після елонгації відбувається **термінація транскрипції**, у ході якої РНК-полімераза зв'язується з **TFIIF**. TFIIF, у свою чергу, **залучає специфічну фосфатазу** яка дефосфорилує СТД. Завдяки цьому РНК-полімераза має можливість вступити у новий робочий цикл.

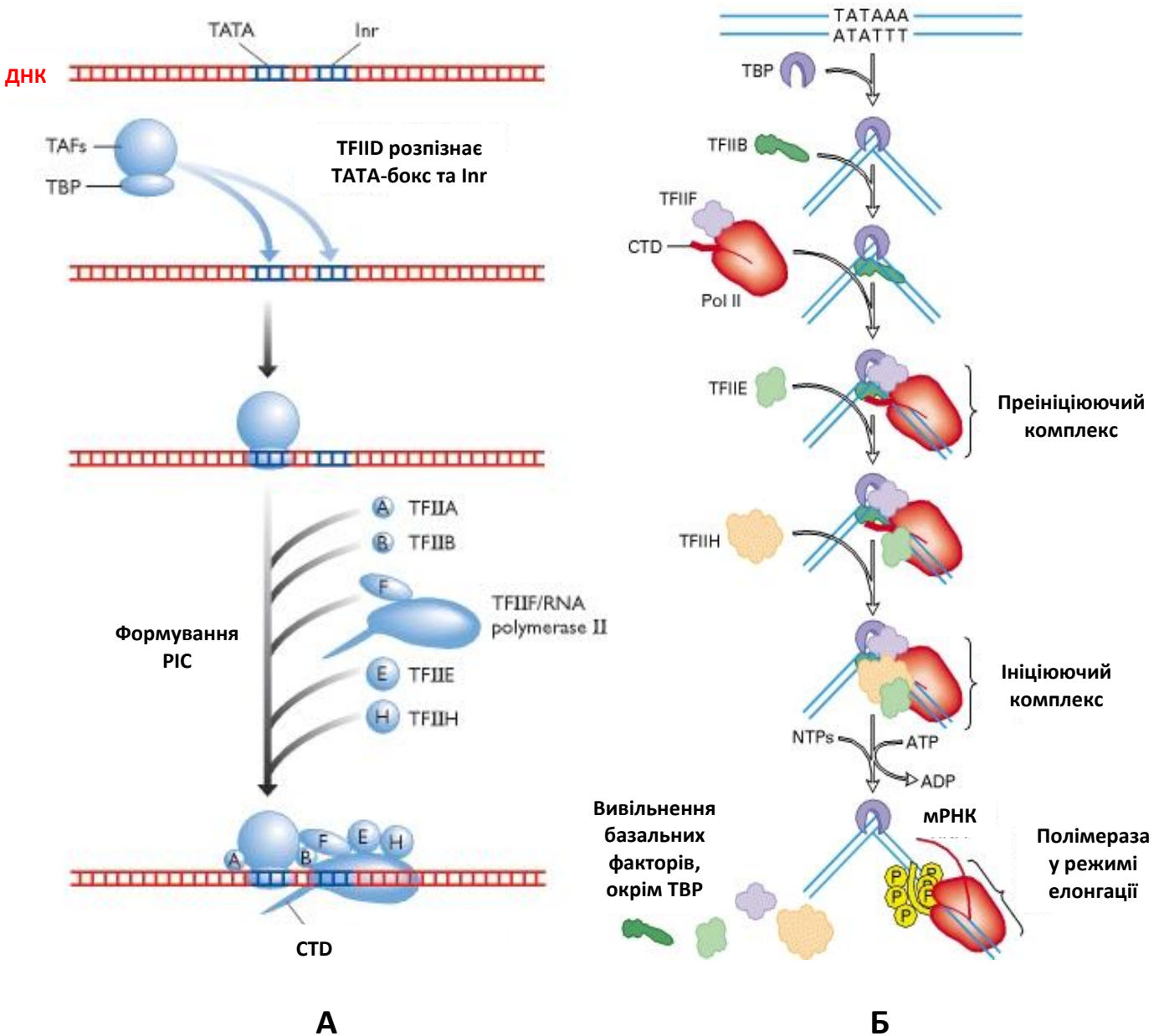


Рис. 156. «Збирання» PIC (А) та схема транскрипції ДНК РНК-полімеразою II (Б).

Промотор кластерів генів рибосомної РНК, які транскрибує РНК-полімераза I містить **два елементи** - ділянку **UCE (Upstream Control Element)** на відстані -100 пар основ від старту та **кор-елемент** безпосередньо у зоні стартової точки транскрипції. Ініціація синтезу рРНК у цих регіонах залежить від **двох транскрипційних факторів**:

- **Димер UBF (Upstream Binding Factor)** – не має високої специфічності до елементів промотора, тому зв'язується в будь-якому місці кластера генів. Димер містить в собі та звані HMG-бокси для індукції зігнутостей ДНК, що призводить до наближення між собою двох вищезгаданих елементів промотора.
- **SL1 (TFIB)** – високоспецифічний, є аналогом TFIID РНК-полімерази II-також містить TBP і специфічний набір асоційованих з ним факторів. Взаємодіє з обома промоторними елементами, після їх наближення стають один до одного завдяки зміні конформації ДНК під дією UBF.

Після **зв'язування обох факторів** з промоторними елементами **SL1** залучає до комплексу РНК-полімеразу I, і починається звичайний елонгаційний етап синтезу рРНК. Варто відмітити, що, навіть **незважаючи на відсутність ТАТА-боксу** у генах рибосомних РНК, **TBP є обов'язковим компонентом** комплексу РНК-полімерази I, оскільки **сприяє правильній орієнтації промоторної ДНК** по відношенню до полімеразного комплексу.

Промотори генів тРНК і 5S рРНК, які є мішенню транскрипції з боку еукаріотичної РНК-полімерази III, взагалі мають унікальне розміщення. Вони локалізуються не на початку, а **всередині кодуєчого регіону** відповідних генів. Серед елементів **промотора гена тРНК**, відомо два - так звані **бокси А і В**. Вони впізнаються фактором **TFIIIC**, який згодом залучає до комплексу **TFIIIB**. Останній, що містить у своєму складі **TBP** і декілька специфічних для РНК-полімерази III білків **TAF**, опосередковує зв'язування утвореного комплексу з РНК-полімеразою III.

Всередині гену 5S рРНК замість **боксу В** присутній **бокс С**, який впізнається фактором **TFIIIA**. Далі білок **TFIIIA** залучає до комплексу фактор **TFIIIC**, після цього формування преініціаторного комплексу продовжується ідентично до механізму його утворення на промоторі генів тРНК. Коли починається транскрипція, РНК-полімераза «витісняє» з комплексу **TFIIIC та TFIIIA**, які розміщуються попереду від неї. **TFIIIB** при цьому залишається у складі комплексу для залучення РНК-полімерази III до повторного процесу транскрипції.

11.10. Механізм елонгації під час транскрипції ДНК на прикладі прокариот

У процесі елонгації РНК-полімераза починає рухатися вздовж матриці разом із **одноланцюговими ділянками у 12-14 пар основ довжиною** в зоні транскрипційного «міхура». У процесі руху полімерази на кожен її каталітичний акт **одна пара основ**

попереду «міхура» роз'єднується, а одна - відновлюється позаду нього. Відомо, що **розділення подвійної спіралі ДНК** перед «міхуром» полегшується за допомогою **G-петлею** у складі РНК-полімерази.

У зоні міхура з полімеразою завжди зв'язаний **ДНК-РНК-гібрид довжиною 8-9 пар основ**, причому на 3'-кінці РНК утворює подвійну спіраль з матричним ланцюгом. Відомо, що у **первинному каналі** при цьому знаходиться **ділянка РНК у 5-6 нуклеотидів**, решта з них з боку 5'-кінця виходить за межі полімеразного комплексу. Встановлено, що за **відновлення хеліксної структури ДНК** позаду комплексу відповідає **L-петля** РНК-полімерази. Наявність **гібриду ДНК-РНК** у активному центрі ферменту під транскрипції забезпечує **високу спорідненість ферменту до субстрату**, яку, як уже згадувалося, виражають через **процесивність РНК-полімерази**. Додатковим фактором підвищення процесивності є взаємодія транскрипту з первинним каналом, завдяки чому абортивна ініціація під час елонгації є малоїмовірною.

Елонгаційний цикл РНК-полімерази, ідентичний з ДНК-полімеразою, складається з декількох стадій (рис. 138):

- 1) Відбір та зв'язування нуклеозидтрифосфатів.** У активному центрі розташовані 3'-термінальний нуклеотид РНК, неспарений нуклеотид матричного ланцюга ДНК, три залишки аспартату для орієнтації двох йонів магнію та **F-спіраль** РНК-полімерази. ОН-група на 3'-кінці транскрипту знаходиться поряд з одним з йонів Mg, який постійно перебуває у активному центрі. Зв'язування НТФ контролюється неспареним нуклеотидом матриці і є зворотнім, тобто, не виключеною є негайна дисоціація через низьку спорідненість НТФ до сайту зв'язування.
- 2) Приєднання (включення) чергового нуклеотиду.** За умови комплементарності зв'язаного НТФ з нуклеотидом у складі матриці, перший, за участі йонів Mg^{2+} жорстко «фіксується» у активному центрі, приймаючи напружену реакційно-здатну конформації інтермедіату реакції. Відомо, що у процесі каталізу значну роль відіграють два йони магнію, які перебувають у активному центрі під час каталізу. Один з йонів, який постійно присутній у активному центрі ферменту, взаємодіє одночасно як з α -фосфатною групою НТФ, так і з 3'-ОН групою транскрипту, забезпечуючи її іонізацію. Другий Mg^{2+} , що потрапляє у систему з черговим нуклеозидтрифосфатом, стабілізує напружену конформацію всіх трьох фосфатних залишків НТФ. Обидва йони Mg взаємодіють з залишками аспартату для правильної координації **(рис. 138)**. Результатом жорсткої фіксації та орієнтації субстратів реакції є каталіз утворення нового фосфодиефірного зв'язку.
- 3) Транслокація (рух) полімерази вздовж матриці.** Стає можливим внаслідок формування «відкритого» комплексу РНК-полімерази за рахунок зміни структури субстрату та дисоціації пірофосфату, рушійною силою при цьому є

теплова енергія. Такий рух може здійснюватися в обох напрямках. Наприклад, під час пересування комплексу вперед одна пара основ гібриду ДНК-РНК зі сторони 5'-кінця роз'єднується, так само, як і одна пара основ матриці перед «міхуром» з 5'-термінальної сторони. В той же час відбувається відновлення однієї пари з боку 3'-кінця, тобто, вже за транскрипційним «міхуром».

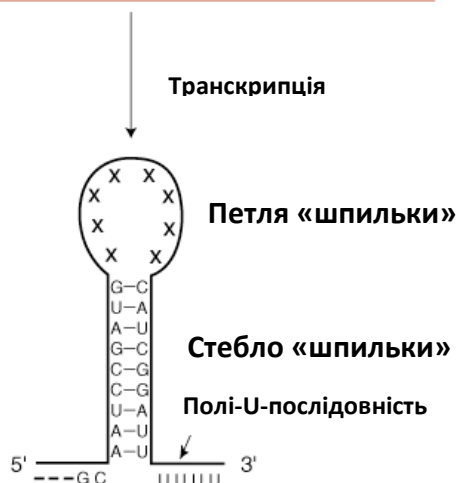
Таким чином, беручи до уваги зростання довжини гібриду на одну пару основ з кожним актом каталізу, пересування РНК-полімерази вздовж матриці відбувається з одночасним роз'єднанням та відновленням двох пар основ. Таке переміщення прокаріотичної РНК-полімерази з одночасним синтезом РНК відбувається зі швидкістю приблизно **40 нуклеотидів за секунду**. У випадку **помилки транскрипції** відбувається взаємодія з РНК-полімеразою спеціальних факторів елонгації/редагування транскрипції, які у прокаріот мають назву **GreA та GreB** і є аналогами еукаріотичного фактора **TFIIS**. Ці фактори індують **3'-екзонуклеазну активність** РНК-полімерази, внаслідок якої відбувається відщеплення 3'-термінального нуклеотиду з формуванням в активному центрі вкороченого 3'-кінця транскрипту, який використовується для **повтору стадії включення НТФ** у процесі елонгації. Такий механізм, як уже відмічалось, значно підвищує загальну точність процесу транскрипції.

11.11. Термінація транскрипції

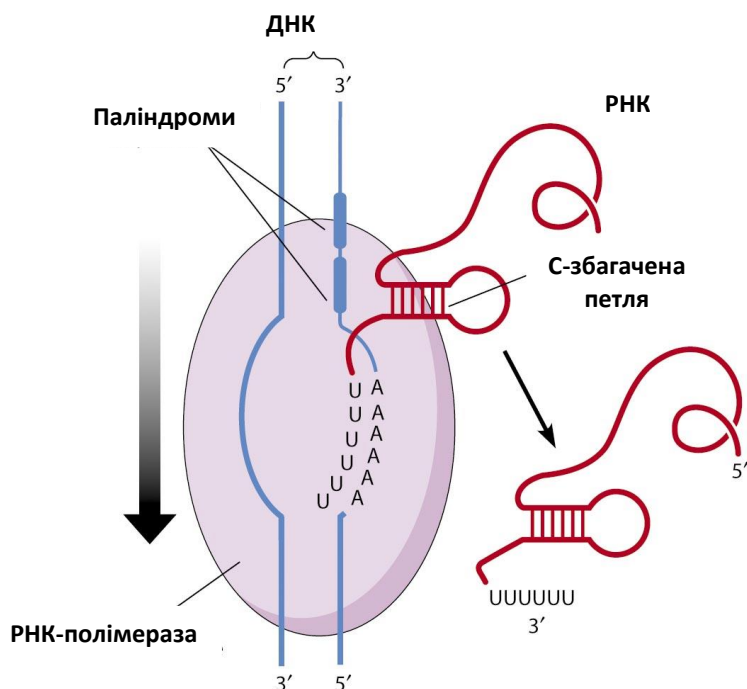
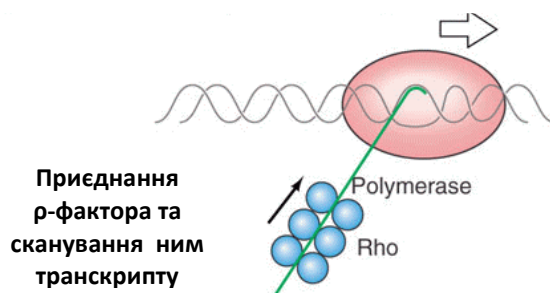
Сигналом до **термінації транскрипції ДНК прокаріот** є певні послідовності у складі матриці, які називають **термінаторами**. Як правило, вони являють собою інвертовані самокомплементарні повтори - **паліндроми**, оточені АТ-трактами приблизно по **7 пар основ довжиною**. Завдяки паліндромам після їх копіювання в складі транскрипту утворюється **термінаторна «шпилька»**, що являє собою комплементарний дуплекс РНК з петлею, оточений регіонами з відносно нестабільними парами А-У гібриду ДНК-РНК (**рис. 157, А**). Нестабільний у даних ділянках гібрид ускладнює елонгацію транскрипції, а «шпилька» попереджає зворотній рух полімерази. Ініційована таким чином зупинка полімерази призводить до перебудов активного центру ферменту, руйнування гібриду, відновлення спіралі та відділення свіжого транскрипту. Такий механізм носить назву **ρ-незалежної термінації (рис. 157, Б)**.

Існує альтернативний варіант – так звана **ρ-залежна термінація** з використанням білкового фактора **ρ (Rho)**. Цей фактор являє собою гомогексамер, який може приєднуватися до транскрипту у С-збагачених ділянках. Після свого приєднання Rho-фактор за допомогою енергії АТФ рухається з невеликою швидкістю у напрямку до 3'-термінальної ділянки транскрипту. Після зупинки полімерази на сигналах термінації, фактор «руйнує» подвійну спіраль ДНК-РНК завдяки геліказній активності, що і призводить до термінації транскрипції (**рис. 157, В**).

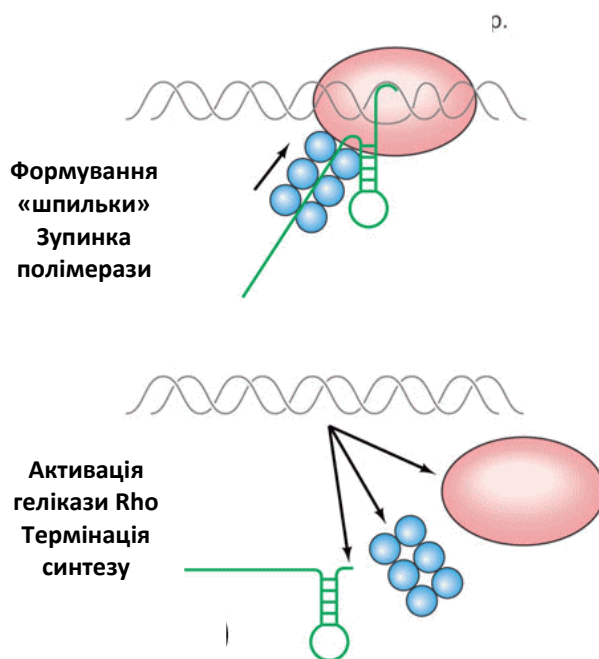
5' **Послідовність матриці ДНК** 3'
 CGTTAGGCTACXXXXGTAGCCTAAAAA



А



Б



В

Рис. 157. Формування термінаторної «шпильки» **(А)** та схеми р-незалежної **(Б)** і р-залежної **(В)** видів термінації. Polymerase – РНК-полімераза.

Процеси термінації еукаріотичної транскрипції **тісно пов'язані з дозріванням (процесингом) молекул РНК**, тому будуть розглянуті у наступному розділі на прикладі мРНК.

РОЗДІЛ 12. «Дозрівання» матричної та інших видів РНК

У даному розділі описуються сучасні уявлення про дозрівання або процесинг молекул РНК. Механізми процесингу направлені на приведення молекул РНК до функціонально-активного стану. Дозрівання відбувається або одразу після синтезу або ще синхронно з його проходженням. Особливої уваги буде приділено розгляду механізмів перетворення пре-мРНК, або гетероядерної РНК (гяРНК) на повноцінну мРНК, придатну у якості матриці для синтезу відповідних білків.

12.1. Загальна характеристика процесингу мРНК

Процесинг мРНК (рис. 158) включає в себе три основні операції:

- 1) **Кепування (Capping)** - модифікація 5'-кінця з утворенням так званого **кепу (5'-Cap)**.
- 2) **Сплайсинг (Splicing)** - вирізання інтронів і зшивання екзонів, при цьому мРНК стає копією лише кодуючої частини гена або її фрагментів. Сплайсинг часто може відбуватися кількома альтернативними шляхами – так званий альтернативний сплайсинг.
- 3) **Поліаденілювання (Polyadenylation)** - приєднання до 3'-кінця поліаденозинової послідовності або полі-А-«хвоста» (**Poly-A Tail**), яке тісно пов'язане з термінацією транскрипції.

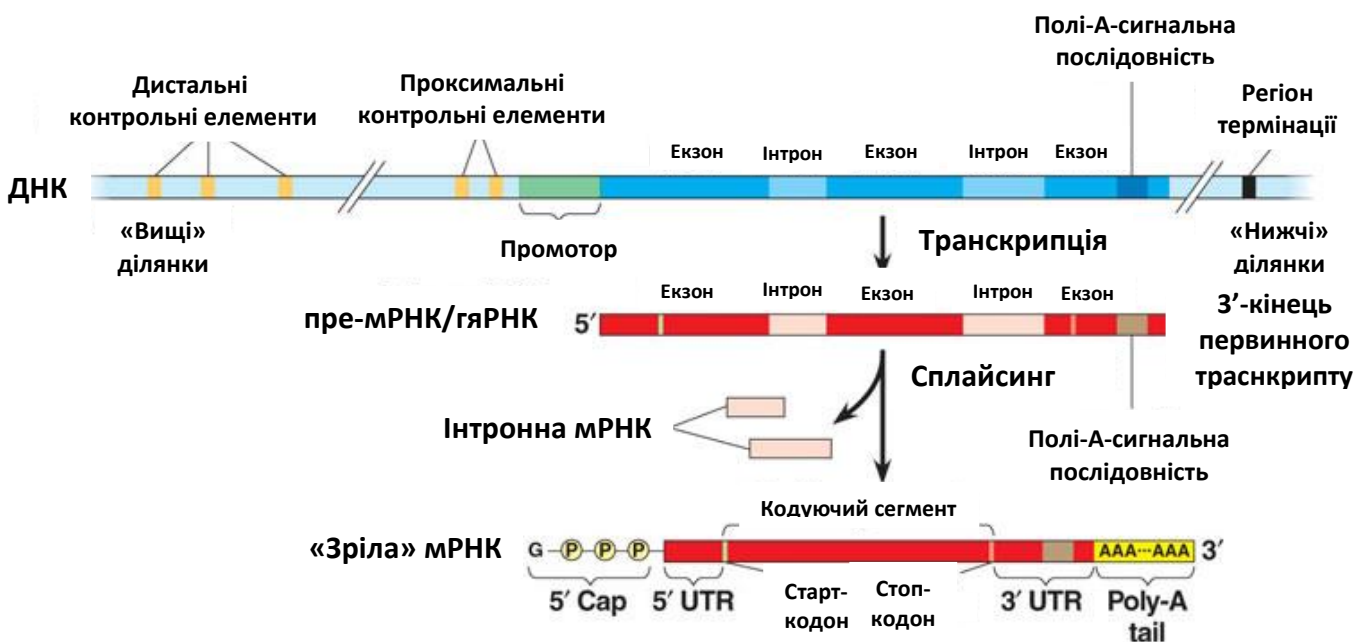


Рис. 158. Стадії «дозрівання» (процесингу) мРНК еукаріот.

Усі операції процесингу відбуваються ще під час транскрипції на РНК-полімеразному комплексі, тобто процесинг є її невід'ємною частиною. Місцем «збирання» машинерії процесингу служить **С-термінальний домен СТД** РНК-полімерази II.

12.2. Кепування мРНК

Кепуванням називають модифікацію 5'-кінця гетерогенно-ядерної РНК за допомогою **приєднання кепу. Кеп (рис. 159)** являє собою унікальну структуру – залишок **N7-метилгуанозину**, що приєднаний до наступного нуклеозиду у послідовності - як правило, метильованого за **С2'** пентофуранози та **С6** основи – за допомогою **двох фосфоангідридних та двох фосфоефірних зв'язків** між положеннями **С5'** першого та другого нуклеотиду послідовності **через три залишки фосфату**. **Третій нуклеотид** такої 5'-термінальної ділянки також може бути метильованим за положенням **С2'** пентофуранози.

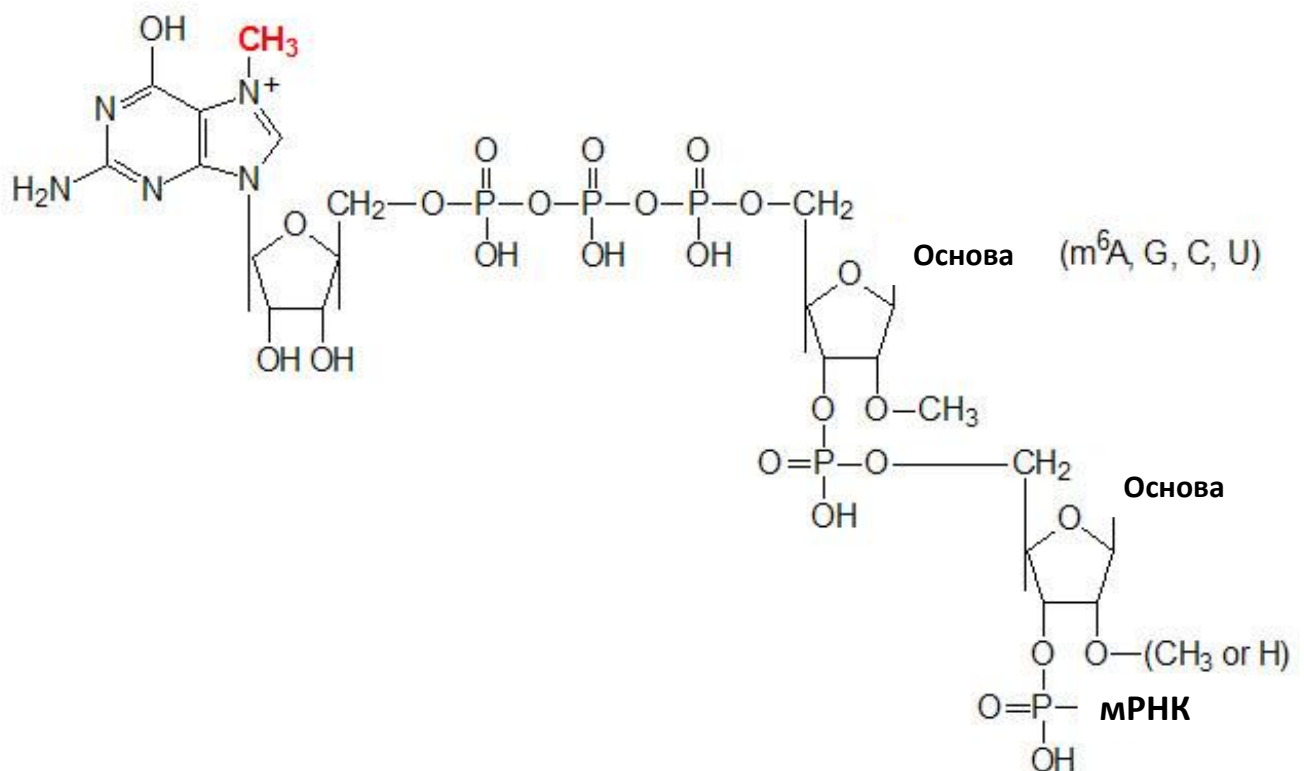


Рис. 159. Структура кепу мРНК.

Передумови кепування виникають ще на етапі **транскрипції**, оскільки у складі пре-мРНК **5'-термінальний нуклеотид**, тобто, перший нуклеозидтрифосфат, з якого почався синтез мРНК, має **три фосфорні залишки**.

Можна виділити наступні стадії формування кепу (рис. 160):

- 1) **Відщеплення** 5'-термінальної γ -фосфатної групи першого у послідовності мРНК НТФ, яке здійснюється фосфатазою (КФ 3.1.3.16).
- 2) **Перенесення** ГМФ зі складу ГТФ на два фосфатні залишки, 5'-кінця за допомогою гуанілілтрансферази (КФ 2.7.7.50) та утворення зв'язку між 5'-фосфатом ГМФ та 5'-кінцевим β -фосфатом першого нуклеотиду пре-мРНК - нехарактерного для нуклеїнових кислот зв'язку.
- 3) **Метилювання** гуаніліл-7-метилтрансферазою (КФ 2.1.1.56) 5'-термінального G з утворенням 7-метилгуанозину (m^7G).
- 4) **Метилювання** C2'-положення рибози у складі другого нуклеотиду за допомогою 2'-O-метилтрансферази (КФ 2.1.1.57).

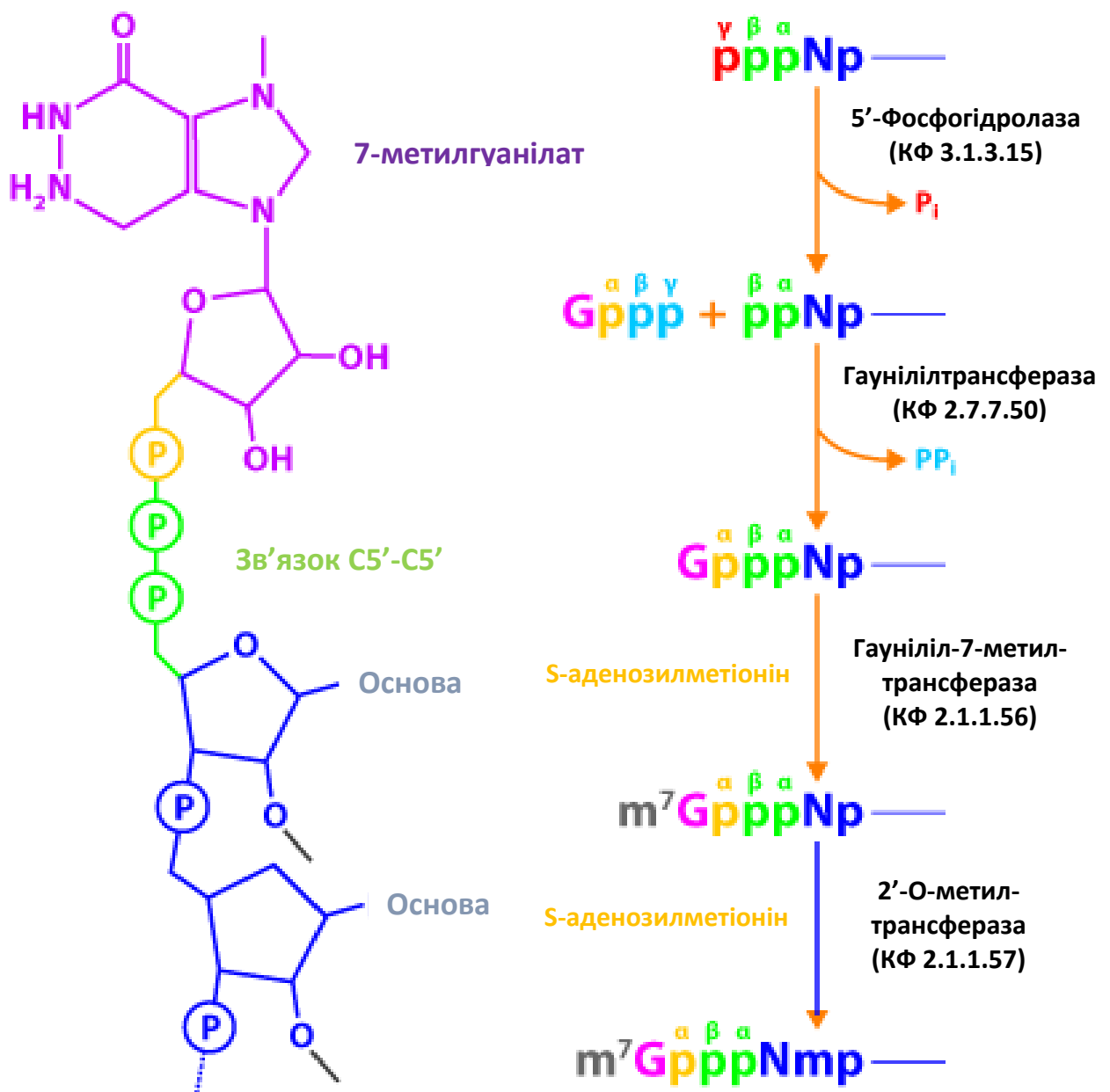


Рис. 160. Схема процесу кепування гяРНК.

Вищенаведені ферментативні активності характерні для комплексу з трьох білків у дріжджів або двох – у ссавців. Комплекс кепування функціонує лише за умови зв'язування з CTD та 5'-термінальною ділянкою пре-мРНК, до яких залучається після синтезу перших 20-30 нуклеотидів транскрипту (рис. 161).

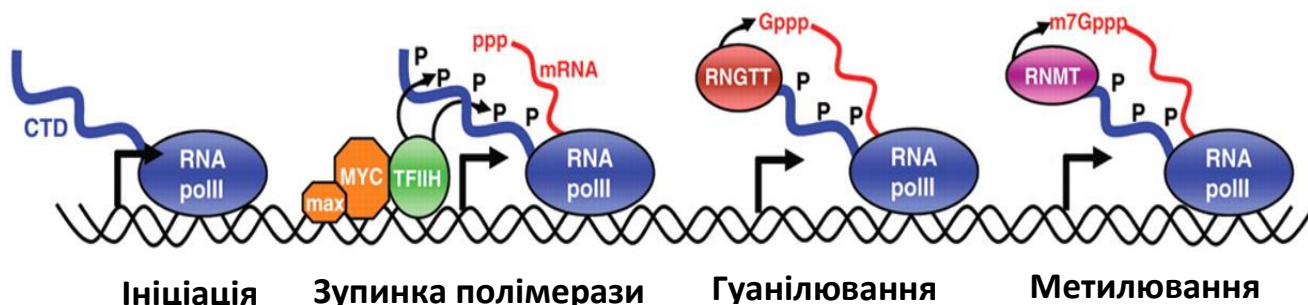


Рис. 161. Участь CTD у контролі кепування пре-мРНК ссавців. RNGTT – РНК-гуанілілтрансфераза, RNMT – РНК-гуаніліл-7-метилтрансфераза.

Відомо, що активність CTD в плані процесингу мРНК залежить від фосфорилування трьох залишків Ser у складі згаданих вище гептапептидних повторів. Активація кепування відбувається наприкінці ініціації транскрипції - за рахунок кіназної активності транскрипційного фактора TFIIN здійснюється швидке фосфорилування Ser5 в кожному з повторів CTD, що призводить до втрати зв'язку останнього з базальними факторами транскрипції у складі PIC та початку руху полімерази для синтезу РНК. Під час руху ферменту, з фосфорильованими за серином сайтами у складі CTD зв'язується білковий фактор **DSIF (DRB-Sensitivity Inducing Factor)**. DRB – це хімічно синтезований інгібітор транскрипції, який активується тільки за наявності DSIF. Після свого приєднання до CTD, DSIF залучає до комплексу фактор **NELF (Negative ELongation Factor)**, який складається з п'яти субодиниць та взаємодіє з DSIF, РНК-полімеразою та транскриптом. Під дією NELF РНК-полімераза зупиняє свій рух. Така зупинка потрібна для зв'язування з полімеразою ферментів кепування, які, локалізуючись на CTD, у подальшому каталізують чотири вищенаведені реакції приєднання кепу (рис. 161). Після проведення реакцій кепування, дані ферменти залучають до комплексу фактор **P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b)**. Він являє собою гетеродимер, одна із субодиниць якого має кіназну активність. P-TEFb фосфорилує Ser2 у складі CTD (рис. 148), а також DSIF. В результаті цього останній втрачає спорідненість до комплексу кепування і дисоціює з CTD разом з NELF. В результаті РНК-полімераза отримує здатність продовжувати рух. Щойно сформований кеп одразу зв'язується з двома білками, які формують так званий комплекс зв'язування кепу **CBC (Cap Binding Complex)**. Білки у складі CBC зберігають

контакт із кепом до моменту **транспорту мРНК з ядра у цитоплазму**. Після експорту мРНК у цитозоль СВС замінюються на відповідні цитоплазматичні фактори.

Функціональне значення кепу полягає у наступному:

- 1) **Захист** 5'-кінця від деградації 5'-екзонуклеазами.
- 2) **Стимуляція** сплайсингу першого інтрону та 3'-термінального поліаденілювання мРНК за участі СВС.
- 3) **Забезпечення транспорту мРНК** у цитоплазму за участі СВС. Останній має певну спорідненість до ядерної пори, саме завдяки цьому мРНК «виштовхується» через неї у цитоплазму 5'-кінцем вперед.
- 4) **Контроль ініціації трансляції**. Кеп, поряд з 3'-полі-А-последовністю мРНК є важливим фактором асоціації субодиноць рибосоми та основних елементів ініціації білкового синтезу (**рис. 162**).

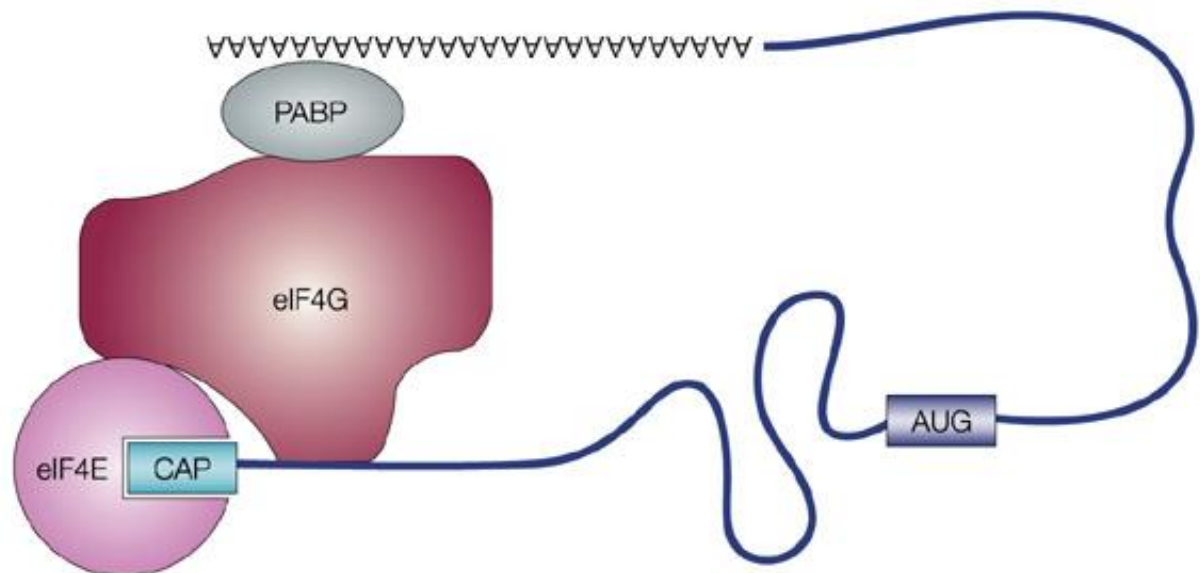


Рис. 162. Приєднання кінців зрілої мРНК до еукаріотичних факторів ініціації трансляції eIF4E та eIF4G через зв'язування з кепом та полі-А-«хвостом» через фактор PABP відповідно на етапі ініціації синтезу білку.

12.3. Реакції сплайсингу мРНК

Сплайсинг полягає у диференційному «вирізанні» з молекули гяРНК інтронів і «зшиванні» між собою екзонів для отримання «зрілих» форм мРНК. На кінцях переважної більшості інтронів розташовані **стандартні динуклеотиди GU (5'-кінець інтрону або 5'-сплайсинговий сайт) та AG (3'-кінець інтрону або 3'-сплайсинговий сайт)** у складі певних консенсусних послідовностей. В середині інтрону, а саме перед треком, збагаченим на піримидини, довжиною близько 15 нуклеотидів, ближче до

3'-термінальної ділянки інтрону існує ще одна **консенсусна послідовність**, до складу якої обов'язково входить **аденозиновий залишок**. Цей аденозин є так званою **точкою розгалуження (branch point)**, яка виконує особливу роль у здійсненні сплайсингу. Сам механізм сплайсингу (рис. 163) полягає у **двох послідовних хімічних реакціях** так званої **трансестерифікації**, тобто, заміни одного фосфодієфірного зв'язку на інший, по суті –внутрішньомолекулярне перенесення зв'язків.

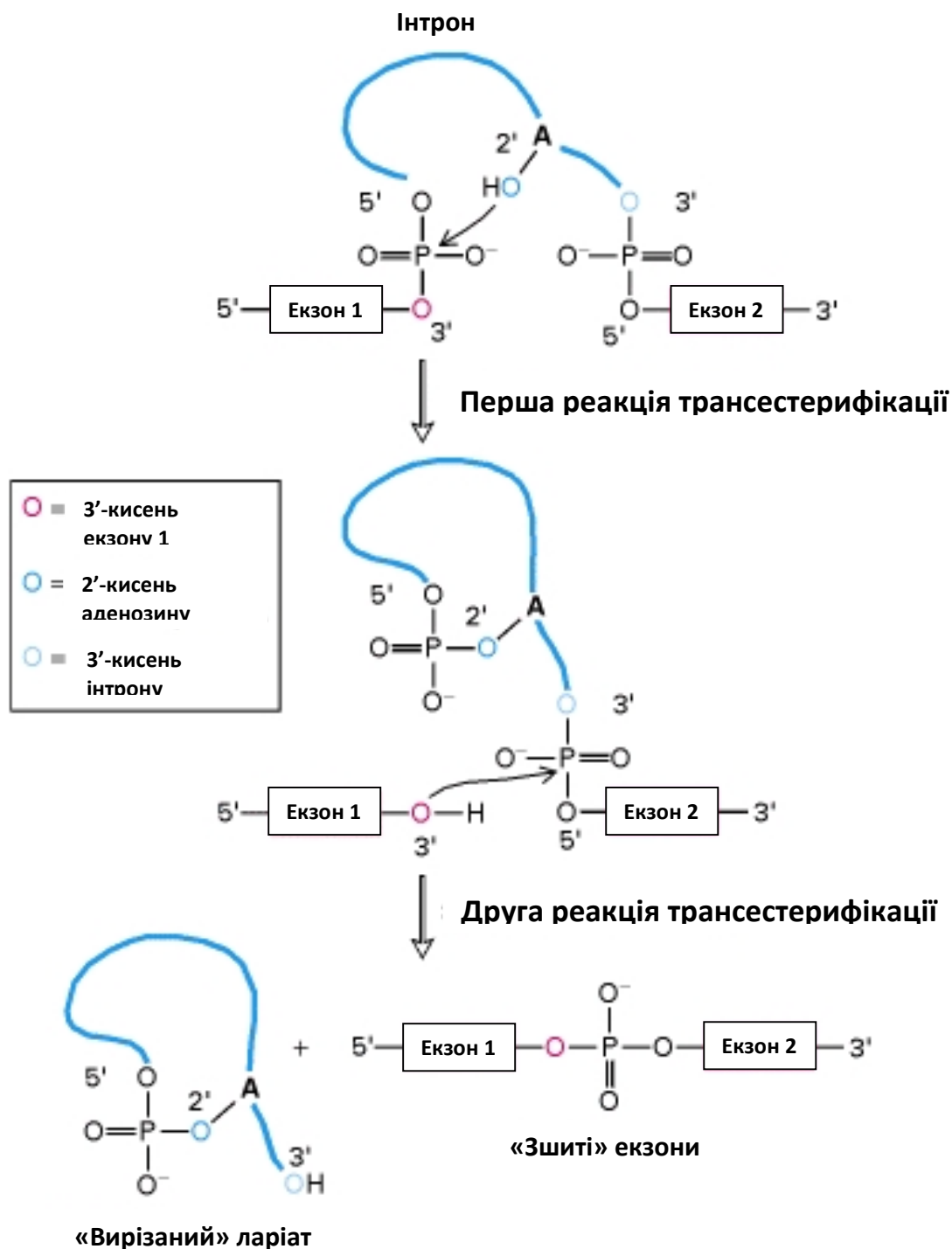


Рис. 163. Реакції трансестерифікації сплайсингу мРНК.

Вже згаданий нами **аденозин** у точці розгалуження **всередині інтрону** характеризується **підвищеною реакційною здатністю**. У ході першої реакції сплайсингу **2'-гідроксильна група його рибози** здійснює **нуклеофільну атаку на фосфат у 5'-сплайсинговому сайті інтрону**, тобто, на межі між 3'-термінальною ділянкою екзону 1 та 5'-термінальною - інтрону. У результаті зв'язок між фосфатом і 3'-термінальним нуклеотидом **екзону 1 замінюється** на зв'язок між цим же фосфатом і 2'-гідроксильною групою аденінового нуклеотиду, а у 5'-кінцевій частині інтрона утворюється так зване **«ласо» або ларіат (lariat)**. У ході **другої реакції** ОН-група, яка залишилася на **3'-кінці екзону 1**, атакує **фосфодієфірний зв'язок у 3'-сплайсинговому сайті інтрону**, в результаті чого цей зв'язок **розривається**, негайно **замінюючись** на такий же, але вже між **екзонами 1 та 2 (рис. 163)**.

Оскільки **кількість фосфодієфірних зв'язків не змінюється**, реакція трансестерифікації є **ізоенергетичною**, тобто **не потребує АТФ або інших макроергічних сполук** у якості джерела енергії. До того ж, каталіз реакцій сплайсингу відбувається **незалежно від білкових ферментів**, здійснюючись виключно або за допомогою рибозимних ділянок у складі самих інтронів (самосплайсинг, підрозділ 12.3), або ж силами інших рибозимів (див. **розділ 5**).

12.4. Сплайсосома та молекулярний механізм сплайсингу

Сплайсосома – спеціальний мультимолекулярний комплекс, у якому за рахунок рибозимної активності каталізуються вищенаведені реакції сплайсингу. Сплайсосома у своєму функціонуванні нерозривно **пов'язана з СТД РНК-полімерази** і утворюється окремо на кожному інтроні за участю пре-мРНК, регуляторних і структурних білків, а також **маленьких ядерних РНК (мяРНК, small nuclear RNA, snRNA)**. Ці РНК синтезуються за допомогою РНК-полімерази III і відіграють **ключову роль у визначенні просторової структури, а також формуванні та функціонуванні сплайсосоми**. Відомо, що у сплайсингу мРНК ссавців приймають участь **п'ять видів маленьких ядерних РНК** довжиною 100-200 нуклеотидів, які позначаються як **U1, U2, U4, U5 та U6 мяРНК**. У клітині вони існують у вигляді комплексів зі специфічними білками та мають просторову структуру з **утворенням комплементарних «шпильок»**. Взаємодія мяРНК з пре-мРНК та між собою відбувається завдяки комплементарному спарюванню з консенсусними послідовностями інтрона. Відомо, що основну роль у «впізнаванні» таких послідовностей належить **РНК U2**. Ця молекула **розпізнає консенсусну послідовність саме у точці розгалуження**, причому аденіновий нуклеозид в умовах контакту з U2 мяРНК залишається неспареним. Завдяки такому приєднанні ця мяРНК переходить у конформаційно-напружений стан, чим, власне, і пояснюється її підвищена реакційна здатність.

Оскільки сформовані під час сплайсингу **контактні подвійні спіралі РНК у сплайсосомі** є відносно короткими через малий розмір мяРНК, такі структури

потребують додаткової стабілізації. Крім того, відомо, що під час «збирання» та функціонування сплайсосоми **відбувається перерозподіл таких спіралей**. Як забезпечення стабілізації таких спіралей, так і індукцію та контроль їх перерозподілу виконують **регуляторні білки сплайсосоми**. Загалом, функціями цих білків є:

- **розкручування подвійних спіралей РНК** за допомогою АТФ-залежної геліказної активності;
- **стабілізація подвійних спіралей** і загальної просторової структури сплайсосоми завдяки високоспецифічній спорідненості до РНК;
- **регуляція сплайсингу**, а саме – інгібування чи індукція асоціації компонентів сплайсосоми на інтронах. Цю функцію виконують спеціальні **білки-регулятори сплайсингу SR (Splicing Regulators)**.

Молекулярний механізм «збирання» та функціонування сплайсосоми представлено на **рис. 164**.

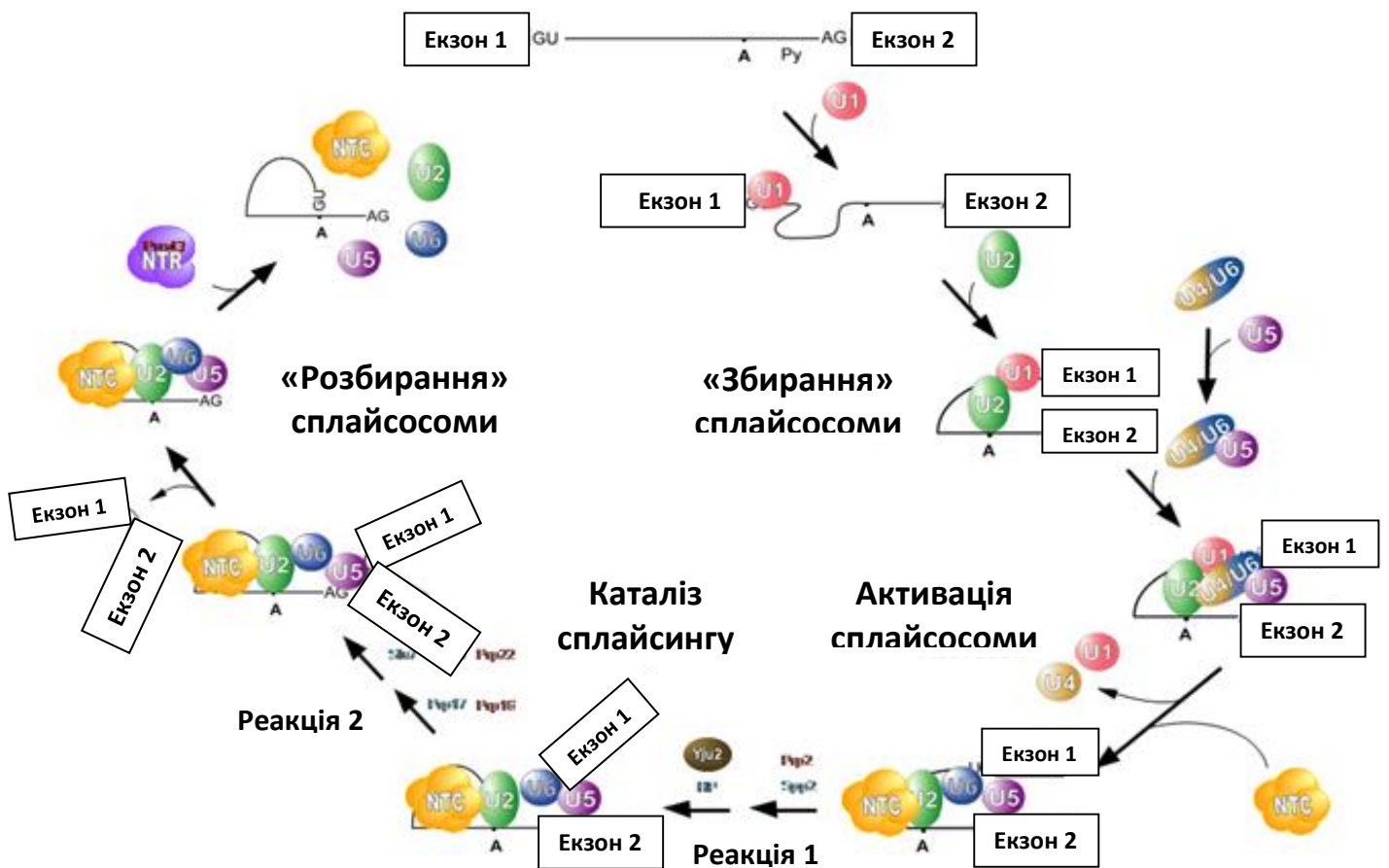


Рис. 164. Робочий цикл сплайсосоми.

Як видно з рисунку, спершу **5'-кінець інтрону «впізнається»** маленькою ядерною РНК **U1** за рахунок **комплементарного спарювання між U1 і 5'-сплайсинговим сайтом**. U1 мяРНК при цьому зв'язана з відповідними білками. По мірі синтезу пре-мРНК зона розгалуження розпізнається специфічним білком **BVP (Branchpoint Binding Protein)** у дріждів або **SF1** у ссавців. Після цього до **3'-сплайсингового сайту** та так званого **Y-треку** приєднується фактор **U2AF (U2 Auxiliary Factor)** та індукуює заміну **BVP на мяРНК U2**. Зв'язування мяРНК **U2** потребує **АТР-залежного «розплетення» певних подвійних спіралей** у її складі, і, власне, визначає локалізацію точки розгалуження. Варто відмітити, що подібне розплетення частини подвійних спіралей, так само як і заміна їх іншими, тобто, реорганізація структури відбувається впродовж майже всього циклу роботи сплайсосоми.

На завершальному етапі «збирання», вже після зв'язування **мяРНК U2**, з інтроном взаємодіє потрійний **комплекс мяРНК U4-U5-U6**. **мяРНК U4** майже одразу дисоціює зі складу з комплексу, а задачею **мяРНК U6** є «**витіснювання**» **мяРНК U1 з 5'-термінальної зони інтрона**. Потім **мяРНК U6** взаємодіє з **мяРНК U2**, і це сприяє **наближенню 5'-сплайсингового сайту**, зв'язаного з **мяРНК U6**, до **точки розгалуження**. Структура такого комплексу додатково **стабілізується** за допомогою **мяРНК U5**, яка взаємодіє з **3'-термінальною ділянкою першого екзону** та іншими елементами сплайсосоми.

Після формування сплайсосоми здійснюється її **структурна перебудова**, яка полягає у **АТФ-залежному роз'єднанні частини подвійних спіралей геліказами**, результатом чого є ще більше **наближення 5'-сплайсингового сайту до точки розгалуження**. Іншими словами, виникають всі передумови для **першої реакції трансестерифікації** з утворенням ларіату (рис. 163). **Зміна структури інтрону** в результаті першої реакції індукуює ще одну **перебудову структури сплайсосоми**. В результаті, за рахунок **взаємодії з мяРНК U5**, **кінці екзонів 1 та 2 наближуються один до одного**, що створює умови для **другої реакції трансестерифікації**. Нарешті, після її проведення **комплекс інтрону з мяРНК АТР-залежним шляхом «видаляється» зі складу сплайсосоми**, а потім її компоненти дисоціюють, що є ознакою завершення робочого циклу. Далі сплайсосома «збирається» вже на іншому інтроні.

Таким чином, в цілому комплекс сплайсосома працює у якості **АТР-залежної молекулярної «машини»**, **перегрупування та реорганізація елементів** якої забезпечує **реакції сплайсингу**. Причому, каталіз обох цих реакцій трансестерифікації здійснюється **виключно молекулами РНК**, а його механізм (рис. 163) дуже нагадує властивий для **білкових ферментів**. Наприклад, **активний центр першої реакції** формується зоною розгалуження (аденозином) інтрона й маленькими ядерними РНК **U2 та U6**. **Просторова структура активного центру** жорстко утримує субстрат, тобто, **5'-сплайсинговий сайт і точку розгалуження**, у визначеній взаємній просторовій орієнтації, а також забезпечує **підвищену реакційну здатність аденінового нуклеотиду** у точці розгалуження. Цікаво, що такий нуклеотид можна одночасно

розглядати і як субстрат у збудженому проміжному стані, і як компонент активного центру ферменту.

Цікаво, що у хлоропластах сплайсинг відбувається за так званим **самосплайсингом (self-splicing)**, тобто без участі білків і маленьких РНК. За цим механізмом мРНК сама набуває просторової структури і завдяки цьому отримує каталітичну активність для власного сплайсингу (рис. 165).

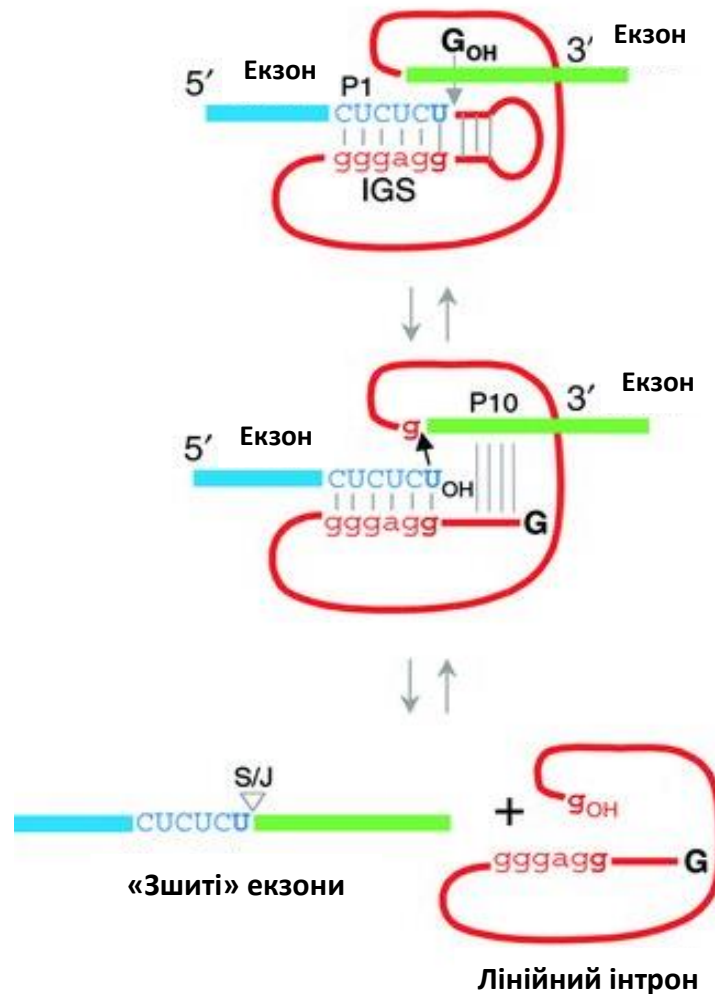


Рис. 165. Механізм самосплайсингу.

Варто відмітити, що **сплайсосоми утворюються на інтронах пре-мРНК і на STD РНК-полімерази ще під час транскрипції**. Таке формування відбувається майже відразу після синтезу 5'-та 3'-сплайсингових сайтів відповідного інтрону, і вони негайно **розпізнаються вищенаведеними компетентними молекулами**. При цьому вее згаданий СВС, зв'язаний з кепом, **підсилює ефективність зв'язування мРНК U1 з 5'-сплайсинговим сайтом першого інтрону за рахунок прямої взаємодії**. Вплив СВС на сплайсинг наступних інтронів є істотно слабшим.

Швидкість збирання сплайсосом визначається **швидкістю транскрипції**. Так, наприклад, із комплексом сплайсосоми взаємодіють фактори елонгації транскрипції, тому **наявність сплайсингового сайту** в цілому **прискорює рух РНК-полімерази**. Синхронізований процес синтезу РНК та її одночасного сплайсингу продовжується до того моменту, поки у складі пре-РНК не з'являється специфічна послідовність - **сигнал термінації**, яка є сигналом для 3'-термінального поліаденілювання і завершення транскрипції.

12.5. Поліаденілювання мРНК і термінація транскрипції

Сигнал термінації транскрипції та поліаденілювання, або так званий **polyA-сигнал**, складається з **двох консенсусних елементів**:

- 1) Послідовність AAUAAA** – розпізнається гетеротетрамерним білком **CPSF (Cleavage-Polyadenylation Specificity Factor)**. Три із чотирьох субодиниць цього фактору є компонентами базального фактору транскрипції TFIID. Вони залишаються приєднаними до СТД РНК-полімерази, поки фермент не «зустріне» сигнал термінації.
- 2) U- або G/U-збагачена послідовність** - розташована приблизно через 20 нуклеотидів нижче першої (в бік 5'-кінця). Ця ділянка розпізнається фактором **CSTF (Cleavage Stimulation Factor)**.

Взаємодія обох вищезазначених факторів з РНК є **позитивно-кооперативною**, тобто, вони підсилюють зв'язування один одного. Після первинного розпізнавання полі-А-сигналу РНК-полімераза, як правило, продовжує синтез ділянки мРНК довжиною близько 1000 нуклеотидів. І лише потім на polyA-сигналі починається асоціація компонентів **мультибілкового комплексу**, до якого **залучаються специфічна полі-А-полімераза PAP (Poly-A Polymerase, КФ 2.7.7.19) та два фактори «розрізання» CF 1 і 2 (Cleavage Factors)**. Відомо, що асоціація компонентів комплексу стимулюється СВС на кепі, а також сплайсосомою, зв'язаною з останнім інтроном. Таким чином, **сплайсинг останнього інтрона та розрізання/поліаденілювання РНК** здійснюються **одночасно і синхронно стимулюють** одне одного. Далі білок **U2AF** на останньому інтроні взаємодіє з **PAP**. У межах другого елемента послідовності полі-А-сигналу – **U-збагаченої послідовності** - знаходиться **консервативний динуклеотид CA**, в якому і відбувається **«розрізання» (cleavage) РНК**. Потім до новоутвореного 3'-кінця, **PAP** під контролем **CPSF** приєднує один за одним **100-200 аденінових нуклеотидів**. Зі сформованим таким чином полі-А-«хвостом» відразу зв'язується специфічний фактор **PABP (Poly-A Binding Protein)**, який підвищує процесивність PAP. В кінцевому рахунку процеси **«розрізання» та поліаденілювання 3'-кінця мРНК** стимулюють **термінацію транскрипції** через конформаційні зміни в полімеразному комплексі. Як вважається, такі зміни призводять до **зниження спорідненості РНК-полімерази до матриці і транскрипту**.

Крім того, процеси «розрізання» та поліаденілування мРНК синхронізовані з котранскрипційною деградацією РНК нуклеазами нижче за послідовністю від polyA-сигналу. Механізми активації цієї нуклеазної активності поки що не з'ясовані, але, схоже на те, що швидке руйнування транскрипту стимулює від'єднання полімеразного комплексу від матриці. Термінація транскрипції іноді потребує інших регуляторних елементів послідовності, причому вони можуть знаходитись як у межах останнього інтрона та стимулювати або блокувати розпізнавання полі-A-сигналу, так і розташовуватися нижче нього і, тим самим, зумовлювати тимчасові зупинки РНК-полімерази, що сприяють термінації.

Сплайсингу піддаються мРНК майже всіх генів білків клітини. Відомим винятком є гени гістонів – вони не мають інтронів, а їх мРНК не проходить поліаденілування. Відомо, що термінація транскрипції таких генів обумовлюється наявністю двох сигнальних елементів РНК, один з яких утворює «шпильку», а інший формує комплементарні контакти з U2 мРНК. Саме між цими двома елементами індукується «розрізання» ланцюга рибонуклеотидів під час термінації, однак без подальшого поліаденілування. Аналогічно відбувається термінація транскрипції маленьких ядерних РНК, які також не поліаденілюються.

12.6. Альтернативний сплайсинг та транс-сплайсинг

Відомо, що гяРНК, синтезована під час транскрипції, як правило, може піддаватися сплайсингу за різними альтернативними шляхами. У результаті утворюються різноманітні молекули мРНК, які, навіть у межах одного кодованого ними білку, містять різні набори екзонів і, відповідно, кодують різні білки (рис. 166).

Ключова роль у визначенні варіанту сплайсингу належить вже згаданим регуляторам сплайсингу SR (Splicing Regulators). Досить часто виникає ситуація, коли такий регулятор специфічно зв'язується з певною послідовністю нуклеотидів всередині екзона та стимулює «впізнавання» сплайсингових сайтів по обидва боки від нього. З іншого боку, у разі відсутності регулятора такий екзон буде «вирізано» разом з сусідніми до нього інтронами. В разі негативної регуляції зв'язування регулятора, навпаки, затруднює розпізнавання сайтів сплайсингу. Так, взаємодія з регулятором може ініціюватися навіть всередині екзона, причому молекули регуляторного білка кооперативно зв'язуються поруч одна з одною і за рахунок цього блокують 3'-сплайсинговий сайт. Внаслідок цього сприймається наступний після нього, а екзон «вирізається» разом з двома фланкуючими його інтронами. Регулятори іншої будови, які також розпізнають специфічну послідовність в екзоні, навпаки, індукують зупинку процесу «збирання» сплайсоми, в результаті чого 3'-сплайсинговий сайт стає вільним для «впізнавання» її компонентами, що є прикладом позитивної регуляції сплайсингу.

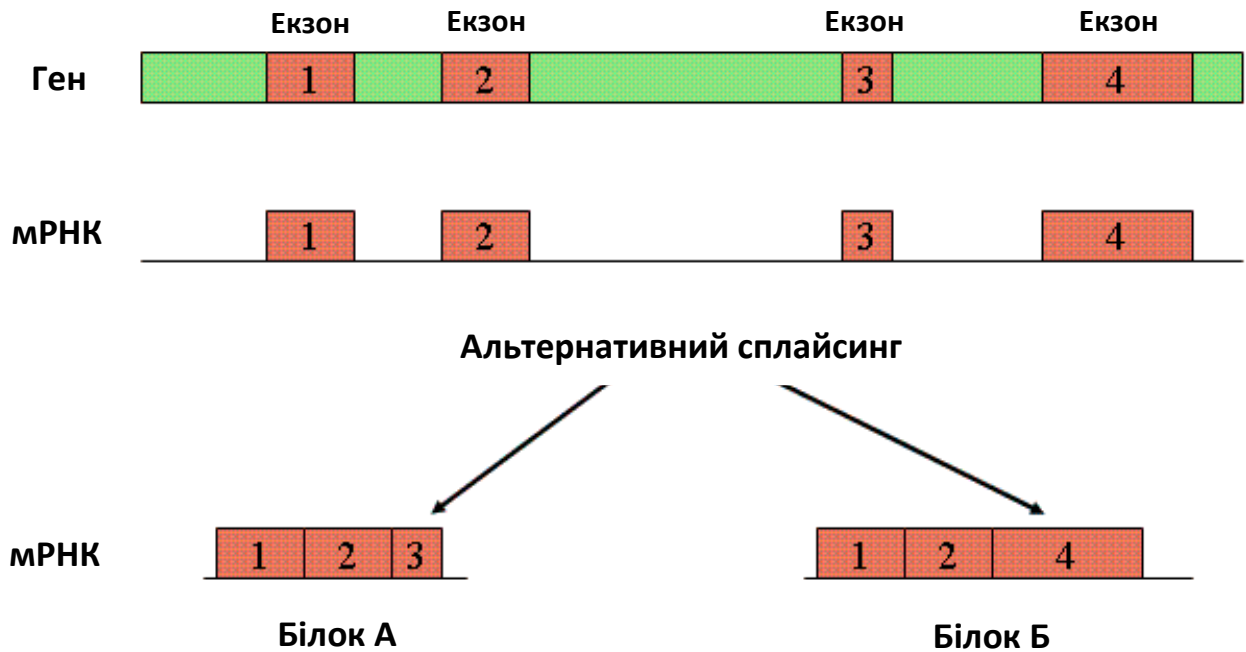


Рис. 166. Схема альтернативного сплайсингу.

Сплайсинг-регулятори можуть мати **сайти зв'язування** також і в **інтронах**, що теж впливає на ефективність «збирання» сплайсосоми. Наприклад, такий регулятор може **блокувати 3'-сплайсинговий сайт**, тоді останній не піддається «впізнаванню», тому **сприймається інший 3'-сплайсинговий сайт**, той - що всередині екзона, а сам екзон виявляється скороченим.

Вибір шляху утворення кінцевого мРНК-продукту залежить також і від альтернативного вибору полі-А-сигналів, які можуть розміщуватися не лише нижче останнього екзона, але і всередині інтронів. Якщо полі-А-сигнал міститься всередині інтрона, його розпізнавання інгібується за рахунок 5'-сплайсингового сайту, асоційованого з мРНК U1 та білками. У результаті такого блокування полі-А-сигнал не «зчитується», і, отже, «вирізається» разом з інтроном. У випадку дії **специфічного регулятора**, який **пригнічує або розпізнавання 5'-сплайсингового сайту**, або **взаємодію мРНК U1 з елементами системи полі-А-сигналу**, цей сигнал піддається детекції, і мРНК втрачає всі екзони, розташовані нижче сигналу. Наприклад, сплайсинг мРНК важкого ланцюга імуноглобуліну IgM у В-лімфоцитах зазвичай йде з ігноруванням полі-А-сигналу всередині інтрону. В результаті синтезується довга мембранна форма білка з С-термінальним доменом для зв'язування з мембраною. З іншого боку, в генах імуноглобулінів у плазматичних клітинах «внутрішній» полі-А-сигнал розпізнається, чому додактовно сприяють підвищена кількість молекул CSTF. У такому випадку синтезуються **вкорочені секреторні форми** антитіл без С-термінального домену.

Окрім співвідношення кількостей елементів здійснення і регуляції процесингу та сплайсинг-регуляторів, ще одним визначальним **фактором модуляції сплайсингу є швидкість транскрипції**. Цей параметр можна виражати або через **швидкість транслокації РНК-полімерази вздовж матриці ДНК**, або через **кількість молекул цього ферменту**, яка одночасно копіює певний ген. Підраховано, що у випадку інтрона середньої довжини **3'-сплайсинговий сайт** синтезується РНК-полімеразою приблизно **через 15-30 хвилин** після формування його **5'-сплайсингового сайту**. За цей час детекція останнього 5'-сплайсингового сайту вже встигне завершитися, тому 3'-сплайсинговий розпізнається у звичайному режимі. Якщо ж зразу **декілька подібних 3'-термінальних ділянок інтрону створюється за відносно короткий час**, між ними виникає **конкуренція** за зв'язування з **елементами сплайсосоми**. При чому, зі зниженням швидкості руху РНК-полімерази перший з таких сайтів, як правило, і буде визначальним. **Швидкість транскрипції в розумінні кількості РНК-полімераз**, що одночасно працюють на даному гені, також впливає на процесинг. Так, чим нижчою є кількість молекул ферменту, тим більше часу буде залишатися для реакції на сигнали сплайсингу. На великій швидкості полімераза може «проскочити» екзон чи polyA-сигнал. Сама по собі **швидкість руху полімерази визначається на стадії ініціації** та контролюється транскрипційними факторами.

Нарешті, варто відмітити таке явище як **транс-сплайсинг**. Він представляє собою особливий вид сплайсингу, що включає **об'єднання у складі мРНК екзонів різних генів еукаріот (рис. 167)**. Передумовою для транс-сплайсингу є той факт, що для багатьох генів існує **не одна, а декілька альтернативних стартових точок транскрипції**. Серед них зустрічаються і розташовані досить далеко від одного гену, які водночас є стартовими точками транскрипції інших. У результаті **копіювання ДНК іноді здійснюється через кілька генів**, а сплайсинг відбувається на рівні таких **об'єднаних первинних транскриптів**. Крім того, описані випадки **транс-сплайсингу пре-мРНК**, які є продуктами **різних транскриптонів**, іноді розташованими навіть **на різних хромосомах**. У цьому випадку на **5'- і 3'-кінцях двох пре-мРНК** міститься так званий **«розірваний» інтрон**, тому **об'єднання двох кінців інтрону сплайсосомою** приводить до **видалення цього інтрона та «зшивання» кінцевих екзонів**. Найкраще це явище вивчено для нематод, але, імовірно, воно є досить поширеним серед інших еукаріотичних організмів.

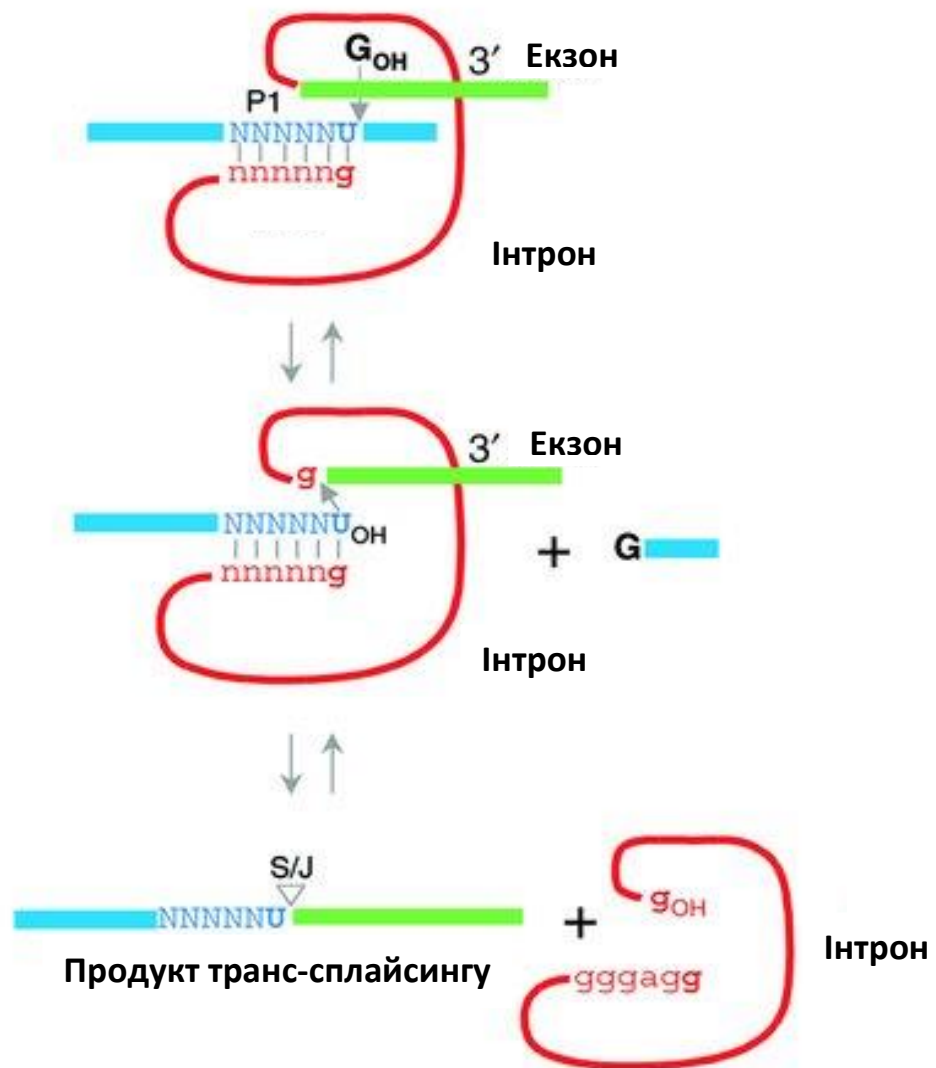


Рис. 167. Механізм транс-сплайсингу.

12.7. Редагування мРНК

Редагування мРНК (mRNA editing) - додаткові модифікації мРНК у процесі або після її дозрівання. Найчастіше цей процес відбувається **під час сплайсингу або відразу після нього**, і не є характерним для еукаріот, хоча й зустрічається практично в усіх таксонах.

Наприклад, у мітохондріях найпростіших більшість мРНК піддається редагуванню за **РНК-залежним механізмом**. Так звана «**гідова**» РНК (**guide RNA, gRNA**) спарюється з комплементарною ділянкою мРНК, після чого ініціює «збирання» **мультибілкової едитосоми (editosome)**. Функцією едитосоми є модифікації структури мРНК, наприклад, **видалення або інсерція уридину** в певній ділянці мРНК.

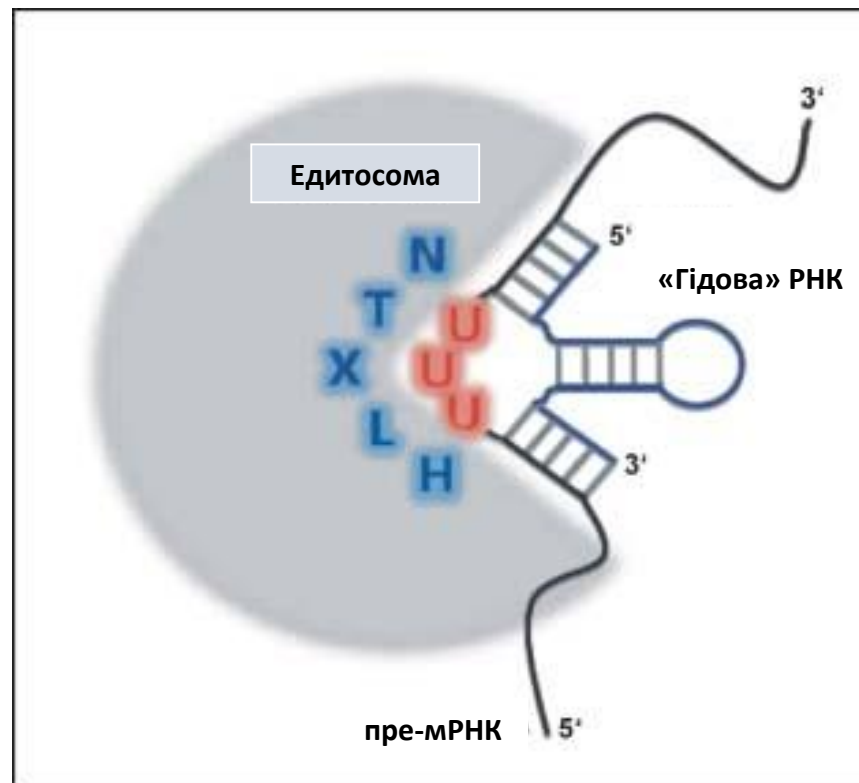
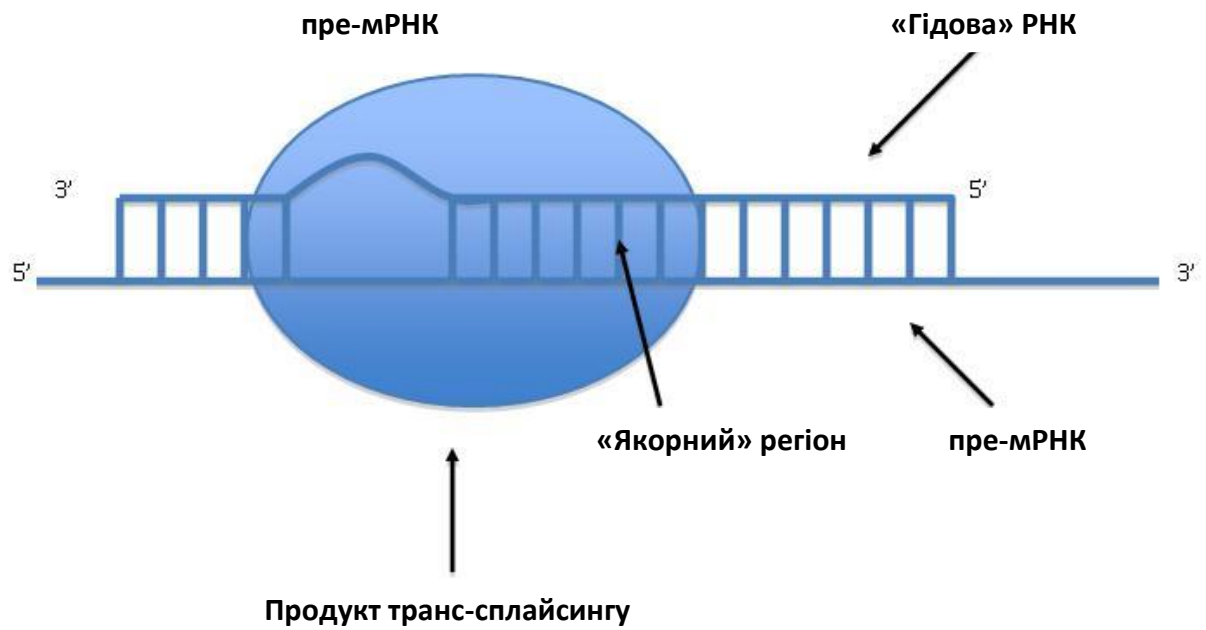


Рис. 168. Схема розташування едитосомного комплексу на пре-мРНК (А) та розміщення та контактів «гідової» РНК у складі едитосоми (Б).

Відомо, що синтез «гідової» РНК для едитосом відбувається на так званих «мінікільцевих» поліцистронних ДНК, причому довші варіанти транскриптів, як правило піддаються нуклеолітичній деградації з 3'-кінця (рис. 169).

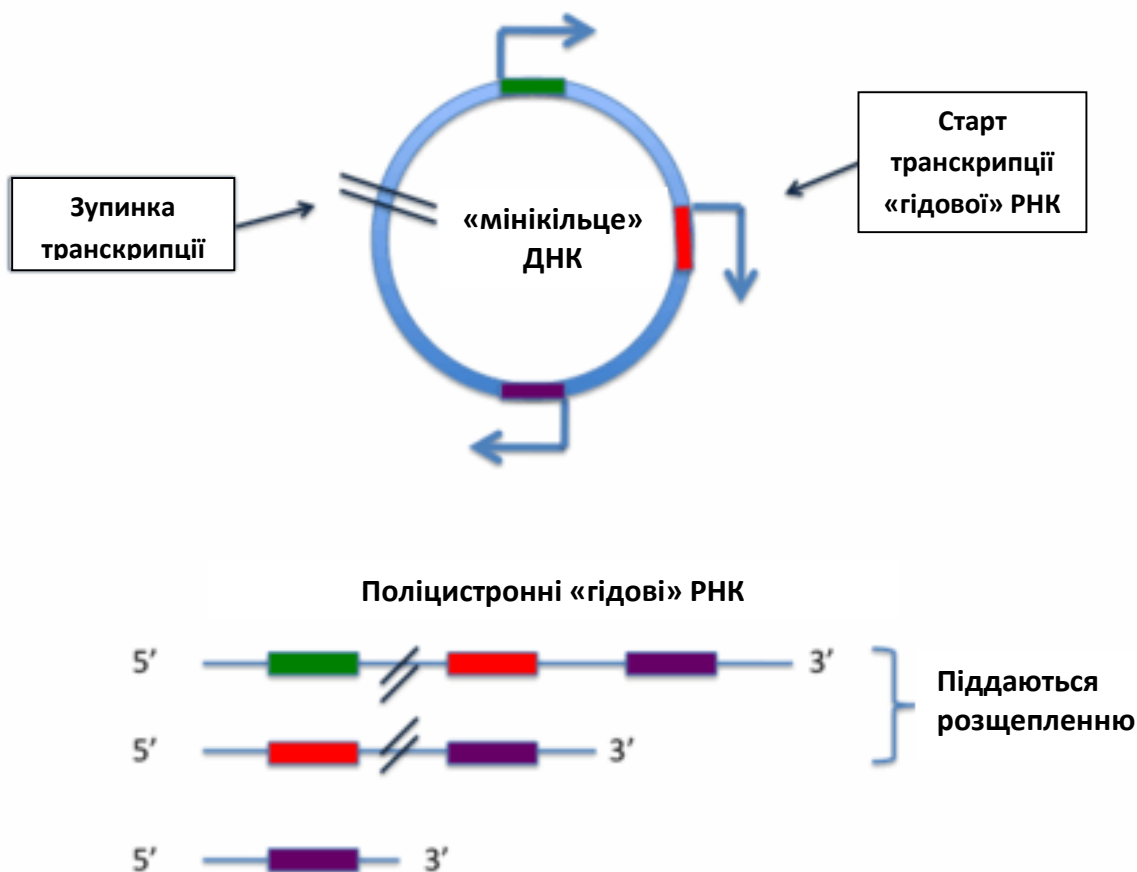


Рис. 169. Схема синтезу та розподіл форм «гідової» РНК.

Прикладом модифікацій за допомогою едитосоми може слугувати **дезамінування цитидину із заміною його на уридин**, яке часто відбувається у мітохондріях найпростіших і хлоропластах рослин та змінює кодуючі властивості багатьох мРНК. Така реакція каталізується, наприклад, едитосомним комплексом **термінальної уридилітрансферази TUT (Terminal Uridyl Transferase, TUTase, КФ 2.7.7.52)** мітохондрій з *Trypanosoma brucei*.

Ще однією модифікацією є **дезамінування аденіну** у певному місці ланцюга з **перетворенням на інозин**, яке відбувається, наприклад, в мРНК різних субодиниць глутамат-залежного Ca^{2+} -каналу нервових клітин ссавців. Редагування такого типу опосередковується активністю спеціальних ферментів – **аденозиндезаміназ** (КФ 3.5.4.4). Вважається, що вони зв'язуються із дволанцюговими «шпильками», які тимчасово формуються під час синтезу мРНК. У складі «шпильок» дезамінази впізнають певні елементи послідовності.

Іншим прикладом є **дезамінування цитидину до уридину в мРНК аполіпропротеїна В, ApoB (Apolipoprotein B)** клітин печінки ссавців. В результаті відбувається **зміна кодону глутаміну на стоп-кодон**. Таким чином, цей білок у гепатоцитах існує у **двох формах** з різною довжиною поліпептидного ланцюга,

причому обидві форми використовуються для транспорту триацилгліцеролів та холестерину кров'ю. Цікаво, що довша ізоформа **Аров** пов'язана з підвищеним ризиком атеросклерозу. **Редагування мРНК Аров**, яке відбувається паралельно з поліаденілюванням, залежить від послідовності мРНК, яка впізнається комплексом білків, серед яких - **специфічна цитидиндезаміназа** (КФ 3.5.4.5).

12.8. Процесинг тРНК

Відомо, що «зрілі» молекули тРНК як про-, так і еукаріот формуються в результаті **процесингу первинних транскриптів тРНК**. У прокаріот такий транскрипт часто містить **декілька попередників майбутньої тРНК**. У процесі свого «дозрівання» вони відщеплюються і піддаються процесингу за рахунок дії рибонуклеаз до отримання кінців потрібної довжини (**рис. 170**).

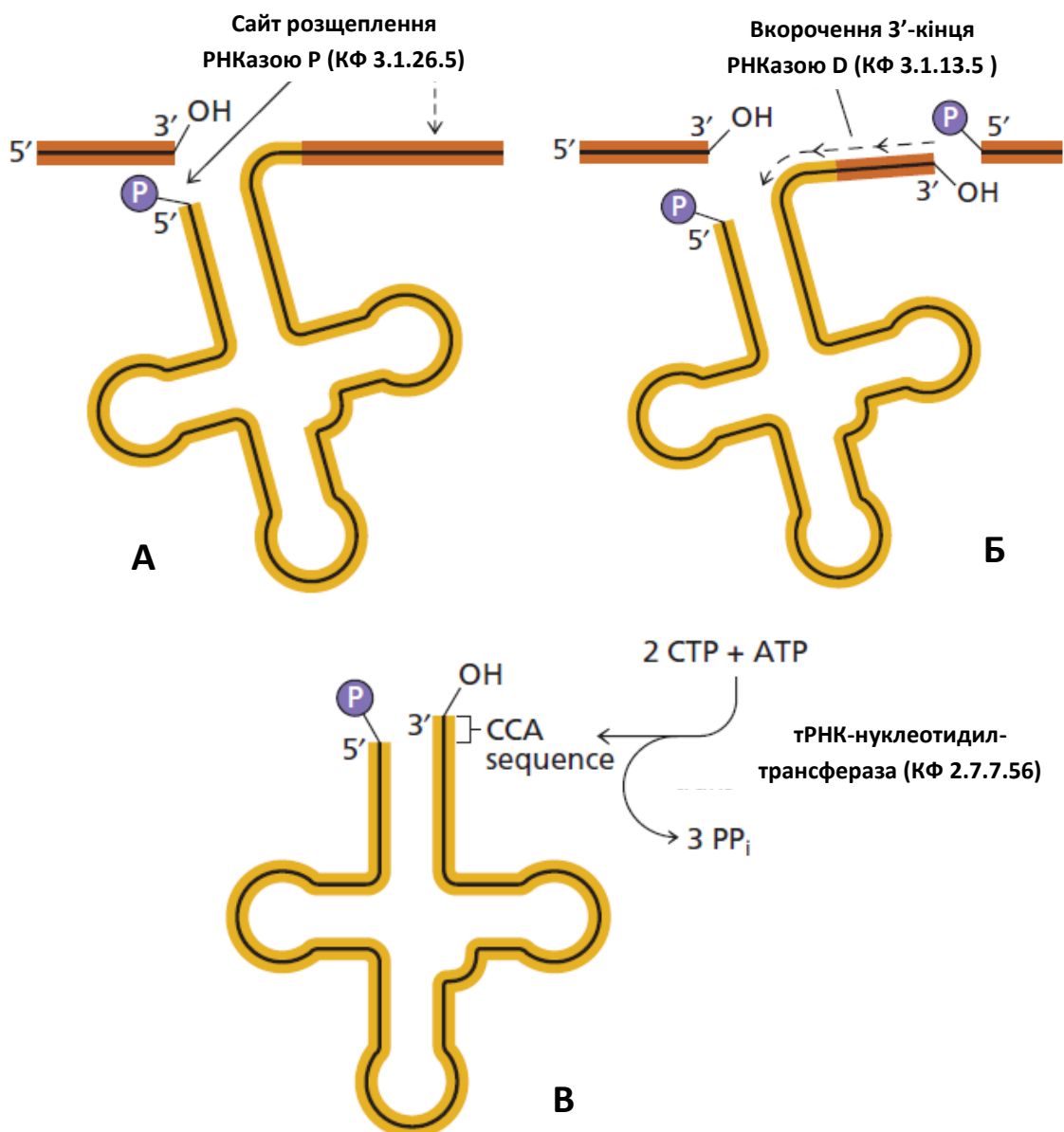


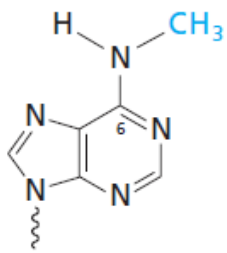
Рис. 170. Стадії процесингу тРНК (пояснення у тексті). Sequence – послідовність.

Напочатку процесингу тРНК фермент **рибонуклеаза Р** (КФ 3.1.26.5) каталізує **відщеплення попередників більшості з тРНК** від первинного транскрипту (**рис. 170, А**). Фермент «розрізає» ланцюг такого транскрипту з обох боків послідовності молекули тРНК, вивільнюючи їх мономерні попередники. Кінці молекули вже є «дозрілими», оскільки **рибонуклеаза D** «вкорочує» їх ще на етапі синтезу на матриці ДНК (**рис. 170, Б**). РНКаза Р є однією з перших детально вивчених специфічних рибонуклеаз. За структурою цей ензим є **рибонуклеопротеїдом**, який у *E. coli* він складається з молекули РНК довжиною у 377 нуклеотидів з молекулярною масою 130 кДа, та невеликої поліпептидної частини – 18 кДа. Встановлено, що за відсутності білку **рибонуклеотидний компонент зберігає нуклеазну активність** за певних умов принаймні *in vitro*. Таким чином, РНКаза Р є прикладом рибозиму (див. розділ 5), до того ж, одного з найперших відкритих молекул цього класу. **Білковий компонент РНКаз Р**, схоже, необхідний лише для пітримання третинної структури РНК у складі ферменту. У 1989 році Сідні Альтман отримав Нобелівську премію за відкриття каталітичної активності РНК-компоненту РНКаз Р.

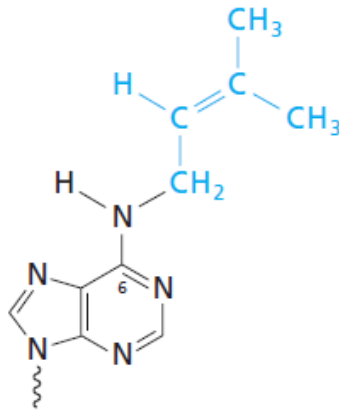
Іншим ферментом, який приймає участь у процесингу тРНК, а саме – кінців мономерного транскрипту, як уже відмічалось, є **рибонуклеаза D** (КФ 3.1.13.5). Цей фермент відноситься до екзонуклеаз і каталізує **послідовне відщеплення рибонуклеотидів з 3'-термінальної ділянки** мономерних попередників тРНК (**рис. 170, Б**).

Нарешті, всі без виключення «дозрілі» молекули тРНК **повинні мати послідовність ССА (CCA-sequence)** на 3'-кінці. У деяких випадках така послідовність додається до молекули уже після транскрипції та інших стадій процесингу. **Приєднання ССА (рис. 170, В)** каталізується тРНК-нуклеотидилтрансферазою (КФ 2.7.7.56). Цей фермент є одним з небагатьох прикладів ензиму, який додає нуклеотиди, що не кодовані геномом.

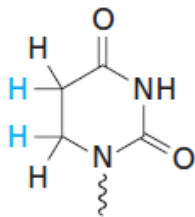
Окрім вищенаведених стадій, процесинг тРНК також ключає в себе **ковалентні модифікації певних основ**. Вже відмічалось, що «зрілі» молекули тРНК мають **найбільший відсоток модифікованих нуклеотидів** серед РНК всіх типів, що складає **до 25% рибонуклеотидів на молекулу**. Кожна з таких модифікацій, переважна частина яких полягає у **метилуванні**, відбувається лише у визначених регіонах молекули (**рис. 171**).



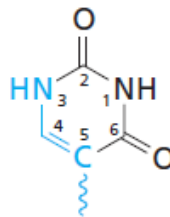
N⁶-Метиладенін (m⁶A)



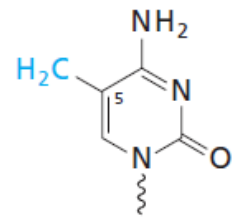
N⁶- Ізопентеніладенін (I⁶A)



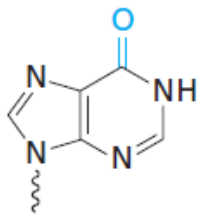
Дигідроуридилат (D)



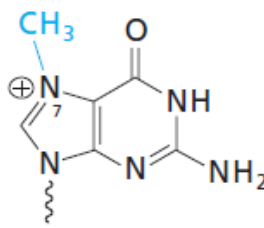
**Псевдоуридилат (ψ)
C5-глікозидний зв'язок
з рибозою**



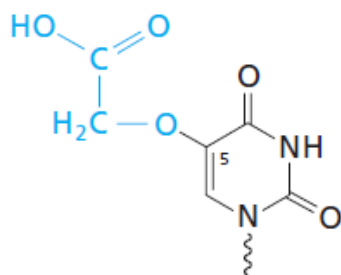
5-метиладенін (m⁵A)



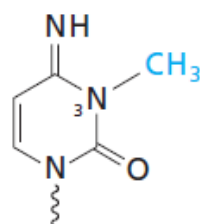
**Гіпоксантин
У складі інозину (I)**



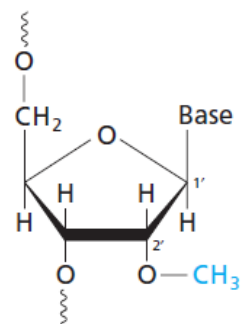
7-метилгуанін (m⁷G)



**Урацил- 5-оксиацетат
(5oU)**



3-метилцитозин (m³C)



**2'-О-метилрибоза
(2'-mR)**

. Рис. 171. Приклади модифікованих компонентів нуклеотидів в тРНК.

12.9. Механізми «дозрівання» рРНК

Молекули рибосомальних РНК всіх організмів синтезуються у якості великих первинних транскриптів, що потребують процесингу для набуття активної форми, включаючи метилювання та розщеплення ендонуклеазами. Такий процесинг, як правило, відбувається синхронно з асоціацією рибосом. Відомо, що первинні транскрипти рРНК прокариот являють собою відносно великі молекули 30S, кожна з яких містить по одній копії 5S, 16S та 23S рРНК. Окрім цього, такі транскрипти можуть також містити попередники тРНК (рис. 172). Оскільки вищенаведені три види рРНК походять з однієї молекули, вони завжди синтезуються у еквімолярних кількостях.

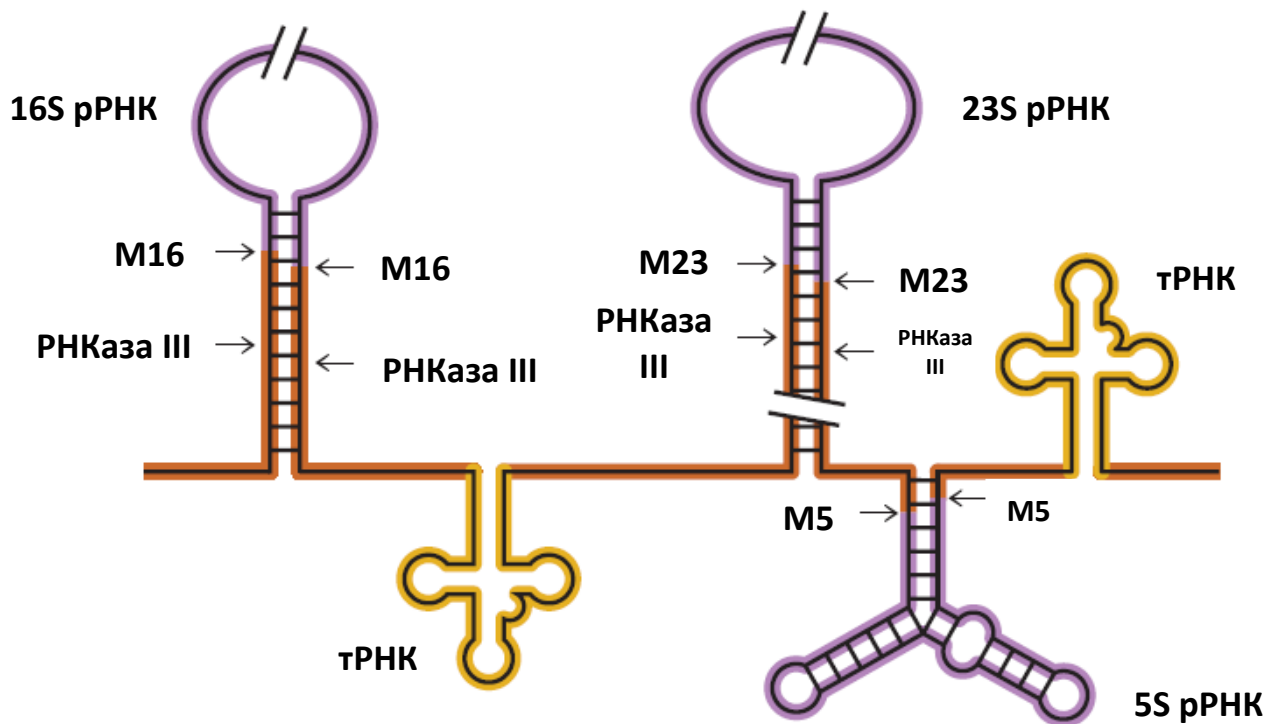


Рис. 172. Схема процесингу первинного транскрипту рРНК прокариот.

Відомо, що 5'- та 3'-термінальні ділянки кожної «зрілої» рРНК, як правило, знаходяться у подвійноланцюгових регіонах первинного транскрипту. У прокариот ці регіони розпізнаються рибонуклеазою III (КФ 3.1.26.3), яка «розрізає» транскрипт біля кінців майбутніх молекул 16S та 23S рРНК. Далі термінальні ділянки цих молекул піддаються процесингу з боку інших специфічних РНКаз (рис. 172).

Майже всі **рибосомальні РНК еукаріот** синтезуються РНК-полімеразою I також у вигляді **єдиної молекули-попередника**. Первинні транскрипти мають розміри **від 35S до 47S** і містять **три еукаріотичні рРНК – 5,8S 18S та 28S**. Четвертий вид, **5S рРНК**, транскрибується **у мономерній формі** РНК-полімеразою III і піддається окремому процесингу. І синтез первинного транскрипту, і перші стадії процесингу відбуваються **у ядерці**. Кожен попередник рРНК перед розщепленням і «дозріванням» кінців приймає **визначену третинну структуру і взаємодіє з деякими рибосомальними білками**.

РОЗДІЛ 13. Деградація нуклеїнових кислот

У даному розділі розглядаються шляхи розщеплення нуклеїнових кислот за допомогою ферментативних та неферментативних механізмів. Також описуються методи використання ферментів деградації РНК та ДНК.

13.1. Загальна характеристика нуклеаз

Ферменти, які каталізують гідроліз фосфодіефірних зв'язків нуклеїнових кислот мають загальну назву – **нуклеази** (КФ 3.1.x.x). Існує велика різноманітність цих ензимів, причому вони присутні у всіх без виключення клітинах. Деякі з них потрібні для синтезу та/або репарації ДНК (див. розділ 8), інші – для процесингу або деградації різних типів клітинних РНК. Певні нуклеази («змішані») діють і на РНК, і на ДНК, але більшість є специфічними лише до одного з видів нуклеїнових кислот. Відповідно до цього, розрізняють **рибонуклеази (РНКази)** та **дезоксирибонуклеази (ДНКази)**. Іншою класифікацією є поділ на екзонуклеази та ендонуклеази. Перші каталізують розщеплення фосфодіефірних зв'язків з вивільненням термінальних нуклеотидних залишків, причому лише одного з певного кінця молекули. Відповідно, вони у свою чергу поділяються на 3'-5'-екзонуклеази та 5'-3'-екзонуклеази, перші з них більш розповсюджені. Ендонуклеази здійснюють гідроліз фосфодіефірних зв'язків, але діють на різноманітні сайти саме всередині ланцюга нуклеїнових кислот. Є види нуклеаз – так звані рестриктази, які мають спорідненість лише до специфічних послідовностей, про ці ферменти мова піде нижче. Загалом же нуклеази характеризуються дуже широким спектром специфічності.

Нарешті, відомо, що нуклеази можуть атакувати лише один з складноефірних зв'язків між нуклеотидами, розташований ближче до 5'-кінця або до 3'-кінця у фосфодіефірній структурі. Таким чином, продуктами таких ферментів будуть або ділянки ланцюгів з 5'-монофосфатами і 3'-гідроксилами, або з 3'-монофосфатами і 5'-гідроксильними групами (**рис. 173**).

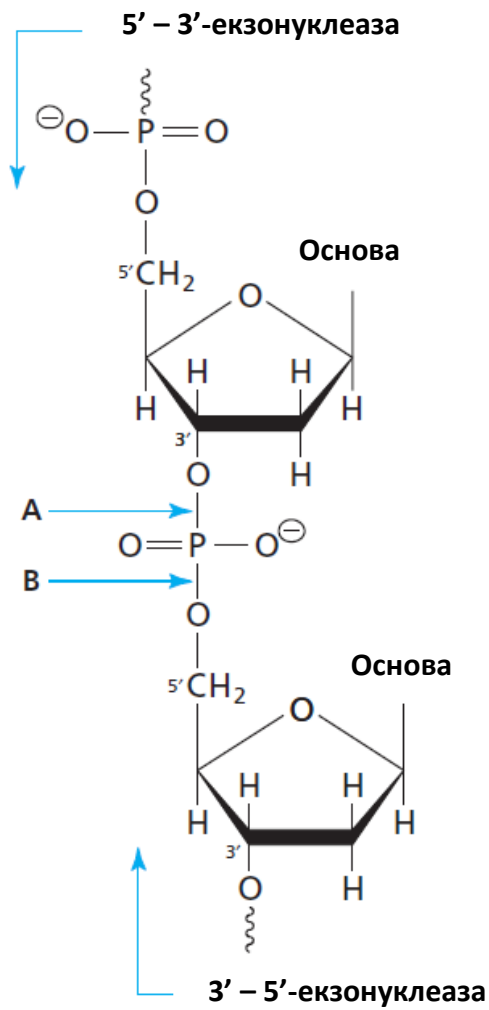


Рис. 173. Сайти розщеплення ДНК різними видами нуклеаз.

У табл. 28 та 29 представлені основні види нещодавно відкритих нуклеаз.

Таблиця 28. Рибонуклеази.

Фермент	КФ	Функція
Ендорибонуклеази		
Рибонуклеаза А	3.1.27.5	Класична, формує 3'-фосфорильовані продукти через формування циклічних нуклеотид-2'-3'-фосфатів. «Розрізає» о/н ділянки РНК в місцях локалізації С та U.
Рибонуклеаза Н	3.1.26.4	Специфічна до гібриду РНК-ДНК, формує о/н ділянки ДНК (ssDNA). Після гідролізу залишає 5'-фосфопродукти.
Рибонуклеаза І	3.1.х.х	Атакує зв'язок біля 3'-положення о/н РНК, залишаючи 3'-фосфопродукти через формування циклічних нуклеотид-2'-3'-фосфатів.
Рибонуклеаза III	3.1.26.3	Атакує 16S та 23S рРНК поліцистронного попередника. Розщеплює д/н РНК (dsRNS, DicerRNase), перетворюючи пре-мікроРНК на коротші мікроРНК, які приймають участь у контролі тривалості життя мРНК.
Рибонуклеаза L	3.1.26.х	Індукується інтерфероном, «знищує» всі РНК.
Рибонуклеаза Р	3.1.26.5	Рибозим, здійснює процесинг транскриптів тРНК.
Рибонуклеаза Р_уМ	3.1.х.х	Специфічна до о/н РНК. Відщеплює неспарені нуклеотиди А та U біля 3'-положення РНК.
Рибонуклеаза T1	3.1.27.3	Специфічна до послідовностей о/н РНК. Відщеплює неспарені нуклеотиди G ближче до 3'-положення.
Рибонуклеаза T2	3.1.27.1	Специфічна до послідовностей о/н РНК. Відщеплює неспарені нуклеотиди всіх чотирьох типів у 3'-положенні, віддаючи перевагу А.
Рибонуклеаза U2	3.1.27.4	Специфічна до послідовностей о/н РНК. Відщеплює неспарені нуклеотиди А ближче до 3'-положення.
Рибонуклеаза V	3.1.27.8	Неспецифічно «атакує» д/н РНК, відщеплюючи пари основ.

Екзорибонуклеази		
Полінуклеотид-фосфорилаза	2.7.7.8	Виконує фосфороліз РНК. Функціонує як нуклеаза і нуклеотидилтрансфераза одночасно.
Рибонуклеаза РН	2.7.7.56	Виконує фосфороліз РНК. Функціонує як нуклеаза і нуклеотидилтрансфераза одночасно.
Рибонуклеаза II	3.1.x.x	Здійснює деградацію 3'- та 5'-кінців під час процесингу о/н РНК.
Рибонуклеаза R	3.1.x.x	Близька до РНКазы II, але може розщеплювати також і д/н РНК.
Рибонуклеаза D	3.1.13.5	Займається процесингом 3'- та 5'-кінців пре-тРНК.
Рибонуклеаза T	3.1.x.x	Виконує процесинг 3'- та 5'-кінців більшості РНК.
Олігорибонуклеаза	3.1.13.3	Виконує деградацію коротких олігонуклеотидів.
Екзорибонуклеаза I	3.1.11.1	Еукаріотична, розщеплює о/н РНК з обох кінців.
Екзорибонуклеаза II	3.1.13.1	Еукаріотична, розщеплює о/н РНК з обох кінців.

Таблиця 29. Приклади дезоксирибонуклеаз та «змішаних» нуклеаз.

Фермент	КФ	Функція
Дезоксирибонуклеаза I	3.1.21.1	Розщеплює д/н ДНК в місцях локалізації піримідинових нуклеотидів. Формує 5'-фосфатні продукти.
Дезоксирибонуклеаза II	3.1.22.1	Розщеплює нативну і денатуровану д/н ДНК. Формує 3'-фосфатні продукти.
Дезоксирибонуклеаза IV	3.1.21.2	«Атакує» AP-сайти з утворенням олігонуклеотидів з фосфатами на 5'-кінці.
Ендонуклеаза UvrABC	3.1.x.x	Універсальна репараційна нуклеаза. Приймає участь у репарації повздожніх «зшивок» та ексцизійній репарації нуклеотидів
Екзонуклеаза V RecBCD	3.1.11.5	Специфічна до о/н ДНК. Має геліказну і нуклеазну активності, приймає участь у репарації д/н розривів ДНК.

Нуклеаза <i>Micrococcus</i>	3.1.31.1	Розщеплює о/н ДНК та РНК з вивільненням 3'-фосфатів моно- та олігонуклеотидів. Більш споріднена до АТ-трактів.
Нуклеаза S1 <i>Aspergillus</i>	3.1.30.1	Розщеплює о/н ДНК та РНК з вивільненням 5'-фосфатів моно- та олігонуклеотидів.

13.2. Лужний гідроліз РНК

Різниця між структурою рибози та 2'-дезоксирибози, хоча і здається незначною на перший погляд, тим не менше, сильно впливає на властивості нуклеїнових кислот. **Гідроксильна група у положенні С2' рибози** може формувати водневі зв'язки, що важливо для певних хімічних та ферментативних реакцій за участю РНК. Особливо чітко ефект присутності або відсутності 2'-гідроксилу щодо фізико-хімічних властивостей розчинів ДНК та РНК ілюструється чутливістю нуклеїнових кислот до лужного гідролізу. Так, **РНК під впливом 0,1 М NaOH** за кімнатної температури **розщеплюється** за декілька годин до суміші 2'- та 3'-монофосфатів **рибонуклеозидів**, в той час як **ДНК** за цих же умов **зберігає свою структуру**. Таким чином, для здійснення лужного гідролізу РНК (**рис. 174**) потрібна наявність **гідроксилу у положенні С2' рибози**.

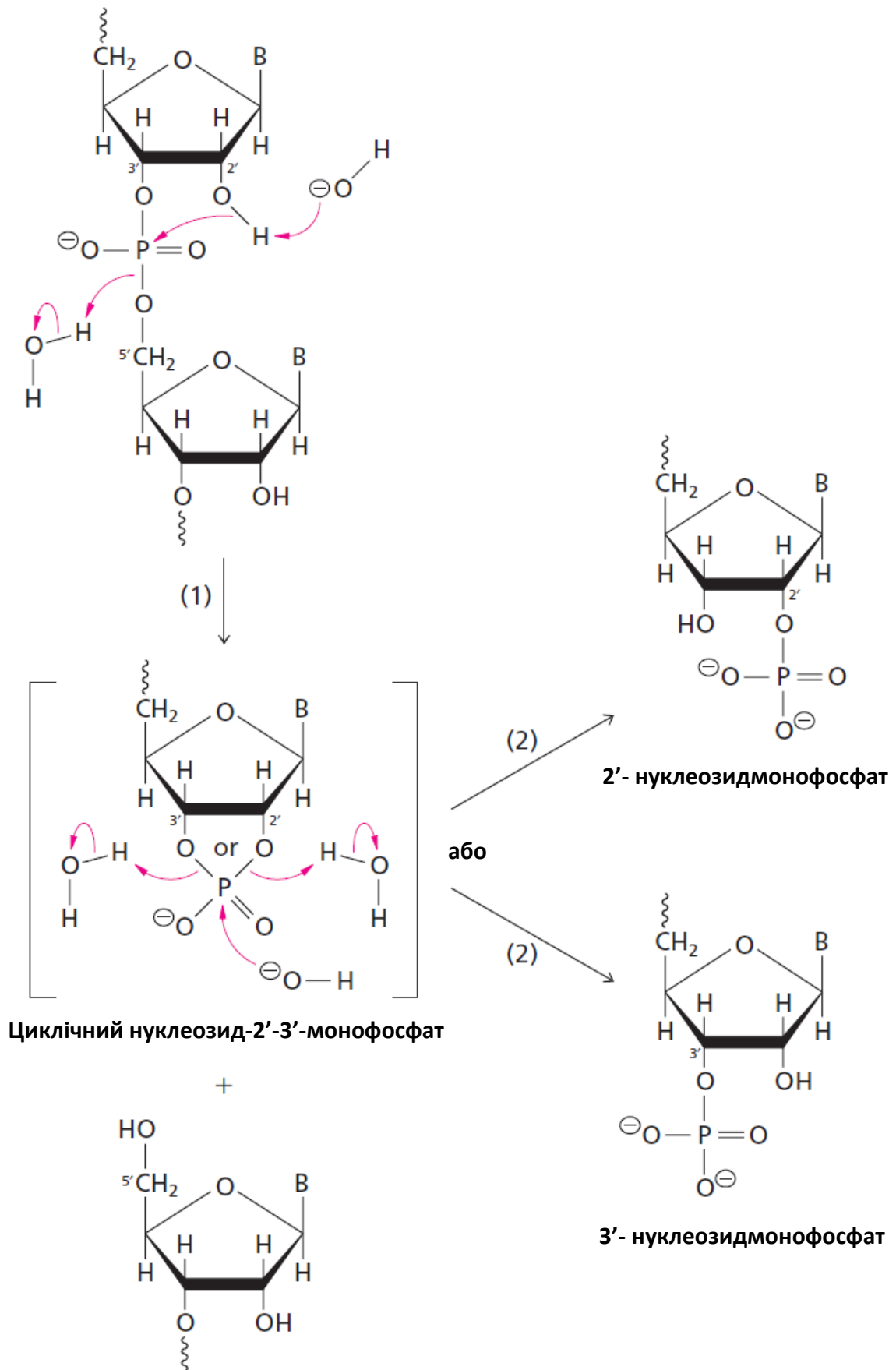


Рис. 174. Схема лужного гідролізу РНК (пояснення у тексті).

Механізм **лужного неферментативного гідролізу** функціонує наступним чином (**рис. 174**). На **стадії 1** гідроксид-йон приймає на себе протон з 2'-гідроксильної групи нуклеотидного залишку. Утворюється так званий **алкоксид**, який нуклеофільно атакує прилеглий атом фосфору, займаючи місце атома кисню у 5'-положенні, і, тим самим, індукуючи утворення **циклічного нуклеозид-2'-3'-монофосфату**. Такий циклічний інтермедіат є нестабільним у лужному середовищі, тому, на **стадії 2**, інший гідроксид-йон сприяє перетворенню цієї структури на **рибонуклеозид-2'-монофосфат або рибонуклеозид-3'-монофосфат**. «В» на схемі **рис. 174** репрезентує собою пуринову або піримідинову основу.

Отже, на першій та другій фазі гідролізу РНК в лужних умовах гідроксидні йони діють лише **за механізмом кислотного каталізу**, оскільки «захоплення» протону від молекули води для формування 5'-гідроксилу на першій стадії або 2'- чи 3'-гідроксилу на другій, призводить до регенерації витрачених гідроксид-йонів. Варто відмітити також формування циклічного нуклеозид-2'-3'-монофосфату на першій стадії. Таким чином, в **лужних умовах полірибонуклеотидний ланцюг швидко деполімеризується** за рахунок неферментативного гідролізу фосфодієфірних зв'язків між нуклеотидами. **ДНК не піддається лужному гідролізу**, оскільки не має гідроксильної групи у положенні С2' дезоксирибози, а ця група є критичною для ініціації внутрішньомолекулярної трансестерифікації. Таким чином, **ДНК має більшу хімічну стійкість, ніж РНК**, що, можливо, і стало однією з основних причин вибору саме ДНК у якості первинної основи генетичного матеріалу.

13.3. Гідроліз РНК рибонуклеазою А

Панкреатична РНКаза А бика (РНКаза А, КФ 3.1.27.5) складається з єдиного поліпептидного ланцюга довжиною 124 амінокислотних залишки та містить чотири внутрішньоланцюгові дисульфідні зв'язки. Оптимальне значення рН для цього ферменту становить близько 6. РНКаза А каталізує розщеплення фосфодієфірних зв'язків в РНК з боку положення С5', тобто **утворюються 3'-фосфорильовані продукти**. Розщеплення відбувається, як правило, поруч з піримідиновим нуклеотидом (**табл. 28**). РНКаза А містить **три заряджених амінокислоти** у своєму активному сайті – **Lys-41, His-12 та His-119**. Бічні радикали цих амінокислот безпосередньо наближені до місця зв'язування субстрату. Механізм каталізу розщеплення РНК цим ферментом вже розшифровано, він є прикладом дії більшості нуклеаз (**рис. 175**). Встановлено, що у процесі каталізу РНКаза А використовує **три фундаментальні види каталізу**:

- 1) Наближення і позиціонування** – шляхом приєднання та визначення орієнтації потрібного фосфодієфірного зв'язку у активному сайті між двома вищенаведеними залишками гістидину,
- 2) Кислотно-основний каталіз** – здійснюється за допомогою His-12 та His-119,
- 3) Стабілізація перехідного стану субстрату** завдяки Lys-41.

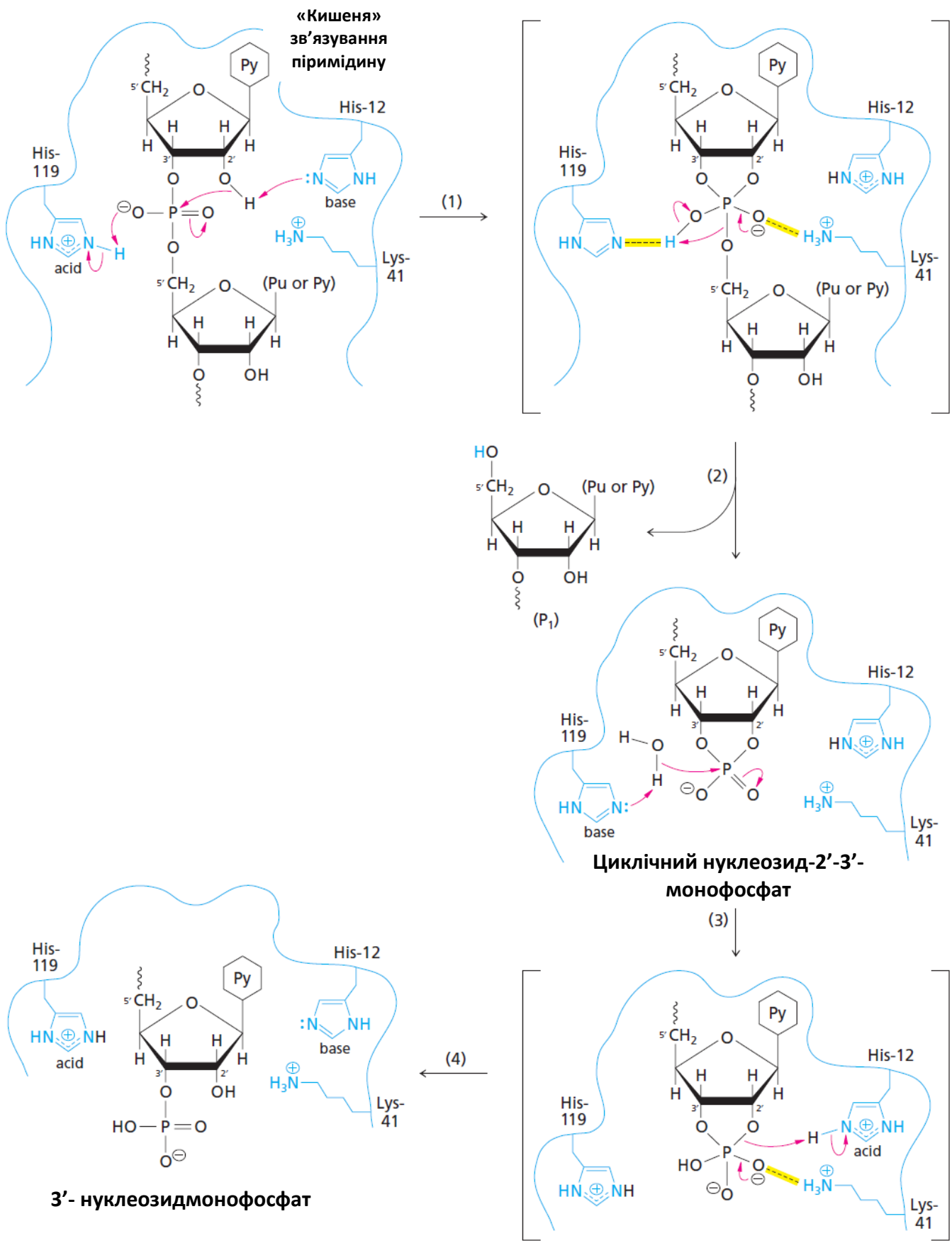


Рис. 175. Механізм гідролізу субстрату РНКазою А (пояснення у тексті).

На **першому етапі** реакції **His-12** у формі основи (base) «забирає» протон з 2'-гідроксильної групи попереднього по відношенню до зв'язку піримідинового нуклеотиду. Внаслідок цього з'являється **активний нуклеофільний атом кисню**, який «атакує» прилеглий до нього атом фосфору (**рис. 175, 1**). Далі **His-119** у вигляді кислотного йону імідазолу (acid) «віддає» свій протон на кисень у положенні C5' наступного нуклеотиду у зв'язку, що призводить до розриву останнього з формуванням **першого продукту реакції** – ланцюга РНК з гідроксилом на 5'-кінці (**рис. 175, 2**) через утворення **першого перехідного стану** (**рис. 175, 1**). З іншої частини молекули субстрату на **стадії 2** формується **3'-термінальний циклічний нуклеотид-2'-3'-монофосфат**. Після цього у дію вступає молекула води, яка, потрапляючи до активного сайту на стадії 3, одночасно з вивільненням першого продукту, піддається «атаці» з боку залишку **His-119** у формі основи (base), який «забирає» протон з утворенням **гідроксид-йону**. Цей гідроксид-йон, у свою чергу, «атакує» атом фосфору для формування **другого перехідного стану** (**рис. 175, 3**). Нарешті, на **стадії 4** імідазольне кільце **His-12** у формі кислоти (acid) «віддає» один протон на атом кисню у положенні C2', що призводить до утворення **другого продукту реакції** – ланцюга РНК з фосфатом на 3'-кінці (**рис. 175, 4**). Р_и та Р_у на рисунку означають пуринову і піримідинову основи відповідно.

Таким чином, як і за лужного гідролізу РНК (див. попередній підрозділ), у ході повної реакції відбувається **формування двох продуктів** – одного з **вільною гідроксильною групою на 5'-кінці**, а іншого – з **3'-термінальним фосфатом**. Вода входить у активний сайт ферменту одразу після вивільнення першого з продуктів. Варто відмітити, що у ферментативно каталізованій реакції гідролізу **атом фосфору за першого перехідного стану субстрату має п'ять ковалентних зв'язків** (**рис. 175**). «Кишеня» приєднання піримідинів у складі активного сайту ензиму слугує для забезпечення його **специфічності**.

Розглянуті вище неферментативний та ферментативний види гідролізу РНК відрізняються один від одного у **двох важливих аспектах**. По-перше, **лужному гідролізу** може піддатися фосфодієфірний зв'язок **між будь-якими сусідніми нуклеотидами** в молекулі РНК, в той час як **гідроліз РНКазою А** здійснюється переважно лише у місцях **присутності піримідинових рибонуклеотидів**. По-друге, **гідроліз циклічного інтермедіату** у першому випадку відбувається **стохастично**, даючи суміш продуктів з 2'- та 3'-фосфатними групами, коли як **у другому** є суворо специфічним – утворюються лише **продукти, фосфорильовані з 3'-кінця**.

13.4. Ендонуклеази рестрикції

Ендонуклеази рестрикції, або рестриктази (restrictases) є важливим підкласом ендонуклеаз, **специфічних до певних послідовностей** в молекулах ДНК. Сам термін «**рестрикційна ендонуклеаза**» походить з відкритого дослідниками явища

пригнічення процесу інфікування бактеріофагами з боку певних видів бактерій, шляхом специфічного руйнування ДНК бактеріофагу всередині клітини бактерії. Таким чином, така бактерія обмежує (**to restrict, з англійської– обмежувати, попереджати**) експресію чужорідної ДНК. Відомо, що рестриктази **синтезуються широким колом бактерій**, і слугують **механізмом захисту останніх від вірусів**. Ці ендонуклеази **розпізнають специфічні послідовності ДНК** і розщеплюють обидва її ланцюги у місці зв'язування, що дає великі фрагменти молекул, які швидко розщеплюються екзонуклеазами, які атакують сформовані вільні кінці ланцюгів. Таким чином, геном бактеріофагу елімінується до появи можливості його експресії.

Варто відмітити, що клітини бактерій мають **механізми захисту свого геному і від власних рестриктаз**. Це досягається шляхом **ковалентних модифікацій основ**, які входять у потенційні сайти рестрикції. Найпоширенішою з таких модифікацій є **специфічне метилювання аденіну або цитозину** в межах сайту зв'язування рестриктаз (див. розділ 1). Присутність метильованих основ у сайтах рестрикції **блокує розщеплення ДНК хазяїна** з боку рестрикційної ендонуклеази. При чому, під час метилювання **мішенню дії специфічних метилаз** є сайт зв'язування з такими ендонуклеазами на ДНК (**рис. 176, А**). Таким чином, клітини, які містять рестриктази, як правило, мають і метилази ідентичної специфічності. За умов норми майже вся **ДНК клітини-хазяїна специфічно метильована** і таким чином захищена від розщеплення. Отже, будь-який **неметильований ланцюг**, що з'являється в клітині, **гідролізується ендонуклеазами рестрикції** (**рис. 176, Б**). Після реплікації кожен сайт ДНК хазяїна **напівметилювано**, тобто, з двох ланцюгів метильні групи має лише один –матричний. Такі **напівметилювані сайти є високоафінними субстратами для метилаз**, але взагалі не розпізнаються рестриктазами. Це забезпечує швидке перетворення напівметилюваних ділянок на повністю метильовані регіони ДНК.

Більшість ендонуклеаз рестрикції, які ще називають рестрикційними ферментами, **класифікують за типами I та II**. Представники першого каталізують як **метилювання ДНК хазяїна**, так і **розщеплення** неметильованої чужорідної ДНК за специфічними послідовностями розпізнавання. **Рестриктази типу II** можуть лише **розщеплювати** двохланцюгову ДНК у межах або біля сигнального сайту, а **метилязної активності взагалі не мають**. Таким чином, у цьому випадку метилювання та рестрикція здійснюються різними ферментами за ідентичними сайтами, тобто, **поряд з ендонуклеазами також діють специфічні метилази рестрикції**. Незалежно від типу рестриктази, всі вони у якості **донора метилу** використовують **S-аденозилметіонін**. На сьогодні охарактеризовано вже сотні рестриктаз обох типів, сайти специфічності деяких з них наведено у **табл. 28**. Як видно з таблиці, майже у всіх випадках такі сайти мають **двовимірну симетрію**, тобто, «читаються» однаково у обох ланцюгах за умови вибору одного напрямку «зчитування». Відповідно до цього, спаровані послідовності можна «прочитати» ідентично у будь-якому з двох можливих напрямків – такі послідовності носять назву **паліндромів (palindromes)**.

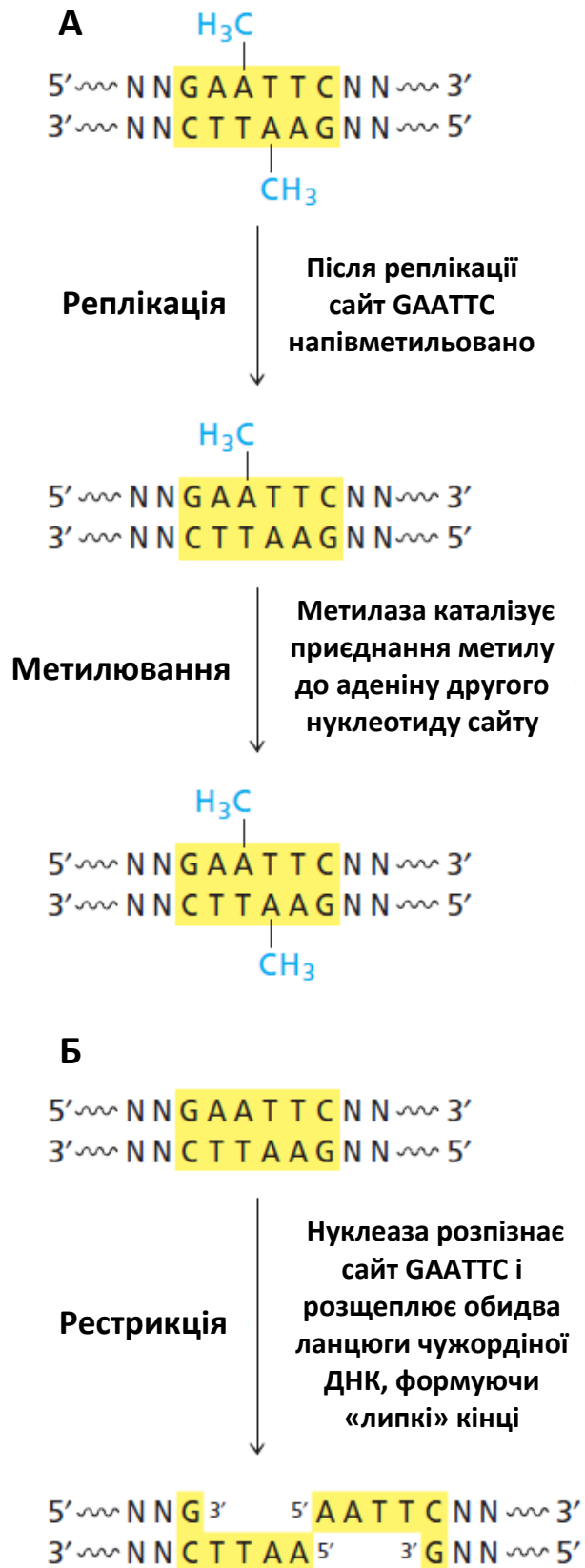


Рис. 176. Метилування власної ДНК після реплікації **(А)** і розщеплення чужорідної **(Б)**.

Однією з найперших відкритих рестриктаз була **EcoRI**. Вона присутня у багатьох штаммах *E.coli*, на **рис. 176** представлено її паліндром-мішень. Відомо, що EcoRI є гомодимером, який, так само, як і субстрат, має **двохсторонню симетрію**. Показано, що в *E. coli* існує також кооперативна з цією рестриктазою **метилаза**, яка перетворює другий з 5'-кінця паліндрому **аденін на 6-метиладенін (табл. 30)**. Відповідно, потенційним субстратом EcoRI може бути будь-яка подвійноланцюгова молекула ДНК з **неметильованою послідовністю складу GAATTC**. В ній ця ендонуклеаза каталізує **гідроліз фосфодиефірих зв'язків на обох ланцюгах одночасно**, між нуклеотидами, що містять **гуанін та аденін**.

Таблиця 30. Рестрикційні ендонуклеази бактерій

Джерело	Фермент*	Сайт розпізнавання**
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Apa I</i>	GGGCCC↓C
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>BamHI</i>	G↓GATCC
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>EcoRI</i>	G↓AA*TTC
<i>Escherichia coli</i> R245	<i>EcoRII</i>	↓CC*TGG
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	GG↓CC
<i>Haemophilus influenza</i> R _d	<i>HindIII</i>	A*↓AGCTT
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>HpaII</i>	C↓CGG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>KpnI</i>	GGTAC↓C
<i>Nocardia otitidis-caviarium</i>	<i>NotI</i>	GC↓GGCCGC
<i>Providencia stuartii</i> 164	<i>PstI</i>	CTGCA↓G
<i>Serratia marescens</i> S _b	<i>SmaI</i>	CCC↓GGG
<i>Xanthomonas badrii</i>	<i>XbaI</i>	T↓CTAGA
<i>Xanthomonas holcicola</i>	<i>XhoI</i>	C↓TCGAG

* - назви рестриктаз є аббревіатурами видових назв організмів, які їх продукують. Літера після аббревіатури у назві означає штам бактерії. Римські цифри показують порядок відкриття ферменту у штамі.

** - розпізнавальні послідовності написані у напрямку 5'-3' лише у одному ланцюзі. Стрілками вказано сайти розщеплення. Зірочками відмічено сайти потенційного метилювання.

Варто відмітити, що деякі рестриктази, наприклад, **EcoRI**, **BamHI** або **HindIII**, каталізують **несиметричне, так зване «хитке» розщеплення (staggered cleavage)**, у такому випадку кінці обох ланцюгів з однієї сторони розрізу мають різну довжину, тобто, існують **одноланцюгові подовжені ділянки (рис. 176, Б)**. Такі ділянки називають **«липкими» кінцями**, оскільки вони є комплементарними і можуть знову поєднатися у подвійноланцюгову спіраль. Інші види рестрикційних ендонуклеаз, такі як **HaellI** або **SmaI**, каталізують формування **«тупих» кінців**, які, завдяки **симетричному розташуванню розрізів**, мають **однакову довжину** на обох ланцюгах.

13.5. Особливості зв'язування ендонуклеаз рестрикції з ДНК

Для виконання своєї функції рестриктази повинні бути **міцно зв'язаними з ДНК** для **розпізнавання і розщеплення** специфічних послідовностей. Структура **комплексу ДНК з EcoRI** була визначена за допомогою кристалографії. Було встановлено, що кожна субодиниця гомодимеру приєднується до ДНК з обох боків так, що молекула майже «оточена» ендонуклеазою. Фермент «впізнає» специфічну послідовність шляхом формування контактів з гранями відповідних основ у великій борозенці, тобто, через пряме «зчитування». У цей час мала борозенка контактує з водним оточенням. **Специфічність приєднання** ендонуклеази забезпечується трьома амінокислотними залишками - **Arg-145, Arg-200, а також Glu-144** – які в кожному мономері утворюють водневі зв'язки з парами основ у складі паліндрому. До стабілізації комплексу залучено також і **неспецифічні взаємодії**. Так, відомо, що низка **позитивно заряджених амінокислот**, які знаходяться у «щілині» між двома мономерами EcoRI, формує **електростатичні контакти** з цукрово-фосфатним кістяком ДНК.

Загалом, EcoRI є прикладом білку, який **приєднується до ДНК завдяки специфічним контактам**, формування яких залежить від наявності **певної послідовності нуклеотидів** у ланцюзі. Виявлено, що у комплексі з рестриктазою ДНК зберігає свою В-форму, хоча у деяких випадках спостерігаються невеликі вигини хеліксу. **Розпізнавання специфічного паліндрому** залежить від **взаємодій між бічними радикалами амінокислот білку та функціональними групами основ**, що доступні у регіоні великої борозенки. Це різко контрастує з способом **неспецифічного контакту ДНК з білками**, наприклад, **гістонами** (див. розділ 7). Приєднання останніх залежить, в основному, від **електростатичних взаємодій між білком та цукрово-фосфатним кістяком**, а не від прямих контактів з основами. Нарешті, всі відомі на сьогодні види білків, що, як і EcoRI та інші ендонуклеази рестрикції, специфічно зв'язуються з послідовностями у складі хроматину, також формують і менш споріднені контакти з нативною безбілковою ДНК.

13.6. Використання рестриктаз

Рестрикційні нуклеази відомі людству вже 45 років – у 1978 році Вернер Арбор, Деніел Нетенс та Гамільтон Сміт отримали Нобелівську премію за «відкриття ензимів рестрикції та їх застосування у вирішенні проблем молекулярної генетики». Починаючи з того часу очищені рестриктази впевнено займають місце **важливих інструментів маніпуляції ДНК** в лабораторії.

Одним з перших способів використання нуклеаз рестрикції було створення так званих **рестрикційних карт**, тобто, діаграм ДНК з **локалізацією специфічних сайтів розщеплення** у їх складі, яке увійшло у історію як **генетичне картування**. Такі карти виявилися корисними для **ідентифікації фрагментів ДНК**, які містять певні гени. Приклад типової **карти рестрикції ДНК бактеріофага λ** представлений на **рис. 177**.

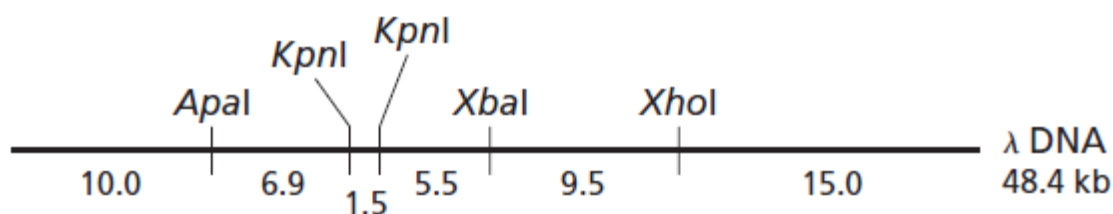


Рис. 177. Карта рестрикції ДНК бактеріофага λ .

Відомо, що геном бактеріофага λ представлений **лінійною подвійноланцюговою молекулою ДНК** довжиною 48,4 тис. пар основ. Шляхом обробки цієї молекули різними ендонуклеазами рестрикції і виміру розмірів отриманих фрагментів можна створити **карту сайтів розщеплення**, як на **рис. 177**. Електрофореграма таких фрагментів показана на **рис. 178**.

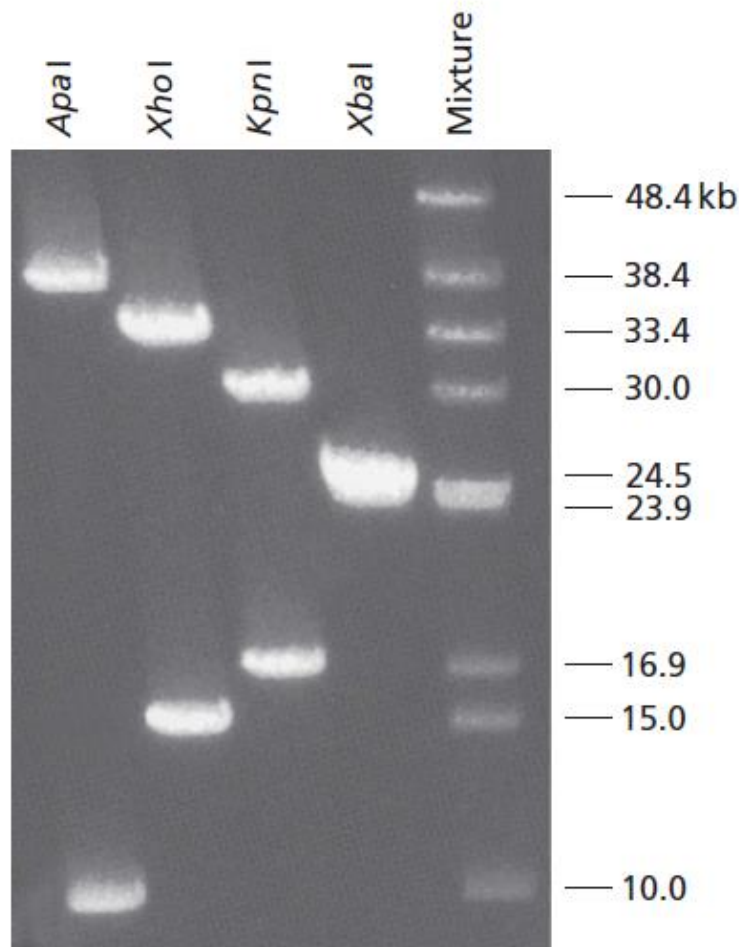


Рис. 178. Електрофореграма фрагментів ДНК бактеріофага λ , отриманих під дією різних рестриктаз. kb – тисячі пар основ (kilo bases), Mixture – суміш маркерів.

У ході електрофоретичного методу ідентифікації фрагментів полідезоксирибонуклеотидів розчин ДНК спочатку піддається дії відповідних ферментів для отримання перших. Далі проби піддаються електрофорезу у агарозному гелі, в ході якого наявні фрагменти розділяються за розміром (довжиною). Найменші з них рухаються найшвидше, тому в кінці розділення знаходяться в найнижчій частині електрофоретичної пластинки, а, отже, і електрофореграми, яку отримують, забарвлюючи та висушуючи гель. Розміри фрагментів оцінюють за співвідношенням отриманих плям на електрофореграмі з плямами маркерів з відомими молекулярними масами у суміші, яку наносять на окрему доріжку (рис. 178). Таким чином, завдяки електрофоретичному аналізу ДНК після рестрикції, за локалізацією рестрикційних сайтів можна виявити положення фрагментів і створити повну і точну рестрикційну карту.

Технологія картування сайтів рестрикції була вперше впроваджена в кінці 70-их років минулого сторіччя. Скоро стало зрозумілим, що цей підхід можна використати для ідентифікації сайтів мутацій на рівні геному одного організму або навіть цілих

популяцій. Наприклад, навіть штами бактеріофага одного типу характеризуються трохи різними картами рестрикції, оскільки послідовності ДНК не повністю ідентичними. Так, один штам бактеріофагу λ може мати в геномі послідовність **GGGCCC** і тому розщеплюється за допомогою рестриктази **ApaI**, що дає два фрагменти, показані на **рис. 178**. В той же час ДНК іншого штаму цього ж бактеріофагу матиме послідовність **GGACCC**, локалізовану точно на місці першого паліндрому. Рестрикційна карта у цьому випадку буде відрізняться від вказаної на рисунку, оскільки цей сайт не є мішенню **ApaI**. Таким чином, **подібні варіації у послідовностях ДНК** можливо використати для **ідентифікації індивідуальних організмів** у популяції. Наприклад, у людей високоваріабельні регіони геному дають рестрикційні фрагменти, що характеризуються індивідуальністю відбитків пальців, тобто, майже не повторюються. Отже, такі **«відбитки» ДНК** можна використати, скажімо, для вирішення суперечок зі встановлення батьківства або ж для ідентифікації підозрюваних у кримінальних розслідуваннях. Наприклад, «відбитки» ДНК були використані у справі про згвалтування. Зокрема, ДНК жертви злочину, а також речові докази у вигляді генетичного матеріалу двох підозрюваних (особа А та особа Б) були **піддані дії певних рестриктаз**. Згодом отримані фрагменти розділили за допомогою **електрофорезу у агарозному гелі (рис. 179)** за методикою, описаною вище. Далі ДНК було перенесено **методом блотингу** на нейлонову мембрану і **денатуровано**. Після цього **одноланцюгові фрагменти гібридизували з ділянками ДНК, «міченими» радіоактивно**, які походять з варіабельних неповторюваних регіонів геному людини. «Мічені» фрагменти зв'язувалися лише з тими ділянками ДНК, які мали **високий ступінь комплементарності**. Нарешті, гібридизовані регіони **ідентифікували** за допомогою **радіоавтографії**. Таким чином було з високим ступенем вірогідності виявлено, що злочинцем є особа А. Як правило, у подібних розслідуваннях використовується **велика кількість різних проб у комбінації з різними ендонуклеазами рестрикції для впевненості в унікальності отриманих послідовностей**. На сьогодні сучасні методи «відбитків» ДНК є достатньо точними і потужними для виявлення потрібних послідовностей з достатньою ефективністю. Якщо дослідного матеріалу замало, використовується **полімеразна ланцюгова реакція для ампліфікації наявної ДНК**.

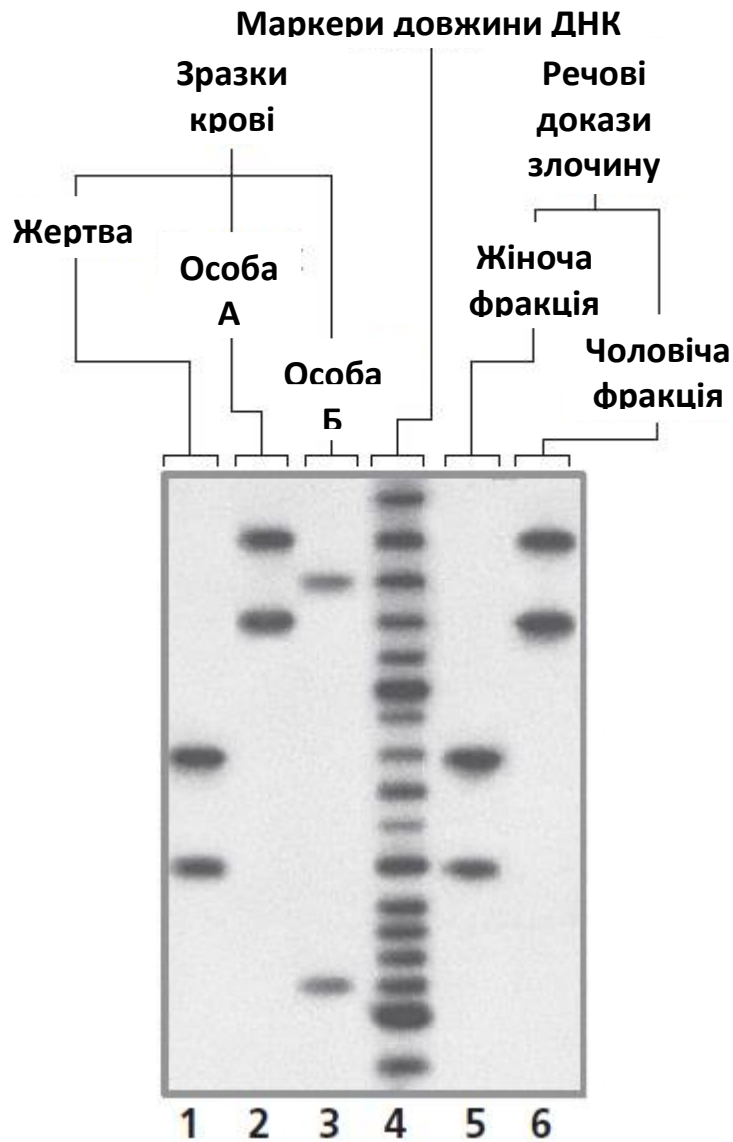


Рис. 179. Приклад використання методики «відбитків» ДНК (пояснення у тексті).

Відкриття ендонуклеаз рестрикції дуже скоро привело до створення ще одного методу, який дуже широко використовується і інтенсивно розвивається і сьогодні, а саме – **отримання рекомбінантних молекул ДНК** шляхом поєднання у різних **комбінаціях фрагментів генного матеріалу**, обробленого рестриктазами. Типовий експеримент з використанням таких конструктів ДНК обов'язково включає в себе початковий етап «**вирізання**» **потрібної послідовності або гену** і подальшого «**вбудовування**» її у **векторну структуру - вектор клонування для трансфекції** – для **введення необхідного гену** в клітину-хазяїна. Такими векторами можуть бути, наприклад, **плазмідні, бактеріофаги або фагміди** на їх основі, **віруси** або навіть невеликі **штучні хромосоми**. Більшість векторів клонування містять послідовності

нуклеотидів, які дозволяють їм **автономно реплікуватися** всередині підходящої клітини-хазяїна. До того ж, всі вектори мають у своєму складі як мінімум **один унікальний сайт клонування** – послідовність, яка є **мішенню певної ендонуклеази рестрикції**, і забезпечує, таким чином, **сайт-специфічну інтеграцію чужорідної ДНК** у конструкті вектора в геном. Найбільш ефективні з векторів клонування містять зразу **декілька сайтів рестрикції**, що згруповані разом у єдиний сайт клонування – так званий **полілінкер (polylinker)**.

Фрагменти ДНК для інтеграції у вектор отримуються **декількома різними шляхами**. Наприклад, вони можуть утворюватися шляхом **механічного впливу на довгу молекулу полінуклеотиду** або ж **розщепленням ДНК ендонуклеазами рестрикції типу II** (рис. 180).

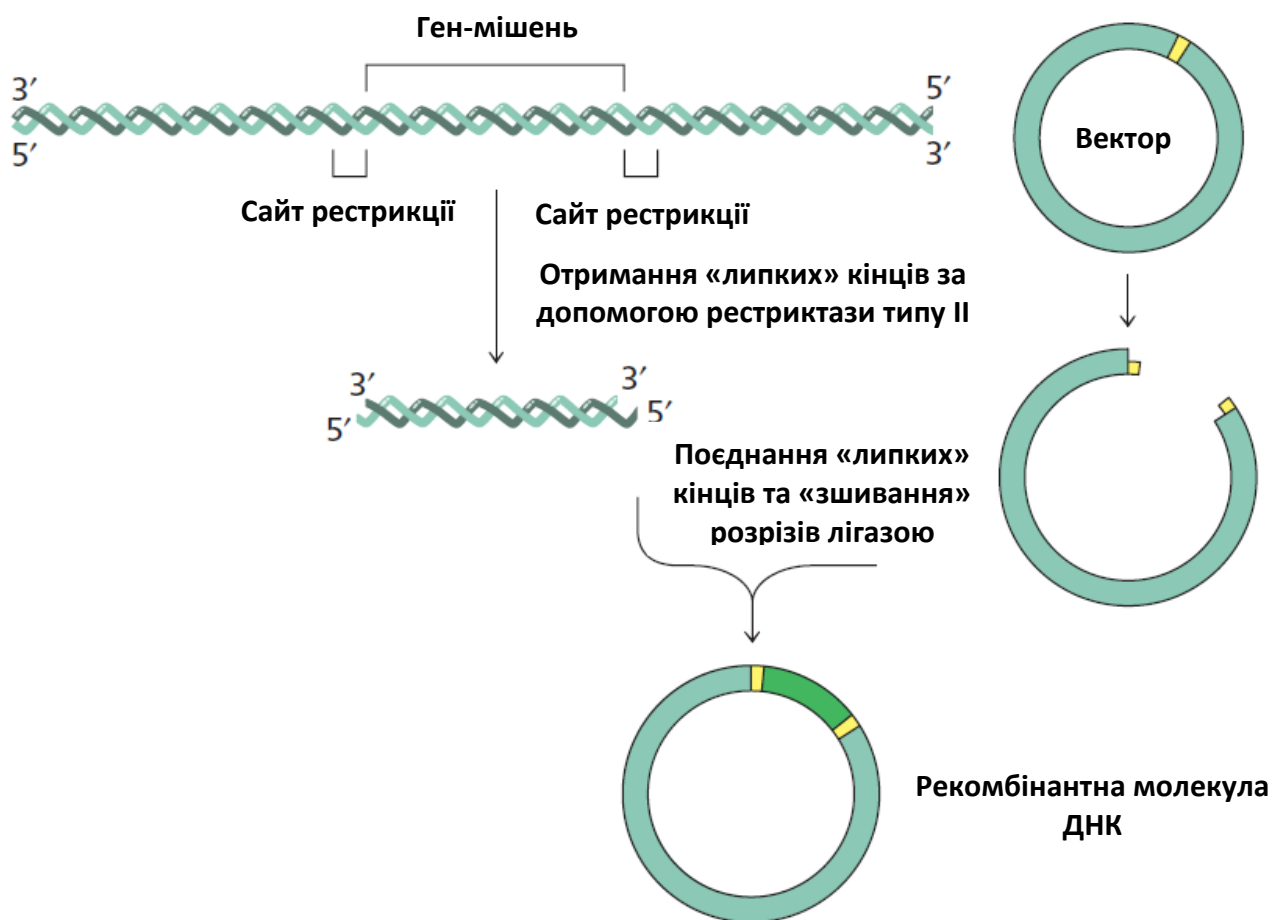


Рис. 180. Схема інтеграції ДНК-мішені у вектор.

Неферментативний метод дає **стохастичне утворення розривів у ланцюгах**, у той час як **ферменти рестрикції**, як уже не раз відмічалось, **специфічно розщеплюють ДНК** за місцем локалізації розпізнавальних послідовностей. Така специфічність в цілому є **більш придатною для потреб клонування**. У технології

отримання рекомбінантних ДНК, в основному, використовуються **рестриктази, продуктом дії яких є «липкі» кінці**, тобто, подовжені одноланцюгові 3'- або 5'-термінальні ділянки. Саме ці регіони молекули дозволяють потрібному фрагменту ДНК «вбудуватися» у вектор клонування за рахунок присутності в останньому комплементарних послідовностей, що були отримані дією ендонуклеаз рестрикції того ж типу. **«Зшивання» векторної ДНК після інтеграції рекомбінантної ділянки здійснюється ДНК-лігазою.** Таким чином, найпростішими варіантами рекомбінантних ДНК є ті, що **зконструйовані через використання ідентичної рестриктази** для розщеплення як вектора, так і ДНК-мішені, оскільки у цьому випадку отримані фрагменти за допомогою лігази можна легко поєднати між собою.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Принципи класифікації нуклеїнових кислот за структурою та функціями.
2. Будова нуклеотидів та їх складових.
3. Функції нуклеотидів.
4. Принципи організації первинної структури ДНК
5. Особливості первинної структури РНК.
6. Вторинна структура ДНК, її види.
7. Основні та мінорні види РНК. Особливості будови, функції.
8. Методи конденсації ДНК *in vitro*.
9. Структурна організація хроматину. Будова нуклеосоми.
10. Принципи взаємодії ДНК та РНК з білками.
11. Взаємодія нуклеїнових кислот з небілковими макромолекулами.
12. Взаємодія ДНК та РНК з водою та низькомолекулярними речовинами.
13. Гідратна оболонка нуклеїнових кислот. Сили гідратації ДНК.
14. Основні параметри та константи фізико-хімічних властивостей ДНК.
15. Поглинання ультрафіолетового проміння нуклеїновими кислотами.
16. Денатурація ДНК. Гіперхромний ефект.
17. Ренатурація ДНК. Параметри ренатурації.
18. Синтез нуклеотидів *de novo*.
19. Регуляція біосинтезу нуклеотидів.
20. Катаболізм пуринових та піримідинових основ.
21. Реплікація прокариот. Ферменти реплікації.
22. Регуляція прокариотичної реплікації.
23. Реплікація еукариот. Будова реплісоми.
24. Регуляторні механізми реплікації еукариотичної ДНК.
25. Транскрипція прокариот. Прокариотичні РНК-полімерази. Види термінації транскрипції.
26. Регуляція ферментного апарату транскрипції у прокариот.
27. Механізм транскрипції у еукариот. Полімеразний ферментний комплекс.
28. Особливості регуляції експресії еукариотичних генів.
29. Кепування, сплайсинг та поліаденілювання мРНК. Регуляція цих процесів.
30. Механізми «дозрівання» тРНК та рРНК у еукариот.
31. Репарація ДНК. Репараційні системи клітини. Регуляція їх активності.
32. Механізми розщеплення нуклеїнових кислот. Види та типи нуклеаз.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Кучеренко М.Є, Бабенюк Ю.Д., Виноградова Р.П. та інш. Біохімія. К.: 2002. 500 с.
2. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія. Київський університет, 2008. 379 р.
3. Сиволоб А.В. Генетика. Київський університет, 2008. 318 р.
4. Stephen Niedle. Principles of nucleic acids structure. Elsevier, 2008. 302 р.
5. David L. Nelson, Michael M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry, 6ed. W.H.Freeman, 2012. 1119 р.
6. G. Michael Blackburn, Michael J. Gait, David Loakes, David M. Williams. Nucleic Acids in Chemistry and Biology. RSC Publishing, 2006. 503 р.
7. Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, Matthew P. Scott. Molecular Cell Biology. W.H.Freeman, 2012. 973 р.
8. Magdy M. Elnashar. Biopolymers. SCIYO, 2010. 632 р.
9. Stephen Niedle. Nucleic Acid Structure and Recognition. Oxford University Press, 2002. 188 р.
10. Yingfu Li, Yi Lu. Functional Nucleic Acids for Analytical Applications. Springer, 2009. 430 р.
11. Dmitry M. Kolpashchikov, Yulia V. Gerasimova. Nucleic Acid Detection. Methods in Molecular Biology, Vol. 139. Humana Press, 2013. 320 р.
12. Dongyou Liu. Handbook of Nucleic Acid Purification. CRC Press, 2009. 584 р.