

В. М. ТОЦЬКИЙ

Г Е Н Е Т И К А

**2-е видання,
виправлене та доповнене**

Затверджено
Міністерством освіти і науки України
як підручник для студентів біологіч-
них спеціальностей вищих навчальних
закладів
(Лист № 1/11-4302 від 13.11.2001 р.)

Одеса
«Астропринт»
2002

ББК 28.04я73
Т639
УДК 575(075.8)

У підручнику викладено найважливіші досягнення і проблеми генетики — від класичних законів Г. Менделя до сучасних уявлень про молекулярні основи спадковості і мінливості. За змістом книга відповідає вимогам типових навчальних програм університетів з дисциплін «Генетика з основами селекції» та «Молекулярна біологія». З урахуванням сенсаційних досягнень генетики в останні десятиріччя особлива увага в книзі надається матеріалам таких розділів, як «Організація і функція геномів», «Молекулярні механізми основних генетичних процесів», «Генетичні основи онтогенезу», «Генетика людини та медична генетика», деяким іншим.

Підручник рекомендований студентам і аспірантам усіх біологічних спеціальностей університетів. Водночас він може бути корисним для студентів та викладачів медичних університетів, а також вчителям біології середніх учбових закладів (шкіл, гімназій, ліцеїв тощо).

Рецензенти: *В. Г. Шахбазов*, професор, зав. кафедрою генетики і цитології Харківського державного університету,
Ю. М. Сиволап, професор, академік УААН, директор Південного біотехнологічного центру у рослинництві УААН

Т $\frac{1903020000-083}{549-2002}$ Без оголош.

ISBN 966—549—785—5

© В. М. Тоцький, 2002

Передмова

У 2000 р. генетиці як самостійній науці виповнилося 100 років. За незначний відрізок часу генетика пройшла переможний шлях від простого осмислення величезної фундаментальної значимості раніше відкритих законів Г. Менделя до глибокого розуміння явища спадковості і мінливості на молекулярному рівні та до ефективного втручання людини у структуру і функцію геномів в інтересах людства.

Сьогодні генетика є теоретичною і методологічною основою інших біологічних наук, її справедливо вважають центральною наукою в біології. Разом з тим генетика успішно розвивається завдяки успіхам і досягненням інших природничих наук — таких як фізика, хімія, математика, молекулярна біологія, мікробіологія, вірусологія, ботаніка, зоологія та інші. Сьогодні не можна уявити кваліфікованого біолога або лікаря без знання основ генетики. Велику допомогу тим, хто вивчає та викладає генетику, надали відомі видання, серед яких «Генетика» (1977) Г. В. Гуляева, «Основы современной генетики» (1979 і 1983) С. М. Гершензона, «Общая генетика» (1985) С. І. Аліханяна, А. П. Акиф'єва і Л. С. Черніна, «Генетика» (1985) М. П. Дубініна, «Генетика с основами селекции» (1989) С. Г. Інге-Вечтомова та деякі інші підручники і монографії. В останні роки вийшли у світ сучасні підручники, написані українською мовою, серед них — перше видання (1998) «Генетики» В. М. Тоцького, «Генетика з основами селекції» (2000) С. І. Стрельчука, С. В. Демідова, Г. Д. Бердишева та Д. М. Голди, а також деякі інші видання.

Пропонована нами книга написана з урахуванням специфіки викладання генетики на біологічних факультетах університетів у межах спеціальностей «Біологія», «Мікробіологія», «Генетика» та деяких інших. Крім загальних сучасних уявлень про спадковість і мінливість, книга містить також дещо розширену і поглиблену інформацію з молекулярної генетики, мутагенезу, генетики популя-

цій, індивідуального розвитку, генетики людини, генетичних аспектів патології тощо. Ці матеріали можуть бути використані для індивідуальної підготовки відповідних спеціалістів, магістрів, аспірантів, а також для розробки загальних і спеціальних курсів, необхідних для підготовки спеціалістів-генетиків.

Особливістю пропонованої книги є підвищена увага автора до людини як об'єкта генетики. Крім спеціального розділу, який присвячено успіхам антропогенетики і медичної генетики, чимало інформації, отриманої генетиками в спостереженнях на людині, містять і інші розділи книги.

Враховуючи триступеневу систему навчання у вузах, розділи книги містять дещо спрощену інформацію у вигляді окремих підрозділів, передмов або узагальнень, розрахованих головним чином на мінімум знань, необхідних бакалавру. В подальшому цей матеріал конкретизується і поглиблюється. Послідовність викладення матеріалу в книзі обумовлена багаторічним досвідом автора і його колег щодо читання лекцій з курсів генетики та молекулярної біології.

Побудова підручника може показатись дещо незвичною. Вже на початку книги викладена сучасна інформація про структуру ДНК та молекулярні механізми основних генетичних процесів. Це дало можливість у подальшому поєднувати дані класичної і молекулярної генетики, не розриваючи ці два напрямки однієї науки. Досягнення генної інженерії не складають окремого розділу книги, а є складовою частиною розділу «Генетичні основи селекції». Поняття про ген дано вже на початку книги і поглиблюється з кожним новим розділом, але остаточно і всебічно обговорюється в окремому розділі «Проблеми дослідження гена» після викладення закономірностей успадкування, мутаційного процесу, генетичної рекомбінації та інших матеріалів, без яких сучасну теорію гена зрозуміти не можна.

Зроблена спроба створити книгу, кожен розділ якої міг би сприйматись окремо згідно з бажанням та інтересами читача.

Перше двотомне видання «Генетики» (1998) отримало схвальну оцінку спеціалістів і було серед 45 номінантів, допущених Комітетом з Державних премій України до участі в конкурсі на здобуття Державної премії з науки і техніки 2000 р. На жаль, у першому варіанті підручника не вдалося уникнути окремих похибок та неточностей, що було враховано за підготовки другого видання цієї книги.

За нового (однотомного) видання підручника в ньому дещо скорочено об'єм другорядної інформації, зате зроблена спроба уточнити та поглибити матеріали окремих розділів з урахуванням сучасних досягнень науки, особливо молекулярної генетики, молекулярної біології та біотехнології.

Велику допомогу в роботі над книгою побажаннями та зауваженнями надали В. Г. Шахбазов (Харківський національний університет), В. А. Кунах (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України), Ю. М. Сиволап (Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН), М. Г. Максимов (Одеський селекційно-генетичний інститут УААН), викладачі і співробітники кафедри генетики та молекулярної біології Одеського національного університету.

Видання книги стало можливим завдяки моральній та фінансовій підтримці ректорату Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова.

Всім, хто безпосередньо або посередньо сприяв виданню цієї книги, автор висловлює щирі вдячність і сподівається, що цей підручник при всіх його можливих недоліках буде корисним для молоді України.

Ваші зауваження та побажання просьба надсилати за адресою: 65026, м. Одеса, вул. Петра Великого, 2, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, зав. кафедрою генетики та молекулярної біології *Тоцькому Владлену Миколайовичу*. Телефон 68-11-02.

Розділ 1

ГЕНЕТИКА ЯК НАУКА

Роком народження генетики вважають 1900 р., коли одночасно і незалежно один від одного Г. де Фріз (Нідерланди), К. Корренс (Німеччина) і Е. Чермак (Австрія) повторно відкрили основні закони успадковування, зміст яких був опублікований Г. Менделем ще у 1865 році, але залишився поза увагою наукової громадскості. Назву «Генетика» в 1906 р. запропонував англійський вчений В. Бетсон. Він визначив генетику як науку, що вивчає фізіологію спадковості та мінливості — двох універсальних властивостей живої матерії. Слово «генетика» походить від латинського *gēneo* (породжую). Отже, генетика — це наука про дві найбільш універсальні властивості живих об'єктів — спадковість і мінливість.

Спадковість — це властивість батьків передавати свої ознаки і особливості розвитку наступному поколінню. Вона забезпечує певну консервативність живої матерії завдяки наявності матеріальних носіїв спадковості — генів. Успадковування — це процес передачі генів (і відповідно ознак) нащадкам.

Ген — одиниця спадковості, що визначає окрему найбільш елементарну ознаку, наприклад, структуру однієї молекули РНК або поліпептиду. З точки зору молекулярної генетики, ген — це відрізок (фрагмент) молекули ДНК або РНК, що несе генетичну інформацію про елементарну функцію або ознаку. Мінливість — це властивість, протилежна спадковості. Її суть полягає в змінах структури та комбінацій спадкових задатків — генів і в змінах їх прояву в онтогенезі.

1.1. Основна мета та проблеми генетики

Основну мету генетики коротко можна визначити у вигляді двох формулювань, перше з яких підкреслює фундаментальність та ве-

лике теоретичне значення генетичних досліджень, а друге вказує на їх практичну спрямованість в інтересах людини:

1) з'ясування існуючих закономірностей за спадковості і мінливості;

2) пошук шляхів практичного використання цих закономірностей в інтересах людини.

Основні проблеми, що підлягають вивченню, та відповідні розділи генетики виглядають так (табл. 1.1):

Таблиця 1.1

Основні проблеми та розділи генетики

Основні проблеми генетики	Відповідні розділи генетики
1. Цитологічна та молекулярна організація носіїв генетичної інформації	Загальна генетика
2. Зберігання, захист та передача нащадкам генетичної інформації, закономірності успадкування	Цитогенетика
3. Реалізація генетичної інформації в клітині, взаємодія генів	Молекулярна генетика
4. Зміни генетичної інформації (механізми мінливості)	Генетична інженерія
5. Пошук шляхів та методів штучного втручання в механізми успадкування та мінливості	Генетика популяцій
6. Генетичні механізми та регуляція індивідуального розвитку	Математична генетика
7. Порівняльне вивчення генетики видів	Ті ж, крім того: Імуногенетика. Онтогенетика
8. Синтез нових форм організмів, отримання їх високопродуктивних форм в інтересах людини	Ті ж, крім того: Порівняльна генетика
9. Створення наукових основ селекції	Предметна генетика тварин, рослин та мікроорганізмів
10. З'ясування генетичних основ певної поведінки тварин та людини, створення наукових основ психології та психіатрії	Генетичні основи селекції
11. Генетичні основи охорони здоров'я (з'ясування етіології спадкових хвороб, хвороб із спадковою схильністю, генетичних особливостей реакцій різних людей на ліки тощо)	Ті ж, крім того: Фізіологічна генетика
12. Генетичні засади екології та охорони природи (збереження генофонду планети)	Психогенетика
13. Створення наукових основ еволюційного вчення	Ті ж, крім того: Генетика людини
	Медична генетика
	Фармакогенетика
	Ті ж, особливо: Генетика популяцій. Предметна генетика окремих видів. Екогенетика
	Ті ж, особливо: Генетика популяцій. Порівняльна генетика. Математична генетика

Генетика — це **методологічна основа** всіх біологічних наук, тому її вважають центральною наукою в біології.

Генетика має велике **світоглядне** значення, бо це теоретична основа еволюційного вчення, наука, що відкриває шлях до пізнання суттєвості життя. Не можна не звернути уваги на істотне практичне значення цієї науки для людства, бо генетика має пряме відношення до селекції, охорони природи, екологічних проблем, проблеми охорони здоров'я тощо.

Слід зазначити, що в усіх зазначених напрямках генетика досягла значних успіхів.

1.2. Зв'язок генетики з іншими науками. Методи генетики

Спадковість і мінливість можна досліджувати на різних рівнях — молекулярному, клітинному, на рівні організму або популяції. Так, наприклад, структуру гена, його безпосередню функцію можна визначити лише на рівні молекули ДНК, хоч посередньо функцію гена і його успадковування можна досліджувати, вивчаючи окремі білки або фенотипові ознаки (тобто особливості метаболізму, морфології або фізіології). Саме тому генетика широко використовує методи цитології, біохімії, молекулярної біології і всіх інших наук. Від зоології та ботаніки виникла популяційна генетика. Так само існує генетика мікроорганізмів, вірусів, генетика окремих тварин і рослин, що свідчить про тісний зв'язок генетики з іншими біологічними дисциплінами. Не менш важливий для генетики зв'язок з такими науками, як філософія, хімія, фізика, математика, методичні арсенали яких мають велике значення для прогресу генетики.

Основним методом генетики є **генетичний аналіз**. Цей метод поєднує в собі можливості специфічного для генетики гібридологічного аналізу з іншими методичними підходами — штучним отриманням мутацій, цитологічними, біохімічними, молекулярногенетичними та іншими дослідженнями.

Метод гібридологічного аналізу полягає в гібридизації і кількісному врахуванні розщеплення ознак серед нащадків наступних поколінь. В завершеному вигляді цей метод був запропонований Г. Менделем, який вперше використав кількісний підхід при дослідженні наслідків схрещувань і побудові гіпотез для пояснення результатів цих схрещувань. З тих пір математичний метод дослі-

дження, який передбачає порівняння кількісних даних досліджу з теоретично очікуваними, став невід'ємною складовою генетичного аналізу.

Цитологічний метод використовується для вивчення клітини як носія і місця реалізації генетичної інформації. Дослідження будови хромосом разом з гібридологічним аналізом лежить в основі **цитогенетики**.

Генетика активно використовує методи всіх суміжних наук — фізики і біофізики, хімії і біохімії, молекулярної біології і імунології, мікробіології і вірусології, інших наук, які збагачують генетику і самі оновлюються в світлі її досягнень.

1.3. Окремі поняття та термінологія

Поруч з поняттям «ген» генетики широко використовують і інші: **геном**, **генотип**, **фенотип**. Відомо, що статеві клітини (гамети) диплоїдних організмів утримують лише половину хромосом у порівнянні з клітинами соми (тіла), тобто в них міститься гаплоїдний набір хромосом. Таким чином, диплоїдна клітина містить дві копії одного і того ж гена (одна копія від матері, інша — від батька); гамета утримує лише одну копію даного гена — або материнську, або батьківську.

Сукупність генетичної інформації в гаплоїдному наборі хромосом називають геномом. За зливання жіночої і чоловічої статевих клітин (запліднення) здійснюється об'єднання батьківського і материнського геномів у **диплоїдній зиготі**, з якої розвивається зародок, а згодом і організм. *Сукупність генетичної інформації, властиву соматичній клітині даного організму, називають генотипом.* Дуже часто генотипами генетики називають самі організми.

Інформація певного генотипу реалізується у вигляді **фенотипу** — *сукупності ознак і властивостей, характерних для даного організму (генотипу).* Кожна функція або ознака забезпечується функцією одного або багатьох білків (інколи РНК). Саме структуру цих білків (точніше — необхідних для їх синтезу РНК) і кодують гени. Слід пам'ятати, що білок з четвертинною будовою, який містить різні за первинною структурою поліпептиди, кодується не одним, а більшою кількістю генів. Крім того, деякі складні ознаки визначаються функцією декількох білків. Таким чином, всі ознаки можна поділити на **моногенні** та **полігенні**. *Моногенні*

ознаки називаються фенами. Складні (полігенні) ознаки складаються з двох або більшої кількості фенів.

Таким чином, фенотип можна розглядати як певну суму моногенних ознак, тобто **фенів**. Вивчаючи поведінку фенів, можна судити про успадковування та функцію генів. Першим це зробив Г. Мендель, який є автором гібридологічного аналізу — основного методу генетики. В основі методу лежить уява про **дискретність** (розподільність) генотипу і фенотипу, складовими частинами яких є відповідно гени і фени. Щодо генів, то їх поділяють на **структурні** (відповідають за синтез функціонально активних білків) та **регуляторні**. Останні несуть інформацію про продукти (РНК та білки), які регулюють функцію інших генів. Таким чином, регуляторні гени фактично теж є структурними генами. Продукти регуляторних генів є **трансактивними**, тобто такими, що діють на відстані. Крім зазначених генів, до складу геному входять ще так звані **акцепторні** або **регулювальні ділянки**, які не несуть інформації про якісь певні продукти, але можуть зв'язувати продукти регуляторних генів і тим самим впливати на інтенсивність вияву (експресії) структурних генів. Це так звані **цис-активні послідовності ДНК**.

Кожен структурний ген виявляється у фенотипі як відповідна елементарна ознака, тобто фен, на тому чи іншому рівні системної організації клітини чи організму. Деякі фени можна визначити з допомогою звичайних органів почуття — зору, дотику тощо. Прикладом може бути забарвлення насіння гороху (жовте або зелене), антоціанове (фіолетово-червоне) забарвлення органів у деяких рослин (наприклад, кукурудзи) і т. ін. Для визначення інших фенів, наприклад, наявності у клітині певних РНК чи білків, необхідні досить складні інструментальні методи.

Фенотипові ознаки поділяють на **якісні** та **кількісні**. Якісні ознаки здебільшого не мають кількісних вимірів і бувають альтернативними. Так, насіння гороху може бути жовтим або зеленим. Проміжних форм тут немає, бо кожна з цих якісних ознак визначається одним геном і лише один ген у цьому випадку проявляється у фенотипі. Винятком з цього правила є лише випадки проміжного успадковування та кодомінування (розділ 1.4).

Будь-яка елементарна ознака (рис. 1.1) визначається функцією певного білка, що, в свою чергу, кодується структурою іРНК, і, в решті решт, відповідним геном (фрагментом молекули ДНК, у деяких вірусів — РНК). Кількісні ознаки (наприклад, жирномолочність, вага 1000 зерен у злакових, несучість курей тощо) не виявляють альтернативності (завжди є перехідні форми), і,

як правило, визначаються не одним, а кількома або багатьма генами.



Рис. 1.1. Можливі шляхи реалізації інформації генів у клітині за вияву моногенних та полігенних ознак

Основоположником вчення про закономірності успадкування кількісних ознак є шведський вчений З. Нільсон-Еле.

1.4. Алельність гена та множинний алелізм

Як вже зазначалося, ген, що обумовлює певну ознаку, в генотипі соматичної диплоїдної клітини знаходиться у вигляді двох копій — одна від матері, друга — від батька. Нерідко ці два гени неідентичні, тобто представлені двома різними алелями (грецьке *allēlōn* — взаємно). **Алель** — це структурна різновидність даного гена. В багатьох випадках одна із таких різновидностей являє собою **домінантний алель**. За його наявності інші алелі гена не виявляються і тому називаються **рецесивними**. Домінантні гени позначають великими буквами того чи іншого алфавіту (*A, B, C, D* і т. ін.), а рецесивні алелі цих генів — тими ж, але малими буквами (наприклад, *a, b, c, d* і т. ін.). Деякі алелі гена є рівнозначними щодо можливості їх вияву у фенотипі; такі гени називають **кодомінантними**.

Генотип диплоїдної клітини по кожному конкретному локусу (місцю) двох гомологічних хромосом зазначають двома буквами, залежно від наявних двох алелів гена у цьому локусі.

Якщо диплоїдна клітина в певному локусі містить дві однакові копії гена (обидві або домінантні, або рецесивні), то це називають

гомозиготою або гомозиготним станом відповідного гена (генотип AA або aa). Якщо ж гомологічні хромосоми містять різні алелі даного гена, то мова йде про **гетерозиготу** (генотип Aa). Кодомінантні алельні гени часто позначають одною і тою ж великою буквою, але з різними індексами справа від неї (наприклад, гени антигенів крові I^A та I^B , L^M і L^N тощо). Генотипи, що складаються із зазначених пар кодомінантних генів ($I^A I^B$, $L^M L^N$), є гетерозиготними, так само як і генотип Aa .

Дуже часто в популяції певний ген розповсюджується у вигляді численних структурних різновидностей. Це так звані **множинні алелі** даного гена, а наявність їх у природі відома як **множинний алелізм**. Зрозуміло, що клітини диплоїдного організму можуть утримувати лише два алелі із серії множинних алелів.

Гени із серії множинних алелів позначають певним буквеним або цифровим індексом справа від символу гена. Так, у кроликів відома серія множинних алелів гена C , що відповідає за пігмент шерсті і райдужної оболонки ока: C — чорна шерсть, c^{ch} — шиншила, c^m — мардер, c^h — горностай, c — альбінос. За ступенем домінантності ці гени розташовуються в певному порядку ($C > c^{ch} > c^m > c^h > c$). Фенотипи кролів за забарвленням шерсті та генотипи, що їм відповідають, виглядають так:

Фенотип кролика (забарвлення шерсті)	Генотипи по локусу C
Чорний	$CC, Cc^{ch}, Cc^m, Cc^h, Cc$
Шиншила (світло-коричневий)	$c^{ch}c^{ch}, c^{ch}c^m, c^{ch}c^h, c^{ch}c$
Мардер (дуже світло-коричневий)	$c^m c^m, c^m c^h, c^m c$
Гімалайський або горностайовий (білий, але виступаючі частини тіла — вуха, лапи, хвіст та мордочка — чорні)	$c^h c^h, c^h c$
Альбінос	cc

У людини є три алелі, що визначають групи крові O , A , B , AB . Це серія алелів I^A , I^B , i^o . Алель i^o — рецесивний по відношенню до інших, а алелі I^A і I^B — кодомінантні, тобто їх продукти (відповідні антигени еритроцитів) одночасно виявляються у гетерозигот $I^A I^B$.

Фенотипи (групи крові системи АВО) та генотипи, що їх обумовлюють, виглядають так:

Група крові	Структура генотипу	Група крові	Структура генотипу
O	$i^o i^o$	B	$I^B I^B, I^B i^o$
A	$I^A I^A, I^A i^o$	AB	$I^A I^B$

Як видно з наведених прикладів, один і той же фенотип може визначатися різними генотипами, а серії множинних алелів можуть складатися із домінантних, рецесивних та кодомінантних генів.

1.5. Скорочене позначення генів у генетиці

Символи для позначення генів у генетиці неоднозначні. В більшості випадків ген позначають буквами латинського або іншого алфавіту і курсивом. Домінантний ген, як вже зазначалося, позначається великою буквою, але може також позначатися знаком «+», рецесивний ген — малою буквою. Так, записом w^+ позначається домінантний ген дрозофіли, який обумовлює дикий фенотип, тобто темно-червоне забарвлення фасеток ока; запис w означає рецесивний алель цього гена (фасетки незабарвлені, очі білі).

В інших випадках гени позначаються двома-трьома першими буквами латинського, англійського чи іншого за походженням слова, що означає певну функцію, фенотиповий вияв, назву продукту або інші особливості даного гена. Наприклад, п'ять генів кишкової палички, що кодують ферменти синтезу триптофану, позначають символами *trpA*, *trpB*, *trpC*, *trpD*, *trpE*; гени, що визначають структуру ДНК-полімераз, — *polA*, *polB*, *dnaE* та інші; аллозимі алкогольдегідрогенази дрозофіли кодуються алельними генами *Adh^S*, *Adh^F* тощо.

В генетиці мікроорганізмів скорочення назви гена набирається малими буквами і курсивом (*lac*); позначення фенотипу — в такий же спосіб, але перша буква завжди велика, а шрифт — прямий (*Lac*). У верхній частині символу фенотипу (справа цього скорочення) ставиться індекс, що вказує на статус відповідної ознаки у бактерії: *Lac⁺*, *Lac⁻*, *Str^r*, *Str^s*, *Leu⁺*, *Leu⁻*, *His⁺*, *His⁻* і т. ін., де знак «+» означає наявність відповідної ознаки, «-» — її відсутність, *r* — резистентність, а *s* — чутливість до певної хімічної сполуки або до дії іншого чинника (в наведеному прикладі — до стрептоміцину).

1.6. Основні етапи розвитку генетики

Людиною з давніх давен було спостережено принаймні три явища, що мають відношення до спадковості: 1) подібність ознак батьків та їх нащадків; 2) відмінності деяких ознак між ними; 3) ви-

никнення в поколіннях ознак, що були властиві далеким предкам. З незапам'ятних часів людина стихійно використовувала явище спадковості з практичною метою — для отримання сортів культурних рослин і порід свійських тварин. У процесі цієї довготривалої діяльності накопичувалися дуже цікаві і практично корисні спостереження щодо передачі різних ознак від батьків нащадкам у рослин і тварин.

У XVIII сторіччі цілеспрямовані спостереження в цьому напрямку провадив німецький ботанік І. Кельрейтер, який займався гібридизацією рослин. Кількість таких цілеспрямованих досліджень дуже зросла в XIX сторіччі. В основному цим займалися практики рослинництва і тваринництва (О. Сажре і Ш. Ноден у Франції, А. Гертнер у Німеччині, Т. Найт в Англії). Цікаві узагальнення були зроблені французом П. Люка, який зібрав різноманітну інформацію про успадковування ознак у людини. Однак чіткої уяви про закономірності успадковування ці досліді і спостереження не дали, бо у дослідників того часу не було науково обґрунтованих методичних підходів до вирішення складних проблем спадковості і мінливості.

Перші ідеї щодо природи спадковості висловили ще філософи древньої Греції — Демокріт, Гіпократ, Платон, Арістотель. Гіпократ вважав, що статеві продукти формуються за участю всіх органів і що ознаки батьків безпосередньо передаються нащадкам (теорія прямого успадковування).

Арістотель вважав, що репродуктивний матеріал заново продукується з поживних речовин, які спеціально призначені для побудови різних частин тіла (непряме успадковування).

Останнім варіантом теорії прямого успадковування була гіпотеза пангенезису Ч. Дарвіна (1868 р.). Згідно з цією гіпотезою всі клітини організму утворюють найдрібніші частинки — «гемули». Останні попадають в репродуктивні органи, і таким чином певні ознаки передаються нащадкам. Ця гіпотеза, що дуже нагадує погляди Гіпократа, допускала успадковування набутих в онтогенезі ознак, і тому була більш сприйнятлива з позицій ламаркізму, ніж еволюційної теорії самого Дарвіна.

У 80-х роках XIX сторіччя теорію пангенезису і ідею про успадковування набутих за життя корисних ознак жорстко розкритикував А. Вейсман. Він сприйняв ідею німецького ботаніка К. Негелі про існування в кожній клітині організму особливої речовини («ідіоплазми») — носія спадкових властивостей. Вейсман вважав, що в повному об'ємі ця гіпотетична речовина («зародкова плазма») міститься тільки в статевих клітинах. Спираючись на існуючу в той час інформацію, накопичену цитологами, Вейсман ототожнив за-

родкову плазму з хромосомами ядра, і тому його вважають предтечею хромосомної теорії спадковості. Якщо врахувати, що в кінці XIX сторіччя було немало відкриттів щодо будови клітини, поведінки хромосом під час клітинного поділу і запліднення, ролі ядра в спадковості і т. ін., то не дивно, що теорія Вейсмана підготувала біологів до корінного перегляду поглядів на спадковість зразу ж після перевідкриття законів Г. Менделя у 1900 р.

Хоч у багатьох відношеннях гіпотеза Вейсмана була правильною, вона, як і всі інші, що їй передували, була в основному умоглядною, бо не мала експериментального підґрунтя. Взагалі вся інформація, що була відома науковій громадськості в той час про спадковість, — умоглядні гіпотези античних філософів, успіхи емпіричного рослинництва і тваринництва, умоглядні гіпотези Ч. Дарвіна, К. Негелі, А. Вейсмана та інших дослідників — можна розглядати лише як витоки сучасної наукової генетики. Міцну основу для появи цієї науки створили численні відкриття біологів XIX сторіччя, серед яких найбільшу роль відіграли:

- 1) створення і розвиток клітинної теорії (М. Шлейден, Т. Шванн, Р. Вірхов);
- 2) вчення про походження видів (Ч. Дарвін);
- 3) відкриття мітозу і мейозу (Е. С. Страсбургер, В. Флемінг, Е. ван Бенеден);
- 4) з'ясування механізмів запліднення (Е. ван Бенеден, О. Гертвіг, І. М. Горожанкін);
- 5) виникнення ядерної теорії спадковості (В. Ру, Е. С. Страсбургер);
- 6) відкриття хромосом і встановлення факту постійності хромосомних наборів (В. Вальдейер, Е. ван Бенеден, К. Рабль, Т. Бовері);
- 7) інші досягнення у вивченні особливостей соматичних і статевих клітин;
- 8) спростування Л. Пастером старих уявлень про можливість самозародження живих організмів.

Ці та інші досягнення біології вимагали свого пояснення з позицій вчення про спадковість і мінливість живих об'єктів.

Основи цього вчення були закладені ще у 1865 р. класичною працею Г. Менделя «Досліди над рослинними гібридами», однак, як це не дивно, менделівські закони успадковування залишалися невідомими більшості біологів ще протягом 35 років. «Вина» Г. Менделя в тому, що своїми дослідженнями він набагато випередив загальний розвиток науки, і значення цих досліджень не змогли оцінити його сучасники.

Згодом з'ясувалося, що закономірності, встановлені Г. Менделем, мають універсальний характер і можуть бути простежені як на рослинах, так і на тваринних об'єктах (лабораторних гризунах,

курах, метеликах і т. п.). Протягом короткого часу генетика сформувалась як самостійна біологічна наука і отримала широке визнання.

За М. П. Дубініним, розвиток генетики можна поділити на три основних етапи, між якими немає чітких розмежень.

Перший — це епоха класичної генетики з 1900 по 1930 р. За цей час остаточно утвердився менделізм, відкрито явище зчепленого успадковування, створена теорія гена і хромосомна теорія спадковості. Важливе значення мали також розробки вчення про фенотип і генотип, про взаємодію генів, упровадження генетичних принципів індивідуального добору в селекцію, вчення про мобілізацію генетичних ресурсів планети для задач селекції (М. І. Вавілов) та ін.

Другий етап — з 1930 по 1953 р. — відомий під назвою неокласицизму. В ці роки була відкрита можливість штучного мутагенезу; остаточно доведено, що ген — це дискретна система, яка складається із частин; обґрунтовано принципи генетики популяцій і еволюційної генетики; виникла біохімічна генетика, яка показала роль генів у процесах обміну речовин; отримані докази генетичної ролі ДНК.

З 1953 р., після опублікування праці Дж. Уотсона і Ф. Кріка про структуру ДНК, розпочався період так званої молекулярної генетики, однак справедливіше вважати його епохою синтетичної генетики. Справа в тому, що молекулярні і генноінженерні підходи не замінили і не витіснили загальну і предметну генетику організмів, — вони увійшли до них органічною складовою частиною, забезпечивши новий рівень досліджень в усіх сферах і напрямках. Завдяки такому синтезу досягнуто нового рівня в розвитку теорії гена і мутагенезу, біохімічної і еволюційної генетики, імуногенетики, генетики людини, інших розділів науки про спадковість і мінливість. В останні роки значно зросло значення генетики для практики медицини і сільського господарства, охорони і раціонального використання природних ресурсів, створення світоглядних і соціальних засад людського суспільства.

В наші дні, ставши ключовою наукою біології і перебуваючи у тісному зв'язку з практичними запитами людства, генетика в цілому і її численні наукові напрями розвиваються дуже бурхливо. В першу чергу це стосується молекулярної генетики. Завдяки їй виникла нова галузь науки — **генна інженерія**, яка дає можливість маніпулювати індивідуальними генами, отримувати *in vitro* їх нові поєднання, викликати мутації за бажанням дослідника, переносити гени одних організмів у клітини інших і таким чином створювати біологічні системи, яких ніколи не було у природі, але які можна

використовувати як вихідний матеріал для селекції або в інших біотехнологічних цілях.

1.7. Розвиток генетики в Україні

В XIX сторіччі київський ботанік І. Ф. Шмальгаузен (батько видатного зоолога І. І. Шмальгаузена) був одним із небагатьох вчених світу, хто високо оцінив значення класичної праці Г. Менделя і зробив посилку на неї в своїй дисертації. На жаль, і після цього робота Г. Менделя залишилась поза увагою світової науки.

Учень і послідовник професора Київського університету С. Г. Навашина Григорій Андрійович Левицький (1878—1942) своїми дослідженнями по вивченню цитологічних явищ запліднення вніс істотний вклад у світову генетичну науку. В 1924 р. вийшла в світ оригінальна праця вченого «Матеріальні основи спадковості», в якій було викладено основні досягнення генетики і вперше широко висвітлено проблему нехромосомної спадковості.

Г. А. Левицького справедливо можна вважати засновником цитогенетики в нашій країні, одним з найталановитіших вчених. Однак яскравість таланту не врятувала вченого від образливих публічних нападок прибічників лжеакадеміка Т. Д. Лисенка та численних арештів. У 1942 р. він помер у в'язниці міста Златоуста.

Довгий час у колишньому СРСР замовчувалось ім'я генетика із світовим іменем — Ф. Г. Добржанського (1900—1975). Його згадували лише в негативному плані як менделіста-морганіста, зрадника Батьківщини. Ф. Г. Добржанський народився на Вінничині, а після закінчення Київського університету активно працював над генетичними проблемами в Київському Товаристві дослідників природи, будучи викладачем зоології. Його ранні праці були важливим внеском у розвиток деяких розділів генетики та еволюційного вчення. Пізніше свої дослідження Ф. Г. Добржанський продовжив уже в Америці, куди він виїхав у 1927 р.

Використовуючи структурну перебудову (транслокацію) між другою і третьою хромосомами, Ф. Г. Добржанський продемонстрував лінійне розміщення генів у хромосомах, а пізніше збудував першу цитологічну карту третьої хромосоми дрозофіли.

Різносторонність наукової діяльності Ф. Г. Добржанського дуже значна. Його справедливо вважають одним із засновників експериментальної і популяційної генетики. В серії фундаментальних статей він описав генетичні причини стерильності деяких гібридів, ге-

нетичну природу транслокацій та механізми мікроеволюції деяких видів, визначивши роль у ній природного добору. Ф. Г. Добржанський є також одним із засновників синтетичної теорії еволюції. Спадщина вченого дуже велика, і надто прикро, що на рідній землі — в колишньому СРСР — він не знайшов необхідних умов для роботи.

Інші перші українські генетики, імена яких добре відомі, — це І. І. Клодницький (1884—1952), професор Київського зоотехнічного інституту, А. О. Сапегін — професор Новоросійського (Одеського) університету та багато інших (розділ 16.10).

У 30—40-х роках в Україні, як і в усьому СРСР, йшов розгром генетики як науки, і кращі її представники були репресовані, розділивши трагічну долю всесвітньо відомого М. І. Вавілова, його співробітника Г. Д. Карпеченка та багатьох інших.

Відродження генетики в Україні розпочалось лише на початку 70-х років, коли вітчизняна біологія звільнилась від панування поглядів Т. Д. Лисенка.

Великий внесок у розвиток української генетики в довоєнні роки та в період її відродження внесли праці С. М. Гершензона, який є одним із класиків вітчизняної науки. Він був одним із перших дослідників, хто відкрив мутагенну дію у деяких хімічних сполук і, що найважливіше, — у ДНК і продуктів її розпаду; задовго до відкриття зворотної транскрипції передбачив її існування на підставі власних досліджень. Добре відомі роботи вченого в галузі генетики природних популяцій та з інших проблем генетики.

Сьогодні українська генетика займає достойне місце у світовій науці. Зусиллями українських вчених внесено істотний вклад у вивчення структури геномів, з'ясування механізмів функціонування та регуляції генетичних процесів, розроблено оригінальні методи штучного поліпшення генотипів, створено нові штамми мікроорганізмів, породи тварин та сорти рослин (розділ 16.10).

Частина I

**МАТЕРІАЛЬНІ ОСНОВИ
СПАДКОВОСТІ**



КЛІТИНА ЯК НОСІЙ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ

Спадковість забезпечується механізмами самовідтворення клітини, тобто її здатністю утворювати свої копії. Слід підкреслити, що клітина є єдиною матеріальною системою, яка в повному об'ємі здатна забезпечити основні властивості живої матерії: наявність необхідних речовин, енергії, інформації, механізмів саморегуляції і самовідродження, програми індивідуального розвитку та ін.

В 1858 р. Р. Вірхов, спираючись на клітинну теорію (М. Шлейден, Т. Шванн, 1839), сформулював знаменитий тезис «*omnis cellula et cellula*» («кожна клітина від клітини»). Цей постулат мав величезне методологічне значення, бо ставив вчення про клітину на матеріальну основу і відкидав будь-яку містику в поглядах на спадковість.

Важливою умовою, яка сприяла становленню генетики, були досягнення у вивченні особливостей соматичних і статевих клітин. Ще в 70-х роках минулого сторіччя І. Д. Чистяковим, Е. С. Страсбургером та іншими був відкритий **мітоз** або **каріокінез**. Ядерні елементи клітини В. Вальдейер назвав **хромосомами**. В. Флемінг і М. Гейденгайн у процесі мітозу виділили фази: профазу, метафазу, анафазу, телофазу (рис. 2.1). Особливо важливим для науки взагалі і для подальшого розвитку генетики було встановлення наприкінці минулого сторіччя факту постійності числа і індивідуальності хромосом для кожного виду. Честь цього відкриття належить К. Раблю, Е. ван Бенедену і Т. Бовері.

Одночасно з вивченням мітозу соматичної клітини йшло дослідження розвитку статевих клітин (**мейозу**) і механізму запліднення у тварин і рослин. О. Гертвіг у 1875 р. вперше виявив факт злиття ядра сперматозоїда з ядром яйцеклітини у голкошкірих. І. М. Горюжанкін у 1880—1883 роках і Е. Страсбургер у 1884 році те ж саме спостерігали у рослин: перший — у голонасінних, а другий — у покритонасінних. В ці ж роки Е. ван Бенеденом, Т. Бовері та іншими був встановлений кардинальний факт: за визрівання статевих клітин, на відміну від соматичних, кількість хромосом у них зменшу-

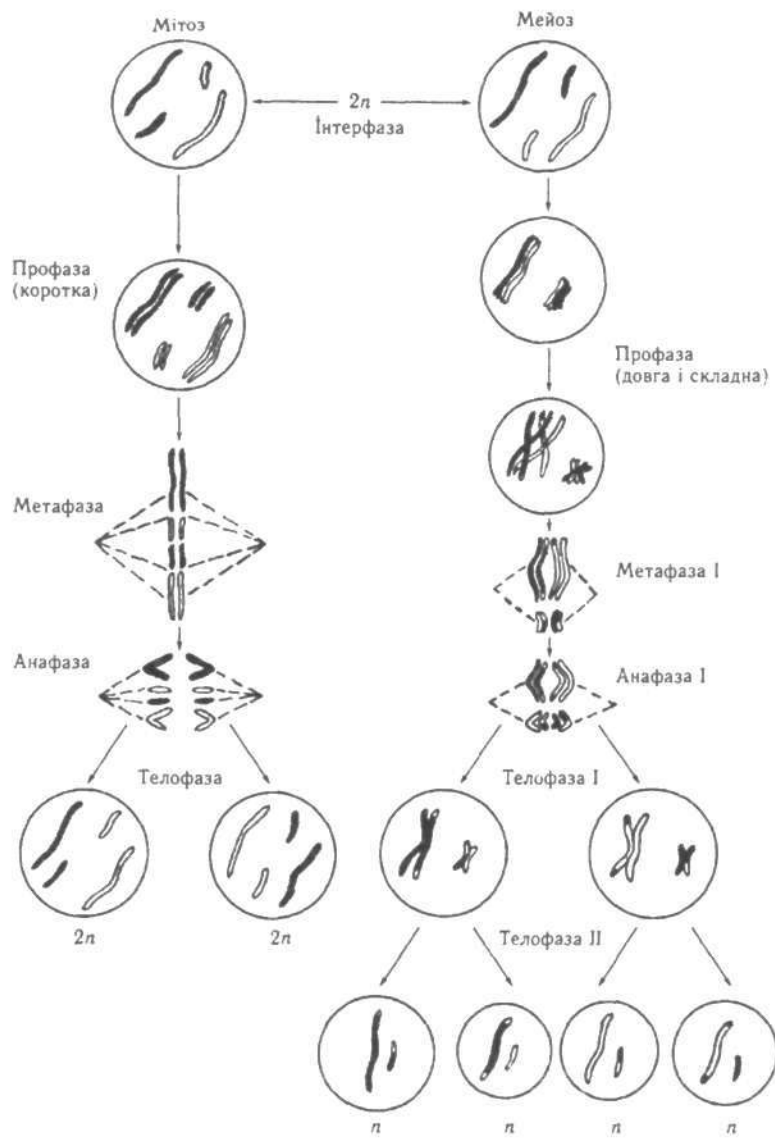


Рис. 2.1. Схема мітозу і мейозу в гіпотетичній клітині з чотирма хромосомами:

Хромосоми, що походять від різних батьків, зображені чорними і білими. За мітозу кількість хромосом не змінюється, за мейозу після двох поділів утворюється 4 клітини з двома хромосомами кожна (n). Крім того, при мейозі відбувається обмін ділянками хромосом

ється рівно вдвоє, а в момент запліднення, тобто в момент об'єднання ядер статевих клітин, відновлюється вихідний набір хромосом цього виду.

Ці та інші успіхи цитологічних досліджень створили добру основу для визначення важливості ролі ядра клітини в явищі спадковості.

Як відомо, основна структура клітини — протопласт — ділиться на **цитоплазму** і **ядро**. Обидва ці компоненти грають важливу роль у явищі спадковості. Однак ядру належить першочергова роль, бо саме в ядрі знаходяться хромосоми, а в них — основна кількість клітинної ДНК.

2.1. Роль ядра і цитоплазми в спадковості

Є прямі і непрямі докази того, що ядро грає найважливішу роль у спадковості. До непрямих доказів можна віднести такі:

1) жіночі і чоловічі гамети відрізняються вмістом цитоплазми, а не ядер;

2) за поділу клітини ядро ділиться порівну, а цитоплазма — не завжди;

3) гамети утримують гаплоїдний набір хромосом, а при заплідненні відтворюється диплоїдність клітин.

Ці та інші дані призвели до створення так званої **ядерної теорії спадковості** (1883—1884 роки), авторами якої були В. Ру, Е. Страсбургер, О. Гертвіг та інші.

Були представлені і прямі докази першорядної ролі ядра у спадковості. Одна із перших праць у цьому напрямі була проведена німецьким ембріологом К. Хербстом на гібридах морських їжаків. Якщо активовані масляною кислотою яйця морських їжаків запліднити сперміями, обробленими лугом, то ядро спермія зливається з ядром яйця не зразу. Після поділу яйця це чоловіче ядро виявляється лише в одному із двох бластомерів, де і проходить запліднення. Внаслідок подальшого розвитку личинки половина її тіла утворюється із клітин, що містять ядра материнського походження, а інша половина — із клітин, що утримують ядра, утворені злиттям ядер матері і батька. К. Хербст у своїх дослідках використовував морських їжаків різних родів, личинки яких відрізнялись будовою скелета і деякими іншими ознаками. У отриманих гібридних личинок одна половина тіла виявляла виключно материнські ознаки, інша ж половина, яка містила гібридні ядра, мала проміжну бу-

дову, тобто виявлялись ознаки обох родів морських їжаків. Якщо зразу ж після запліднення бластомери відокремити один від одного, то можна отримати дві личинки, різні за генотипом і фенотипом.

Г. Гемерлінг провів дослід із заміною ядра однойдерної водорослі роду *Acetabularia*. Брали два види цього роду, які відрізнялись формою капелюшка (рис. 2.2). Вирізали ризоїди, утримуючі ядро, і зрощували їх із стебелем другого виду. З'ясувалося, що форма капелюшка визначається видовою належністю ядра, а не цитоплазми.

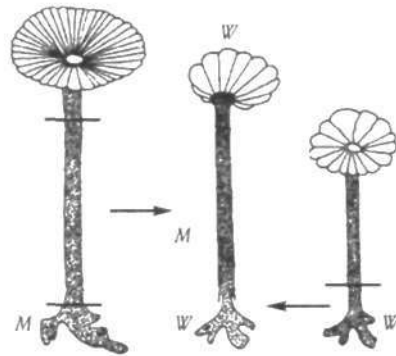


Рис. 2.2 Вплив ядра на форму капелюшка у ацетабулярії.

Зліва — *Acetabularia mediterranea* (M) (ядро лежить внизу в ризоїді), справа — *A. wettsteinii* (W); в центрі — гібридна клітина, отримана шляхом трансплантації M на W

Відомий дослід Б. Л. Астаурова на шовкопрядах, для яких характерна поліспермія. Незапліднені яйця піддавали дії високої температури (тепловий шок) і рентгеновського опромінення. Ядра яйцеклітин за цих умов руйнувалися. Після проникнення в яйцеклітину сперматозоїдів (поліспермія) два з них зливаються і утворюють так звану андрогенетичну зиготу. З останньої розвиваються особини з чисто батьківським фенотипом.

Велике значення мали досліді з пересадкою ядер. З яєць африканської (шпоркової) жаби вилучали ядро і замість нього вносили ядро яйця іншого підвиду. Пересадку ядер здійснювали також у

прісноводних амеб; об'єктами слугували різні раси (або штами) амеб, що відрізнялись одна від одної певною альтернативною ознакою, наприклад, стійкістю до якоїсь хімічної сполуки. В усіх цих дослідках досліджуваний фенотип клітин з пересадженим ядром, як і фенотип їх нащадків, визначався походженням ядра, а не цитоплазми.

Із з'ясуванням ролі ядра у спадковості до хромосомної теорії цього явища залишався один крок. Його зробив У. Сеттон, який звернув увагу на дивовижний паралелізм у поведінці менделівських факторів спадковості і хромосом. Саме У. Сеттон у 1903 р. «помістив» ці фактори у хромосоми.

В 1901 р. Г. де Фріз сформулював мутаційну теорію, що співпала з поглядами російського ботаніка С. І. Коржинського. Таким чином, методологія генетики сформувалася на основі гібридологічного аналізу Г. Менделя, цитологічного методу і дослідження

мутаційного процесу. Ці три підходи стали основою класичної генетики.

Найважливіша віха в розвитку генетики — це створення **хромосомної теорії спадковості** американським ембріологом і генетиком Т. Х. Морганом і його школою (А. Стертевант, К. Бріджес, Г. Меллер та ін.). В середині 20-х років сформульовано принцип лінійного розташування генів у хромосомах і створено перший варіант теорії гена, яка стала центральною проблемою генетики.

Подальшим розвитком вчення про спадковість були роботи М. І. Вавілова (**закон гомологічних рядів у спадковій мінливості**), а також роботи Г. А. Надсона, Г. С. Філіпова, Г. Меллера та інших дослідників по індукованому мутагенезу. В 1929 р. О. С. Сєребровський вперше заговорив про складну структуру гена і його подільність.

Таким чином, хромосомна теорія була подальшим розвитком ядерної теорії спадковості. Її справедливість підтверджена найсучаснішими досягненнями біохімічної та молекулярної генетики.

Однак не тільки ядро, але й цитоплазматичні структури грають важливу роль у спадковості. Серед цих структур — **мітохондрії, пластиди, кінетоласти** та інші органели клітин еукаріотів. Вони мають власну генетичну інформацію і власні системи біосинтезу нуклеїнових кислот і білків, отже їм властива певна автономність. Оскільки контроль з боку ядра все-таки зберігається, то названі субклітинні структури цитоплазми називають напівавтономними. ДНК, що входить до цих структур, містить гени (**плазмогени**), що є носіями так званої **цитоплазматичної спадковості**. Однак участь цитоплазми у спадковості визначається не тільки наявністю в ній плазмогенів. Саме в цитоплазмі за участю рибосом синтезуються білки, що кодуються генами ядра. Ці білки забезпечують фенотиповий вияв геномної інформації, завдяки чому існує тісна взаємодія ядра і цитоплазми в процесах успадковування. Слід зважити й на те, що в цитоплазмі яйцеклітини в період її дозрівання накопичуються продукти генів матері, які можуть мати вирішальне значення на ранніх стадіях індивідуального розвитку еукаріотів.

У прокаріотів (наприклад, бактерій) немає ядра, але є його еквівалент — **нуклеоїд**. Це досить компактизована кільцева молекула ДНК, що фіксована на клітинній мембрані. Цю ДНК називають хромосомою в протилежність іншим, меншим за розмірами та інколи досить численним, молекулам ДНК, яких називають **плазмідами**. Саме ці структури прокаріотних клітин — **нуклеоїди і плазміди** — є носіями генетичної інформації.

2.2. Нуклеїнові кислоти як носії і гаранті реалізації генетичної інформації

Генетична інформація про всі властивості та ознаки організму — будову, фізіологічні особливості та процеси розвитку — записана в молекулах **генетичних нуклеїнових кислот (гНК)**. Дискретна одиниця спадковості — **ген** — є не чим іншим, як фрагментом молекули гНК. Не всі існуючі в клітині нуклеїнові кислоти — генетичні, бо не всі несуть, зберігають і передають інформацію нащадкам. Так, наприклад, **інформаційні РНК (іРНК), транспортні РНК (тРНК), рибосомні РНК (рРНК)** і, як вважають, навіть деякі молекули ДНК, не є генетичними, бо не утримують генів і не здатні передавати інформацію наступним поколінням. Однак зазначені молекули РНК забезпечують **реалізацію** генетичної інформації в клітині, тобто синтез закодованих у генах поліпептидів, і в цьому — їх основна біологічна роль. Крім того, в ядрах і в цитоплазмі клітин є чимало так званих **малих РНК**, які приймають участь у численних молекулярногенетичних процесах як їх співучасники і регулятори.

В природі роль гНК виконують як ДНК (у більшості видів організмів), так і РНК (деякі віруси). В клітинах еукаріотів генетичні ДНК дволанцюгові і входять до складу надмолекулярних комплексів і субклітинних структур — хромосом, мітохондрій, пластид, кінетопластів тощо. У бактерій генетичну функцію виконує ДНК. Як правило, це кільцеві дволанцюгові молекули, що майже вільні від білків і утворюють хромосому бактерії, а також нехромосомні кільцеві елементи меншого розміру — **плазмід**.

У вірусів роль гНК можуть виконувати як ДНК, так і РНК. Так, наприклад, фаг λ містить одну молекулу ДНК, а віруси Q β та поліомієліту — РНК, в яких закодована вся необхідна для цих вірусів інформація.

Молекули генетичних ДНК і РНК можуть бути **лінійними і кільцевими, одноланцюговими і дволанцюговими**. Інформація з ДНК переписується на різні за будовою РНК, молекули яких разом з рибосомами забезпечують синтез відповідних поліпептидів.

Молекули гНК вірусів та бактерій лише умовно називають хромосомами, бо вони за своєю організацією дуже відмінні від значно складніших за будовою хромосом еукаріотів.

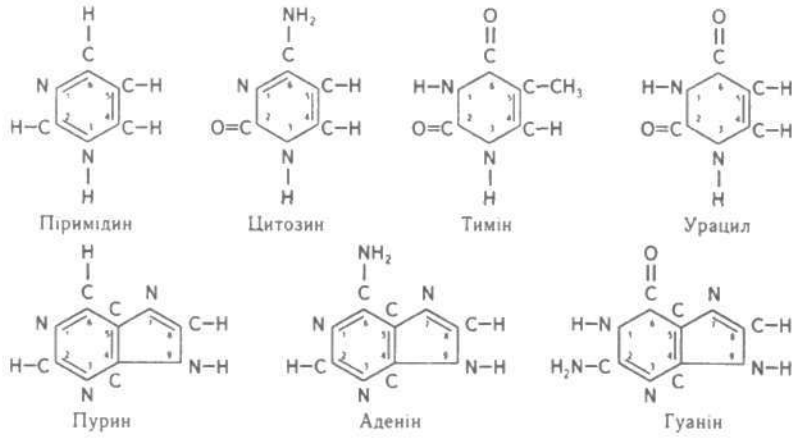
Для передачі генетичної інформації нащадкам, для збереження і захисту цієї інформації, а також для її реалізації в клітині існують складні молекулярногенетичні механізми, детально викладені в розділах 4—6. Зараз лише зауважимо, що подвоєння (іноді помножен-

ня) молекули ДНК, необхідне для передачі копій цієї молекули нащадкам, забезпечується процесом **реплікації** (синтезу ДНК), захист клітин від чужорідної генетичної інформації у прокаріотів здійснюється завдяки системі **модифікації-рестрикції**, а вилучення ушкоджень і виправлення помилок у структурі ДНК — завдяки системам **репарації** та **механізмів виправлення помилок**. Реалізація генетичної інформації передбачає два основних процеси — синтез РНК на матриці ДНК (**транскрипцію**) та синтез поліпептидного ланцюга (**трансляцію**) на матриці іРНК за участю **рибосом** та інших компонентів **білок-синтезуючої системи**. В деяких випадках реалізація генетичної інформації здійснюється з участю механізмів **зворотної транскрипції**, тобто синтезу ДНК на матриці РНК.

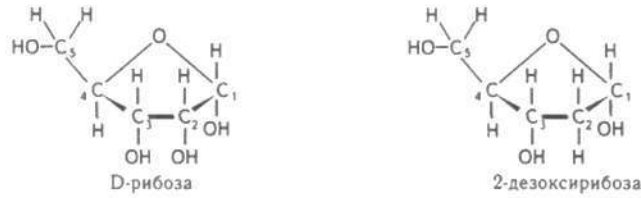
2.2.1. Первинна структура нуклеїнових кислот

ДНК і РНК являють собою **біополімери**, мономерними ланками яких є залишки **мононуклеотидів**. Мононуклеотиди — це фосфорні ефіри **нуклеозидів**, кожен з яких в свою чергу побудований із залишка **пентози** (рибози або дезоксирибози) і **азотистої основи** (похідної пурину або піримідину). В ДНК входять дві пуринових основи — **аденін** і **гуанін** — і дві піримідинових — **цитозин** і **тимін**. РНК замість тиміну містить **урацил**, а замість дезоксирибози — **рибозу**. Вуглеводний компонент у складі нуклеотиду з'єднується з гетероциклічною основою **N-глікозидним зв'язком**. Таким чином, нуклеозидні залишки в ДНК і РНК відносяться до **N-глікозидів**. Дуже часто у складі нуклеїнових кислот виявляються так звані **мінорні азотисті основи**, **мінорні вуглеводи** або **мінорні нуклеозиди** — дещо незвичайні та модифіковані компоненти нуклеотидів. Частка таких компонентів в залежності від виду нуклеїнової кислоти може складати від долей відсотка до десятків відсотків. Будова нуклеотидів та їх складових показана на рис. 2.3.

Залишки нуклеотидів-мономерів у нуклеїнових кислотах з'єднані між собою **фосфодиефірними зв'язками**, які здійснюються між 3'-вуглецевим атомом одного нуклеозидного залишку і 5'-атомом іншого. Тому зв'язок між двома сусідніми нуклеотидами називають **3'-5'-фосфодиефірним**. Полінуклеотидні ланцюги ДНК і РНК (рис. 2.4) полярні: на одному кінці завжди знаходиться вільна або заміщена група 3'-ОН, а на протилежному — фосфорильована або дефосфорильована група 5'-ОН, які не були використані на утворення наступного фосфодиефірного зв'язку. Ці кінці будь-якого полінуклеотиду позначають як 3' і 5'.



Піримідинові і пуринові основи (азотисті основи), що входять до складу молекул ДНК і РНК



Цукри, що входять до складу молекул ДНК і РНК

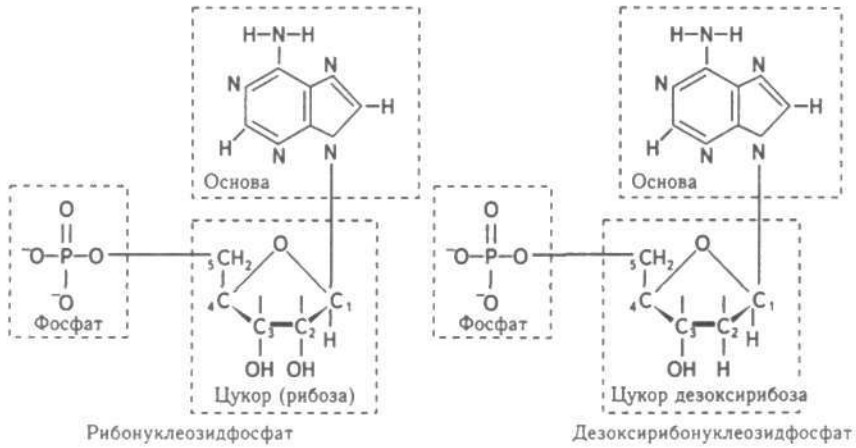


Рис. 2.3. Будова нуклеотидів РНК і ДНК та їх компонентів

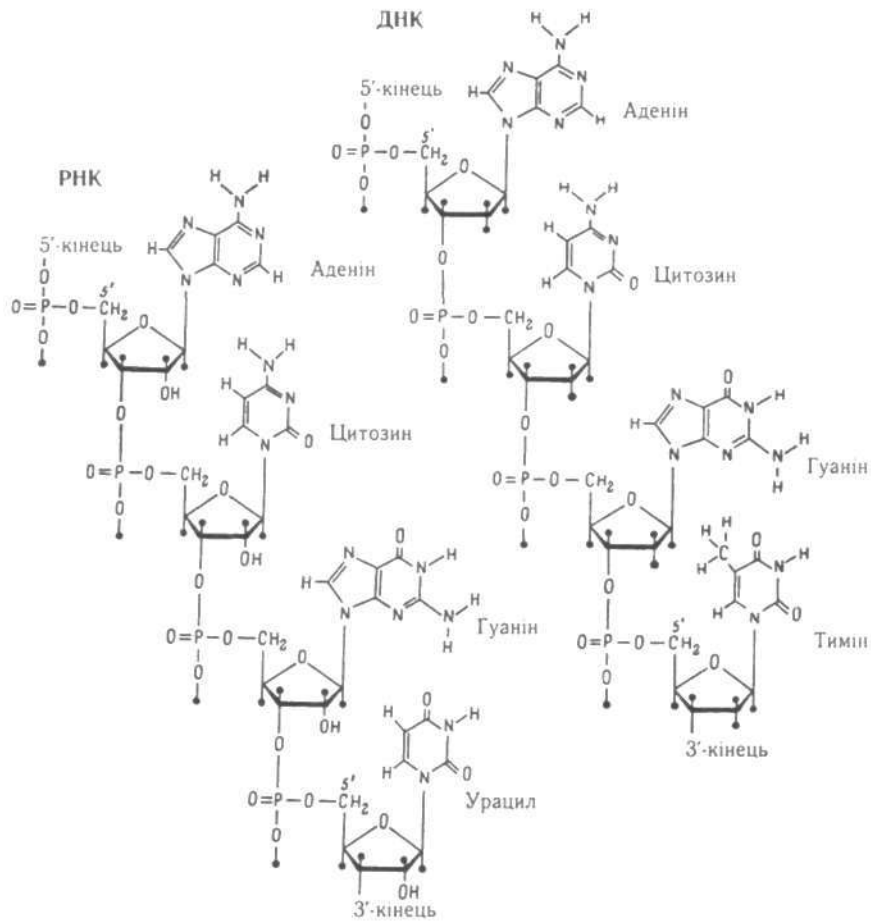


Рис. 2.4. Полінуклеотиди у складі ДНК і РНК

Фосфодієфірні зв'язки в дезоксирибополінуклеотидах і в рибополінуклеотидах відрізняються хімічними властивостями. Міжнуклеотидні зв'язки в РНК набагато лабільніші, ніж в ДНК: вони легко гідролізуються в лужному середовищі. Це використовується в деяких методах диференційного визначення ДНК і РНК, а також в інших аналітичних процедурах.

У клітині міжнуклеотидні зв'язки в ДНК і РНК розщеплюються ферментами нуклеазами або фосфодієстеразами, які можуть бути ДНК-азами, РНК-азами і ферментами з неспецифічною по відношен-

ню до субстрата дією («всеїдні» ферменти). Залежно від того, де розриваються фосфодієфірні зв'язки — в середині молекули полі-нуклеотиду чи починаючи з його кінця, — нуклеази поділяють на **ендонуклеази** і **екзонуклеази**. Останні можуть розпочинати свою роботу з 5'-кінця біополімеру і послідовно відривати по одному нуклеотиду, просуваючись у напрямку 3'-кінця (5' → 3'-екзонуклеазна активність). Іншим екзонуклеазам властива 3' → 5'-екзонуклеазна дія. Є білки, що одночасно є 5' → 3' і 3' → 5'-екзонуклеазами. В усіх випадках дія екзонуклеаз призводить до відщеплення від молекули нуклеїнової кислоти (полінуклеотиду) окремих нуклеотидів. В протилежність цьому, ендонуклеази, що розривають між-нуклеотидні зв'язки в середині молекул ДНК або РНК, призводять до розпаду їх головним чином на фрагменти (полі- чи **олігонуклеотиди**), які далі розщеплюються екзонуклеазами. Серед нуклеаз особливе місце займають **ендонуклеази рестрикції (рестриктази)**, які розпізнають у молекулі ДНК певну специфічну послідовність нуклеотидів і тому розрізають будь-яку ДНК на порівняно невелику кількість фрагментів. Досить специфічне розщеплення РНК здійснює фермент рибонуклеаза Н, що гідролізує полірибонуклеотиди тільки в ДНК-РНК-комплексах. Заслужовує уваги ще одна група гідролітичних ферментів — **ДНК-Н-глікозилази**, що здатні специфічно розривати N-глікозидний зв'язок між тією чи іншою азотистою основою і цукрофосфатним ланцюгом ДНК. Внаслідок такої дії в ДНК утворюються так звані **апуринові сайти**.

Зазначені ферменти, завдяки специфічності їхньої дії і здатності розпізнавати ті чи інші нуклеотиди та нуклеотидні послідовності, широко використовуються для дослідження первинної структури молекул ДНК і РНК.

В поняття **первинної структури ДНК і РНК** входить будова їх мономерних залишків, хімічна природа міжнуклеотидних ковалентних зв'язків і послідовність розташування мономерних ланок у полі-нуклеотидному ланцюгу.

Запис генетичної інформації в молекулах гНК природа здійснила у вигляді певної послідовності нуклеотидів, в якій закодована послідовність амінокислот у відповідних поліпептидних ланцюгах (рис. 2.5). *Код, що відповідає одній амінокислоті, складається із трьох нуклеотидів і називається кодоном*. Отже, ген, який кодує певний поліпептид, можна розглядати як певну послідовність кодонів (триплетів нуклеотидів). Гіпотеза про існування коду, який містить три нуклеотиди в кожному кодоні, була запропонована А. Гамовим (1954) і експериментально доведена Ф. Кріком (1961). Для цього було проведено ретельний генетичний аналіз мутацій в локусі *rII* бактеріофага T4, індукованих профлавіном — речовиною,

що спричиняє вставку або вилучення (делеції) нуклеотидів у молекулах ДНК. Мутантам *rII* властивий великий розмір негативних

		Друга основа					
		U	C	A	G		
Перша основа (5')	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	Третя основа (3')	U
		UUC } Leu	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys		C
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } Терм	UGA } Терм		A
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } Терм	UGG } Trp		G
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C	
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A	
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G	
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C	
		AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
		AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G	
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C	
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A	
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G	

Рис. 2.5. Генетичний код. Виродженість коду:

Терм — термінуючі триплети

колоній на газоні *E. coli* штаму В і відсутність росту на бактеріальному штамі К12, чим вони і відрізняються від фагових часток дикого типу. В схрещуваннях різноманітних мутантів з фенотипом *rII* Ф. Крік установив, що у гібридів іноді можливе відновлення дикого фенотипу (реверсія), але це буває за поєднання в одному гені лише певної кількості вставок і вилучень нуклеотидів. Найбільш сприятливими для збереження дикого фенотипу фагів виявилися вставки і делеції із трьох або кратної трьом кількості нуклеотидів. На підставі цих генетичних експериментів було зроблено важливий висновок про **триплетність генетичного коду**. Пізніше цей висновок був підтверджений прямим порівнянням послідовностей нуклеотидів у певних генах з амінокислотними послідовностями в їх поліпептидних продуктах. З'ясувалося, що послідовності кодонів (**триплетів**) у гені і амінокислот у відповідному поліпептиді є **колінеарними**, тобто відповідними одна одній.

Структура окремих триплетів, які кодують індивідуальні амінокислоти, вперше була з'ясована М. Ніренбергом, Дж. Маттеї (1961) і С. Очоа (1962). У подальшому зусиллями названих та інших авторів генетичний код був повністю розшифрований. Із чотирьох нуклеотидів, що входять до складу нуклеїнових кислот, можна утворити 64 триплети або кодони (4^3), які і кодують 20 амінокислот у складі білків. Це означає, що кодонів більше, ніж амінокислот, і більшість останніх кодується двома або більшою кількістю триплетів. Слід зазначити, що всі кодони зчитуються послідовно один за одним, починаючи з певного нуклеотиду, без будь-яких розділових знаків між ними, тобто зчитування здійснюється в межах певної рамки. Порушення **рамки зчитування** на число нуклеотидів, що не кратне трьом, спотворює генетичний зміст усієї послідовності нуклеотидів. Донедавна вважалося, що код є універсальним, тобто ідентичним для всіх об'єктів дослідження. Проте з'ясувалося, що ця властивість коду не абсолютна, і принаймні в ДНК мітохондрій зміст деяких кодонів зовсім не такий, як у ДНК ядра.

Отже, основні властивості генетичного коду такі:

- 1) код **триплетний** (кожна амінокислота кодується трьома нуклеотидами);
- 2) **не перекривається** (сусідні триплети не мають спільних нуклеотидів);
- 3) **колінеарний** (розміщення кодонів відповідає амінокислотній послідовності кодованого поліпептиду);
- 4) **вироджений** (усі амінокислоти, крім метіоніну і триптофану, кодуються двома або більшою кількістю триплетів);
- 5) **не містить розділових знаків** між сусідніми триплетами;
- 6) **специфічний** (один кодон відповідає лише одній амінокислоті);
- 7) в основному **універсальний**.

Із 64 триплетів 61 є **значущим**, тобто кодуючим амінокислоти. Два значущих кодони у складі інформаційної РНК — AUG і GUG — називають **ініціюючими**, бо саме з них рибосома розпочинає синтез генного продукту, тобто поліпептиду. Три триплети у складі інформаційної РНК — UAA, UAG і UGA — називають **нонсенс-кодонами** або **беззмістовними**, бо вони не кодують амінокислот. Проте назва «нонсенс» не дуже вдала, бо ці кодони визначають закінчення синтезу поліпептидного ланцюга, отже несуть дуже важливе смислове навантаження. Тому більш коректно їх називати **термінуючими** триплетами.

Все сказане щодо генетичного коду відноситься до генетичних ДНК і РНК, а також до **інформаційної РНК** (іРНК), яка пере-

носить інформацію від гНК до рибосом. Первинна структура інших нуклеїнових кислот — **рибосомних РНК** (рРНК), **транспортних РНК** (тРНК), ряду **малих рибонуклеїнових** — теж складається з певної послідовності нуклеотидів, проте кодонів у складі цих нуклеїнових кислот немає і вони не кодують структури поліпептидів. Як вже зазначалося, ці РНК необхідні для реалізації генетичної інформації гена. Рибосомні РНК разом із специфічними білками входять до складу **рибосом** — субклітинних структур, яких іноді ще називають фабриками збірки білкових молекул. Щодо транспортних РНК, то їх функція полягає в доставці активованих форм амінокислот у вигляді аміноацил~тРНК до місця збірки поліпептидів, тобто до рибосом.

Слід зазначити, що й у випадку гНК далеко не вся протяжність її молекули значуща, тобто містить кодони. Так, наприклад, ДНК хромосом еукаріотів має кодуючі і некодуючі ділянки, які чергуються уздовж одного кодогенного полінуклеотидного ланцюга, а іноді й обох комплементарних ланцюгів молекули ДНК.

2.2.2. Макромолекулярна організація ДНК

Просторова організація ДНК і РНК визначається їх нуклеотидними послідовностями через структури двох рівнів — вторинну і третинну. **Вторинна структура** (певний ступінь спіральності) створюється взаємодією в полінуклеотидному ланцюгу сусідніх нуклеотидів, а у випадку двоспіральних молекул (або зведеного в просторі ланцюга однієї молекули) також взаємодією нуклеотидних залишків, що знаходяться один проти одного у подвійній спіралі. **Третинна структура** нуклеїнових кислот (форма молекул) виникає завдяки взаємодії нуклеотидних залишків, що належать різним фрагментам вторинної структури.

Вторинна структура ДНК. В 1953 р. Дж. Уотсон і Ф. Крік збудували першу модель молекулярної організації ДНК, згідно з якою ця молекула являє собою праву спіраль, утворену двома полінуклеотидними ланцюгами, закрученими один на одного і навколо спільної осі. Автори знайшли, що це правило виконується в тому випадку, якщо аденін (А) одного ланцюга утворює стабілізовану водневими зв'язками пару з тиміном (Т), а гуанін (G) — з цитозином (С). Ці взаємодіючі пари (А :::: Т і G :::: С) отримали назву **комплементарних** (рис. 2.6).

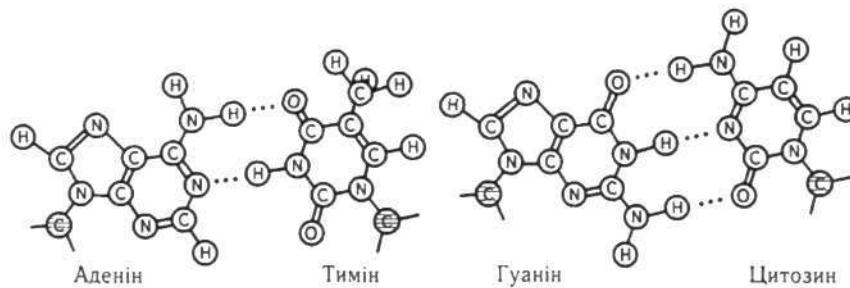


Рис. 2.6. Пари аденіну з тиміном і гуаніну з цитозином у двоспиральній молекулі ДНК:

Атом С' дезоксирибозного залишку заштриховано

Свою модель ДНК Дж. Уотсон і Ф. Крік запропонували, спираючись на дані рентгеноструктурного аналізу М. Уілкінса і Р. Франклін, а також на правила, встановлені до того Е. Чаргафом. Згідно з цими правилами в молекулі ДНК:

а) сума пуринових азотистих основ дорівнює сумі піримідинових

$$A + G = C + T;$$

б) вміст аденіну дорівнює вмістові тиміну, а вміст гуаніну дорівнює вмістові цитозину, тобто

$$A/T = G/C = 1.$$

Разом з тим відношення $A + T/G + C$ видоспецифічне і дуже відрізняється у різних видів організмів.

Саме ці дані і дали можливість заключити, що ДНК — це дволанцюгова спіральна структура, в середині якої знаходяться спарені азотисті основи (А—Т і G—C), а зовні — фосфатні групи нуклеотидів. Спіраль закручена таким чином, що на її поверхні утворюється дві борозни: велика (шириною біля 2,20 нм) і мала (шириною біля 1,20 нм). Полінуклеотидні ланцюги у спіралі ДНК антипаралельні (рис. 2.7), тобто на кожному з кінців лінійної дволанцюгової

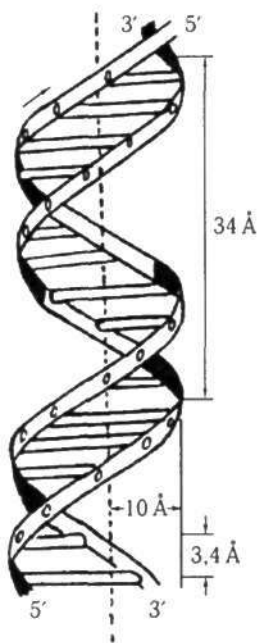


Рис. 2.7. Модель дволанцюгової спіральної молекули ДНК

молекули ДНК розташовані 5'-кінець одного і 3'-кінець другого ланцюга. Діаметр спіралі дорівнює 1,80 нм, довжина витка приблизно 3,40 нм, в одному витку спіралі вміщується 10 нуклеотидних залишків. Пізніше було з'ясовано, що модель Уотсона і Кріка описує структуру однієї найбільш розповсюдженої подвійної спіралі, що була названа **В-формою** або **В-конформацією**. В подальшому з'ясувалося, що існують і інші форми ДНК, які можуть взаємно переходити одна в одну. Деякі параметри цих конформацій у порівнянні з В-конформацією наведені у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Найважливіші конформації ДНК та деякі їх параметри

Конформація (форма)	Довжина витка спіралі (нм)	Відстань між нуклеотидами (нм)	Кількість нуклеотидів на виток
B	3,40	0,34	10
A	2,80	0,25	11
C	3,10	0,32	9
Z	—	0,37	12

ДНК у В-формі спостерігається за високої відносної вологості (92%). Якщо остання складає 70%, то В-форма переходить у **А-форму**, для якої необхідна наявність іонів Na^+ , K^+ і Zs^+ . Це скорочує довжину ДНК приблизно на 25% у порівнянні з В-формою.

Структура ДНК в А-формі характерна для гібридних молекул ДНК—РНК, отже утворюється за синтезу РНК. За низької вологості (66%) у присутності Li^+ виникає С-форма. Вважають, що С-форма частково утворюється у хроматині, де ДНК асоційована з білками, а також у складі деяких вірусів.

Існують ділянки ДНК, особливо багаті G—C парами, які переходять у лівозакручену Z-форму. Z-форма має зигзагоподібний вигляд, регулярна спіраль відсутня. Вважають, що перехід правозакрученої форми до лівозакрученої слугує сигналом, контролюючим експресію генів.

Третинна структура ДНК. В природі існують лінійні і кільцеві молекули ДНК. Лінійна молекула в ядрах еукаріотів упакована в компактну структуру і займає всього $\frac{1}{5}$ об'єму клітини. Наприклад, довжина ДНК хромосоми людини може досягати 8 см, але компактизована так, що вміщується у хромосомі довжиною 5 нм. Отже, спіралізована молекула ДНК у подальшому може утворювати більш компактні структури, в тому числі кільцеву форму і суперспіраль.

Важливою характеристикою кожної ковалентно замкнутої молекули ДНК є кількість **зацеплень** (перехрестів) одного полінуклеотидного ланцюга з іншим у двоспиральному кільці. Якщо збільшувати або зменшувати число витків подвійної спіралі, зберігаючи ковалентну цілісність обох ланцюгів, то в зв'язку з інваріантністю числа зацеплень такі зміни будуть компенсуватись утворенням певної кількості супервитків (рис. 2.8). Залежно від напрямку останніх

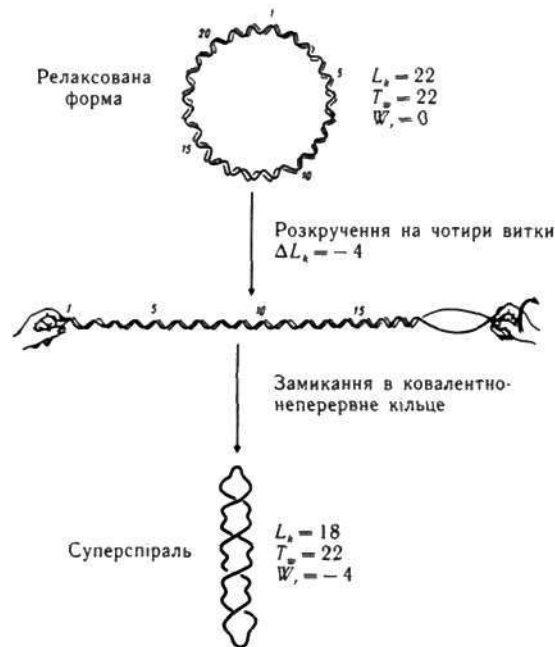


Рис. 2.8. Схема, що ілюструє утворення негативно спіралізованої кільцевої ковалентно замкнутої ДНК:

L_k — спіральність реальної ДНК, T_w — теоретично можлива спіральність у відсутність зацеплень, W — кількість супервитків (число зацеплень)

(вправо чи вліво) надспіралізація може бути **позитивною** або **негативною**. Ковалентно замкнуті кільцеві ДНК, виділені із клітин, завжди мають негативну надспіралізацію. Така ДНК має значний запас енергії в порівнянні з релаксованою формою і сприяє локальному розплітання ланцюгів двоспиральної ДНК, утворенню хрестовидних структур у ній та існуванню окремих GC-багатих ділянок ДНК у Z-формі. Практично будь-яка ДНК містить інвертовані або

паліндромні повтори послідовностей довжиною від декількох пар нуклеотидів (п. н.) до багатьох сотень пар нуклеотидів. Саме в цих місцях молекули ДНК можна чекати перетворення лінійної двоспиральної форми паліндрому у хрестовидну (рис. 2.9).

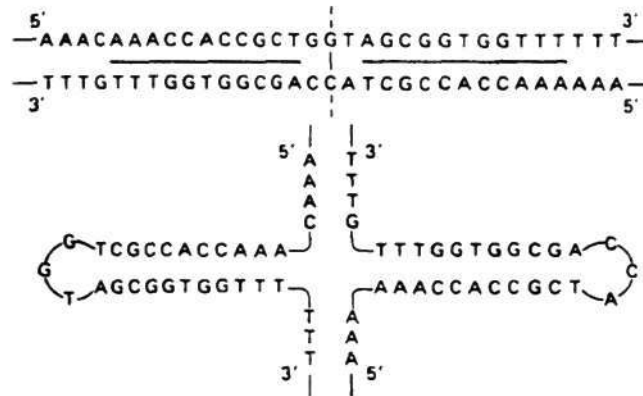


Рис. 2.9. Лінійна і хрестоподібна структури ділянки плазмиди, яка містить паліндром (на рисунку підкреслений)

Надспіралізація ДНК властива хромосомам вірусів, бактерій, еукаріотів. Молекули ДНК мітохондрій, хлоропластів, хромосом і плазмід бактерій, а також ДНК багатьох вірусів мають кільцеву форму, майже вільні від білків і надспіралізовані.

Існують ферменти, здатні збільшувати або зменшувати кількість супервитків, тобто регулювати надспіральність ДНК. Це **топоізомерази I і II** — ферменти, що можуть змінювати кількість супервитків у кільцевих, ковалентно замкнутих ДНК.

Крім подвійних спіралей (модель Уотсона—Кріка), зустрічаються і одноланцюгові ДНК. Приклади — ДНК фагів φX174, M13 та ін. В процесі життєвого циклу фага такі ДНК утворюють двоспиральну (реплікативну) форму.

Отже, первинна і макромолекулярна будови молекул природних ДНК дуже різноманітні і унікальні для кожного виду організмів.

2.2.3. Макромолекулярна структура РНК

Переважає більшість РНК живих істот є одноланцюговими. Однак у деяких вірусів (реовірус, вірус ранових пухлин та ін.) зустрічаються дволанцюгові РНК, які виконують роль носіїв гене-

тичної інформації. Крім того, дволанцюгові РНК утворюються в процесі розмноження деяких вірусів, у яких генетична РНК є одноланцюговою. Геномна РНК майже у всіх вірусів лінійна (вірус тютюнової мозаїки — ВТМ, фаг Q β , віруси поліомієліту, грипу, везикулярного стоматиту і т. д.), однак у віроїдів геномна РНК представлена низькомолекулярними одноланцюговими кільцевими молекулами, здатними до автономного розмноження в рослинах.

Із негенетичних РНК у клітинах еукаріотів існує три основних типи одноланцюгових молекул: **рибосомні РНК** (рРНК), **транспортні РНК** (тРНК), а також **матричні** або **інформаційні РНК** (мРНК або іРНК). Кожен з цих типів виконує свою специфічну роль у складному процесі біосинтезу білка. Загальні принципи організації вторинної структури таких одноланцюгових РНК були сформульовані П. Дати і О. С. Спіріним.

Рибосомні РНК складають до 90% усієї РНК клітини, вони досить стабільні. У прокаріотів розрізняють три різних типи рРНК з коефіцієнтами седиментації 23S, 16S і 5S; у еукаріотів — чотири типи: 28S, 18S, 5S і 5,8S. S (сведберг) — це одиниця коефіцієнту, який є пропорційним седиментації молекули за даного відцентрового прискорення і, отже, залежить від маси і форми молекул.

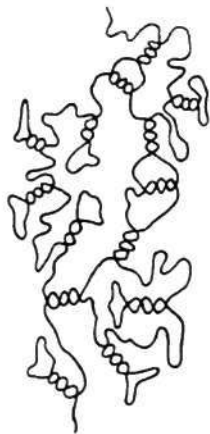


Рис. 2.10. Схема вторинної і третинної структур рРНК

Всі рРНК разом з рибосомними білками входять у структуру рибосом. Вторинна структура рРНК представлена короткими двоспіральними ділянками, які утворюються поєднанням зігнутих одноланцюгових сегментів однієї і тієї ж молекули (рис. 2.10).

Для первинної структури рРНК характерна наявність модифікованих основ, хоч їх тут і менше, ніж у тРНК. В основному це метильовані нуклеотиди, причому метильні групи приєднані або до азотистої основи, або до рибози по місцю розташування 2'-ОН-групи.

Транспортні РНК являють собою одноланцюгові молекули, що складаються із 70—90 нуклеотидів; молекулярна маса їх 23—28 кДа, константа седиментації — 4S. В загальній кількості РНК у клітині на долю тРНК приходить 10—20%. Молекула тРНК здібна ковалентно зв'язуватися з відповідною їй амінокислотою і приєднуватися через систему водневих зв'язків до одного із триплетів (кодонів) молекули іРНК. Таким чином тРНК реалізують кодову відповідність між кодонами іРНК і амінокислотами. Для виконання цієї адапторної

функції тРНК мусять мати цілком певну вторинну і третинну структуру.

Кожна молекула тРНК утворює локальні спіральні ділянки, які розмежовуються одноланцюговими петлями. Кількість спіралізованих областей досягає половини загальної довжини полінуکلєотидного ланцюга. Спарені послідовності утворюють характерні елементи структури — стебла, на яких розташовані петлі. Наприклад, на рис. 2.11 показана тРНК дріжджів, що має такі типові структури:

а) акцепторне стебло, на 3'-кінці якого (акцепторний кінець) в більшості випадків розташовано три нуклеотидних основи —

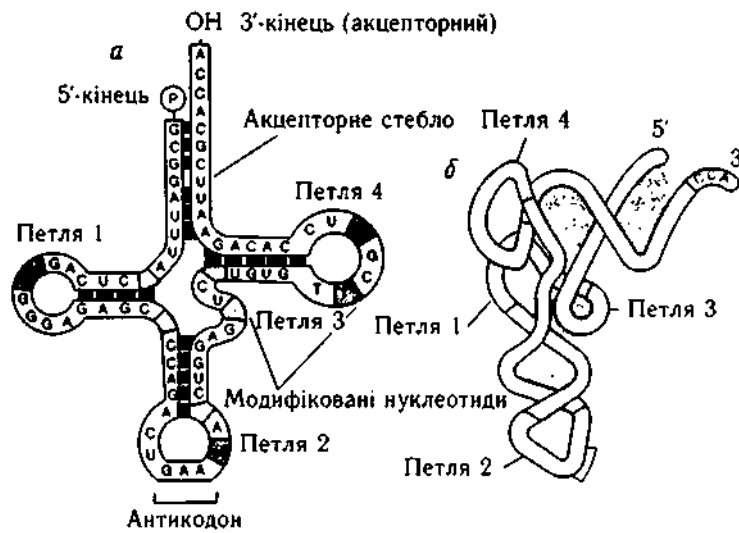


Рис. 2.11. Фенілаланінова тРНК дріжджів:

а — комплементарні ділянки, що утворюють спіралізовані стебла; б — схематичне зображення реальної форми молекули тРНК, отримане на підставі рентгеноструктурного аналізу. Взаємодіючі сегменти ланцюгів затемнені. Петлі 1 — дигідроуридилова, 2 — антикодона, 3 — додаткова, 4 — псевдоуридилова або ТΨС-петля.

ССА-ОН. За участю специфічних ферментів — аміноацил-тРНК-синтетаз — α -карбоксильна група відповідної амінокислоти ковалентно зв'язується з термінальною основою послідовності ССА, тобто з залишком аденілової кислоти по місцю розташування 3'-ОН-групи. Існує 20 видів ферментів цього типу — по одному для кожної з 20-ти амінокислот;

б) **псевдоуридинова або ТФС-петля** із семи нуклеотидів, в якій міститься мінорний нуклеозид — псевдоуридин; вважається, що ТФС-петля використовується для взаємодії тРНК із рибосомою;

в) **додаткова петля** — різна за розміром і складом у окремих тРНК;

г) **антикодонова петля** складається із семи нуклеотидів і містить групу із трьох основ (антикодон), яка комплементарна відповідному кодонові молекули іРНК;

д) **дигідроуридилова петля (D-петля)** у різних тРНК містить від 8 до 12 нуклеотидів, із яких від одного до чотирьох — дигідроуридилові залишки. Вважають, що D-петля використовується для взаємодії тРНК з аміноацил-тРНК-синтетазою.

Третинна структура молекули тРНК дуже компактна, так що вся молекула має вигляд палочки, загнутої у вигляді букви Г (рис. 2.11). Складна просторова укладка молекули обумовлена, як і у випадку рРНК, полівалентними катіонами (Mg^{2+} , поліаміни), численними водневими зв'язками між основами і фосфоднефірним остовом, а також специфічною взаємодією з білками та іншими нуклеїновими кислотами. Наявність високої кількості мінорних основ у молекулах тРНК обумовлює їх стійкість до дії нуклеаз і забезпечує певну структуру і функцію цих молекул.

У більшості клітин еукаріотів утримується цілий набір тРНК (біля 60). Це означає, що для кожної амінокислоти існує більш ніж по одній тРНК. Різні молекули тРНК, що акцептують одну і ту ж амінокислоту, називають **ізоакцепторними**. Кожен тип клітин в організмі має своє співвідношення ізоакцепторних тРНК.

Інформаційна (матрична) РНК (іРНК, мРНК) містить генетичну інформацію про послідовність амінокислот у поліпептидах і слугує матрицею для їх біосинтезу. Первинна структура іРНК містить кодони, відповідні кодонам ДНК, на матриці якої ця іРНК синтезується.

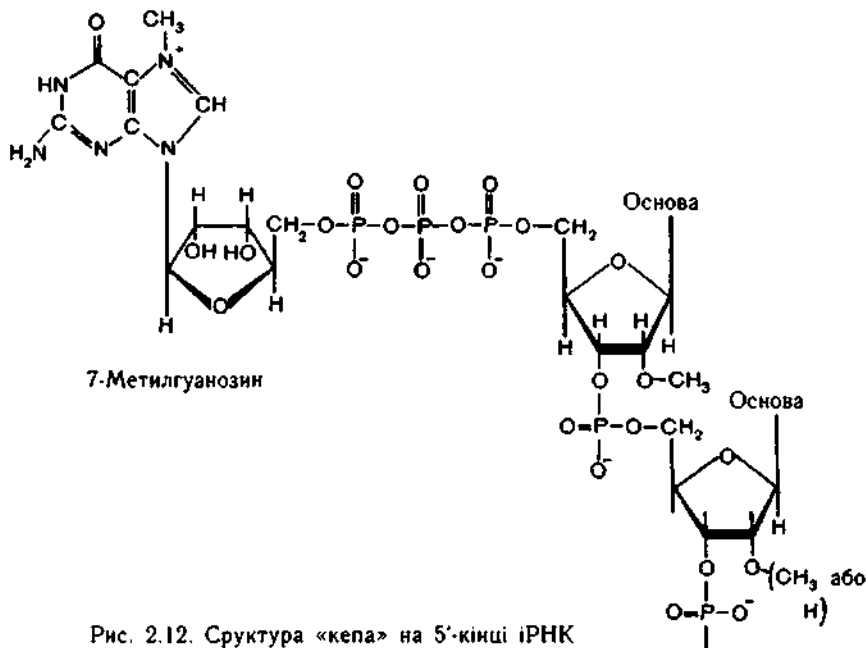
Маса іРНК у клітині складає не більше 5% загальної кількості РНК. Окремі молекули іРНК гетерогенні за розмірами; константи седиментації цих молекул коливаються у широких межах — від декількох одиниць Сведберга до 20S і більше залежно від того, якої протяжності поліпептид кодується.

Вторинна структура іРНК формується за рахунок комплементарних послідовностей, що містяться в різних ділянках цих молекул. Значна кількість спарованих ділянок може виникати в 3'- і 5'-зонах іРНК. Наявність часткової гомології 5'-кінців іРНК і 3'-областей 18S-рРНК призводить до утворення в 40S-субодиниці рибосоми еукаріотів стабільного комплексу. Третинна структура іРНК формується головним чином за рахунок водневих зв'язків, гідро-

фобних взаємодій, геометричного і стеричного обмеження, електростатичних сил.

Матрична РНК метаболічно дуже активна і в порівнянні з іншими типами РНК являє собою дуже лабільну, короткоживучу форму, хоч із цього правила є певні винятки. Так, іРНК мікроорганізмів швидко оновлюється, і тривалість життя цих молекул — декілька хвилин. У еукаріотів іРНК більш стабільні; їх існування в клітині може вимірюватися десятками хвилин, годинами і навіть днями.

Стабільність іРНК може визначатися різного типу модифікаціями її молекул. Встановлено, що 5'-кінцева послідовність іРНК вірусів і еукаріотів «кепована» (від англ. *cap* — шапка). Першим нуклеотидом у 5'-термінальній структурі кепа є 7-метилгуанозин-фосфат, який з'єднується з наступним нуклеотидом 5'-5'-пірофосфатним зв'язком (рис. 2.12). Другий нуклеотид метильовано по С₂



рибозного залишку, а в третьому нуклеотиді метильної групи може й не бути. Ще однією особливістю іРНК еукаріотів є те, що на 3'-кінцях багатьох цих молекул бувають досить довгі (50—200 залишків) повтори аденилової кислоти (полі-А), які приєднуються до

вже синтезованих молекул іРНК з допомогою спеціальних ферментів. Вважають, що 5'-кепи і 3'-полі-А-последовності іРНК необхідні для стабілізації молекули (захист від дії нуклеаз), для проникнення її з ядра у цитоплазму, а також для регулювання процесу трансляції.

2.3. Хромосоми. Роль хромосом у спадковості

Із усіх клітинних компонентів, що спостерігаються в процесі мітозу і мейозу, найбільш досконало вивчені хромосоми. Їх наявність була виявлена задовго до того, як Вальдейер запропонував назву «хромосома» (1888 р.).

Хромосоми містяться в каріоплазмі і характеризуються постійністю кількісного і якісного складу в клітинах даного виду (Е. ван Бенеден, Т. Бовері). *Кількісний та якісний склад хромосом, властивий особинам даного виду, називається каріотипом.* У більшості диплоїдних видів каріотип складається з 5—30 пар хромосом, однак відомі види, клітини яких містять лише одну пару (малярійний плазмодій) або сотні пар (радіолярія) (табл. 2.2). Кількість хромосом у гаплоїдному наборі позначають буквою *n*, у диплоїдному — *2n*.

Таблиця 2.2

Кількість пар (гаплоїдне число) хромосом у деяких рослин і тварин

Деякі представники рослинного світу	Кількість пар хромосом	Деякі представники тваринного світу	Кількість пар хромосом
Нейроспора	7	Радіолярія	800
Горох	7	Малярійний плазмодій	1
Овес	21	Кімнатна муха	6
Жито	7	Дрозофіла	4
Ячмінь	7	Окунь	14
Кукурудза	10	Миша	20
Томати	12	Щур сірий	21
Хламідомонада	16	Собака	39
М'яка пшениця	21	Кішка	19
Слива	24	Тувовий шовкопряд	28
Вишня садова	16	Шимпанзе	24
Черешня	8	Людина	23
Картопля	24		

Хромосоми однієї пари називають гомологічними; одна з них належить чоловічій батьківській формі, друга — жіночій материнській. Їх об'єднання в одному каріотипі здійснюється під час запліднення, тобто зливання статевих клітин. *Хромосоми різних пар називають гетерологічними*.

В статевих клітинах диплоїдних організмів міститься лише половина (**гаплоїдне число**) тієї кількості хромосом, яка властива соматичним клітинам. Злиття двох статевих клітин (гамет) під час запліднення забезпечує відновлення **диплоїдного** (подвійного) набору хромосом у соматичних клітинах нащадків.

Хромосоми являють собою компоненти ядра, яким властива особлива організація, індивідуальність і функція. Вони здатні до самовідновлення і збереження своїх морфологічних і фізіологічних властивостей протягом послідовних клітинних поділів, завдяки чому можуть виконувати роль носіїв генетичної інформації. *Хімічну субстанцію хромосоми називають хроматином*.

2.3.1. Морфологія хромосом. Каріотип

Морфологічні особливості хромосом зручно вивчати на стадіях метафази і анафази мітозу. В цей час вони мають вигляд циліндричних тілець, які інтенсивно забарвлюються основними барвниками і дають позитивну реакцію Фельгена на наявність ДНК.

Хромосоми можна вивчати на зрізах тканин, але набагато зручніше — на «давлених» препаратах або в мазках. При цьому дрібні кусочки тканини можна роздавити між покрівним і предметним скельцями і одночасно зафіксувати та забарвити оцтовим гематоксином або ацетокарміном. Застосувавши обробку тканини гіпотонічним розчином, можна спричинити набухання ядра і добитися розходження окремих хромосом. Хромосоми людини краще всього вивчати на мазках кісткового мозку, культурах лейкоцитів та інших клітин.

Форма хромосоми визначається місцем розташування **первинної перетяжки**, яка виглядає як звуження хромосоми. В цій ділянці знаходиться світла зона з невеликою гранулою або сферулою. Ця світла зона називається **центромерою** (грецьке «мерос» — частина), її функція пов'язана з переміщенням хромосоми під час мітозу або мейозу. До неї приєднуються нитки мітотичного **ахроматинового веретена**. Кожна хромосома звичайно має лише одну центромеру (моноцентрична хромосома), однак можуть зустрічатися хромосоми з двома центромерами (дицентричні) і навіть з більшою їх кількістю (поліцентричні хромосоми). У деяких комах (*Hemiptera*) центромери хромосом мають дифузну структуру. Як прави-

ло, хромосома ділиться центромерою на дві рівні або нерівні частини, які називаються **плечами** хромосоми.

Іншою морфологічною ознакою хромосом є так звана **вторинна перетяжка**, яка властива не всім хромосомам. Ця перетяжка може бути короткою або довгою і локалізується в різних точках уздовж хромосоми. В окремих випадках вторинна перетяжка відокремлює від основної структури хромосоми невелике кулясте потовщення; така хромосома носить назву **хромосоми із супутником або сателітом** — SAT-хромосома (рис. 2.13).

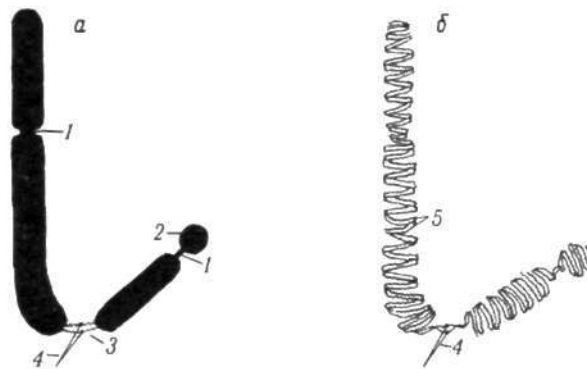


Рис. 2.13. Схематичне зображення метацентричної хромосоми:

а — зовнішній вигляд (1 — вторинна перетяжка; 2 — супутник; 3 — центромера; 4 — нитки веретена); б — внутрішня структура тієї ж хромосоми з двома хромонемами (5) і великими та малими спіралями

Поява деяких вторинних перетяжок пов'язана з утворенням ядерець. Ці спеціалізовані ділянки окремих хромосом називають **зонами ядерець** або **ядерцевими організаторами**.

Кінцеві ділянки хромосом називаються **теломерами**. Якщо хромосоми розриваються під впливом дії рентгенівського опромінення, то окремі їх фрагменти можуть знову з'єднуватись, але вони ніколи не з'єднуються з теломерами, що свідчить про особливу будову останніх на молекулярному рівні.

Виходячи із форми хромосом на стадії метафази або анафази, розрізняють такі їх типи (рис. 2.14): **телоцентричні** — палочковидні хромосоми з центромерою, розташованою на проксимальному кінці; **акроцентричні** — палочковидні хромосоми з дуже коротким, майже непомітним другим плечем; **субметацентричні** з плечима неоднакової довжини, які нагадують формою букву L, і **метацентричні** хромосоми, які мають плечі рівної або майже рівної довжини

і нагадують букву V. Певний тип будови є постійним для кожної пари гомологічних хромосом.



Рис. 2.14. Залежність форми хромосом у метафазі від положення центромери:

1, 7 — метацентричні; 2 — субметацентрична; 3, 4, 5 — акроцентричні; 6 — телоцентрична; 8 — акроцентрична із вторинною перетяжкою; 9 — хромосома з супутником; центромери позначено світлим кружком

Найбільш важливими ознаками, що дають можливість ідентифікувати окремі хромосоми в процесі мітозу, є їх кількість, відносні розміри, форма, поведінка і внутрішня будова. Інші ознаки, наприклад ступінь спіралізації і лінійна протяжність, підлягають фізіологічним змінам. Дуже важливим критерієм для ідентифікації хромосом є місце розташування в них центромер і вторинних перетяжок, а також наявність і локалізація супутників.

У структурі хромосом з допомогою світлового мікроскопу розрізняють більш темні ділянки — так званий **гетерохроматин** і світлі зони — **еухроматин**. У гетерохроматині хромосоми більш спіралізовані (компактні), чим і пояснюється їх більш інтенсивне забарвлення на цитологічних препаратах. Розрізняють **конститутивний** гетерохроматин, який постійно виявляється у хромосомі, і **факультативний**, який то появляється, то зникає залежно від стадії клітинного циклу та фізіологічного стану клітини. Конститутивний хроматин локалізується головним чином у прицентромерних та теломерних районах хромосоми, де міститься основна кількість так званої сателітної ДНК, що не містить значущих послідовностей (генів). У процесі мітозу гетерохроматинові ділянки можуть зафарблюватися більш або менш інтенсивно, ніж еухроматинові (позитивний або негативний гетеропікноз). Радіоавтографічні дослідження з використанням ³H-тимідину показали, що гетерохроматинові ділянки хромосом, як правило, реплікуються (подвоюються) пізніше, ніж еухроматинові, які містять основну кількість структурних та регуляторних генів.

Характер розподілу еу- та гетерохроматинових ділянок уздовж хромосоми є дуже постійним на певній стадії мітозу, що слугує додатковим критерієм для ідентифікації хромосом на цитологічних

препаратах. Надійність ідентифікації конкретних хромосом значно зросла після розробки методів **диференційного забарвлення**, основаного на застосуванні барвників, які специфічно зв'язуються з певними хімічними компонентами хромосом (розділ 17.4).

Довжина різних хромосом може варіювати від 0,2 до 50 *мкм*, а діаметр — від 0,2 до 2 *мкм*. Довжина хромосом людини складає приблизно 4—6 *мкм*.

Каріотип певної особини або даного виду може бути представлений у вигляді схеми (**ідіограми**), на якій пари гомологів розташовуються рядами у порядку зменшення розмірів (розділ 17.4).

У багатьох рослин, а іноді і тварин, крім постійних компонентів каріотипу — так званих **А-хромосом** — в ядрах деяких особин даного виду виявляються додаткові або **В-хромосоми**. Часто вони повністю складаються із гетерохроматину, і кількість їх з віком особини може збільшуватись, іноді до декількох десятків. Спостереження на рослинах (кукурудза та ін.) свідчать, що накопичення В-хромосом у клітинах супроводжується зменшенням життєздатності організмів.

У тих випадках, коли хромосома знаходиться в найменш компактному (розслабленому) стані, в ній за допомогою світлового мікроскопу вдається побачити спіралізовану структуру — **хромонему**, яка являє собою нитку ДНК з фіксованими на ній білками. В залежності від досліджуваного об'єкту та стадії розвитку хромонема може складатися з двох (рис. 2.13, б), чотирьох і більшої кількості ниток. На стадії профазі, коли реплікація ДНК в основному завершена, кожна хромосома складається із двох **хроматид** (кожна із них містить дочірню молекулу ДНК).

З хромонемами пов'язаний ще один вид структур — так звані **хромомери**, які являють собою певну послідовність потовщень, між якими знаходяться більш тонкі ділянки — **хромомерні ниті**. Загальний вигляд цих структур нагадує нитку намиста, нерівномірно нанизаного уздовж хромосоми. Є докази того, що хромомери являють собою щільно спіралізовані ділянки хромонем.

2.3.2. Гігантські хромосоми

В деяких клітинах на певних стадіях їх життєвого циклу спостерігаються особливі, **гігантські хромосоми**, яким властиві величезні розміри; збільшені відповідно об'єми і ядер клітин, якщо вони містять такі хромосоми. До гігантських хромосом відносять так звані **політенні хромосоми**, які можна знайти в клітинах слинних залоз личинок двокрилих комах, в ядрах клітин кишечника, маль-

пігівих судин, а також у деяких рослин в ядрах синергід. У *D. melanogaster* політенні хромосоми за об'ємом у 1000 разів більші, ніж звичайні, і в 100—200 разів довші. Такі величезні розміри є наслідком **ендомітозу** — здійснюється 9—10 послідовних циклів редуплікації (подвоєння) хромонем без наступного їх розходження. Кількість ДНК у таких політенних хромосомах зростає приблизно в 1000 разів, а сотні хромонем-гомологів тісно кон'югують подібно тому, що відбувається у профазі мейозу. Це явище називають **соматичною кон'югацією** і вважається, що подібні хромосоми постійно знаходяться на стадії профазі мітозу.

Вздовж усієї політенної хромосоми розташовуються темні смуги різної ширини — **диски**, які чергуються із світлими ділянками — **міждисковими проміжками** (рис. 2.15). Диски інтенсивно забарвлюються і являють собою накладені один на одного хромонери окремих хромонем. Кількість дисків і міждискових проміжків у хромосомах різних пар (гетерологічних хромосомах) може бути різною, в той час як у гомологах однієї пари їх кількість і локалізація дуже постійні і співпадають. Тому для кожної пари хромосом можна збудувати карту топографічного розташування дисків і міждискових проміжків і виявити будь-які зміни або порушення їх лінійного розташування за структурних перебудов хромосом, що носять назву хромосомних мутацій.

До гігантських хромосом можна віднести також **хромосоми типу лампових щіток**, які спостерігаються в ооцитах на стадії першого поділу мейозу. Їх довжина навіть більша, ніж політенних хромосом. Найбільш крупні хромосоми типу лампових щіток виявляються в ооцитах деяких хвостатих амфібій, у яких загальна довжина цих хромосом втричі більша, ніж загальна довжина набору політенних хромосом.

Хромосоми типу лампових щіток мають множинні тонкі бокові вирости, які і надають цим хромосомам відповідного вигляду (рис. 2.16, а). Центральна вісь такої хромосоми складається із двох



Рис. 2.15. Відносні розміри гігантських хромосом ядер слинних залоз і метафазних хромосом у соматичних клітинах дрозофіли

сплетених гомологів, в яких лінійно розташовуються хромери. Ріст хромосом типу лампових щіток здійснюється за рахунок збільшення розміру хромерів. Бокові, звичайно парні, вирости мають



Рис. 2.16. Схема будови хромосом типу лампових щіток із ооцита *Triturus*.

a — мале збільшення; *b* — велике збільшення, видно бокові вирости у вигляді петель і спіралізація хромером; крапками зображено наростаючі ланцюги РНК.

форму петель (рис. 2.16, *b*). Через хромери і петлі проходить неперервна молекула ДНК. Бокові петлі, крім того, утримують наростаючі фрагменти РНК, що утворюються в процесі транскрипції.

2.3.3. Штучні хромосоми еукаріотів

Правильність існуючих уявлень про структурну організацію хромосом еукаріотів підтверджує факт синтезу найпростіших моделей функціонально активних хромосом методами генетичної інженерії. Такі штучні хромосоми вперше були отримані для дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Вони значно менші за розмірами, ніж нативні хромосоми, і можуть утримувати лише один ген, що контролює певну ознаку. Цей (як правило, доміантний) ген слугує маркером за введення штучної хромосоми в клітину шляхом трансформції.

Для того, щоб мініхромосома була стійкою, реплікувалась у клітині і поводи́ла себе в мейозі і в мітозі подібно справжнім хромосомам, у ній мусять бути принаймні три структурних компоненти:

1. **Реплікатор** або ARS-сегмент (від англ. *autonomously replicating sequence*) — ділянка, з якої розпочинається реплікація (подвоєння) ДНК. У хромосомах дріжджів *S. cerevisiae* є кілька сотень таких реплікаторів. Всі вони містять спільну для них послідовність із 11 пар нуклеотидів (п. н.), головним чином АТ-пар. Структура реплікаторів видоспецифічна.

2. **Центромера**, до якої приєднуються білки ниток веретена і без якої неможливе розходження хромосом до полюсів клітини за її поділу. З'ясовано, що центромера дріжджів *S. cerevisiae* являє собою сегмент ДНК довжиною біля 1000 п. н., в якому є ділянка, багата АТ-парами. Ця ділянка справа і зліва обмежена невеликими консервативними послідовностями, структура яких дуже важлива для функціонування центромери. Центромери видоспецифічні, в хромосомах інших грибків вони не функціонують.

3. **Теломера** — кінцевий фрагмент хромосоми, який містить особливу нуклеотидну послідовність, збагачену GC-парами. Є думка, що кінці ДНК хромосоми в області теломери ковалентно з'єднуються, утворюючи шпильку, так що вільних 3'- і 5'-кінців у хромосомній ДНК не виявляється.

Таким чином, лише за наявності реплікатора, центромери і теломери штучно створена мініхромосома, введена у клітину, виявляє ряд властивостей нативної хромосоми. Однак стабільністю такі штучні мініхромосоми значно поступаються природним, і чим менші розміри мініхромосом, тим швидше вони втрачаються трансформованою клітиною.

2.4. Молекулярна і надмолекулярна організація хромосом еукаріотів

Основними хімічними компонентами хроматину є ДНК і білки, що входять до складу хромосом майже в однакових вагових співвідношеннях. Інші компоненти — РНК, полі(АДР-рибоза), ліпіди, неорганічні іони — зустрічаються в незначних кількостях.

Згідно з сучасними уявленнями кожна еукаріотна хромосома, за виключенням політенних хромосом, утримує лише одну велетенську молекулу ДНК, оточену різними білками. В хромосомі ссавців середня довжина молекули ДНК складає біля 2 см. Сумарна протяжність всіх ДНК у клітині людини — біля 1,8 м. Отже, кожна людська хромосома середніх розмірів вміщує біля 4 см дволанцюгової ДНК. Разом з тим лінійні розміри хромосоми в 6—10 тис. разів поступаються розмірам ДНК. Це свідчить про дуже компактну укладку ДНК в хромосомі, яка досягається взаємодією ДНК з білками, що екранують негативні заряди фосфорильних груп полінуклеотидного ланцюга. До складу хромосом входять білки-гістони, а також велика група негістонних білків.

2.4.1. Гістони

Гістони являють собою поліпептиди, що складаються з 50—200 амінокислотних залишків. 25% усіх амінокислот у гістонах представляють лізин, аргінін і гістидин, що визначає лужні властивості цих білків.

Є п'ять основних класів гістонів — **H1, H2a, H2b, H3, H4**. Гістон H1 є лізин-багатим білком і дуже варіабельним за будовою і кількістю молекул у організмів різних видів. Інші чотири гістони присутні у складі більшості хроматинів в еквімолярних кількостях і досить консервативні в еволюційному плані. Середня частина молекул гістонів H2a, H2b, H3 і H4, що складається із 70—80 амінокислотних залишків, спіралізована і утворює глобулу діаметром біля 2,5 нм. По обидві сторони цієї глобули відходять неспіралізовані «хвости» молекул.

Фракція H2b відрізняється від інших співвідношенням лізин: аргінін, яке у гістону H2b значно більше, ніж у гістонів H2a, H3 і H4, але набагато менше, ніж у гістону H1. Відмінною особливістю фракції H3 є наявність у ній цистеїну, якого немає у складі інших гістонів, а гістони H3 і H4 відносяться до аргінін-багатих білків. Гістонам властивий нерівномірний розподіл залишків лізину і аргініну вздовж поліпептидного ланцюга. З ДНК тісно зв'язана головним чином та частина молекули гістону, яка несе найбільшу кількість позитивно заряджених радикалів. Решта молекули взаємодіє з ДНК за рахунок гідрофобних та водневих зв'язків.

В окремих тканинах багатоклітинних організмів знайдено додаткові фракції гістонів, які за своєю структурою і властивостями відрізняються від загальновідомих п'яти типів. Прикладом слугує недосить вивчений гістон H5, виявлений в еритроцитах птахів, амфібій і риб.

Слід зазначити, що дозрівання спермій у ряду тварин супроводжується заміною гістонів на **протаміни** — досить примітивні за амінокислотним складом білки з низькою молекулярною масою — $4 \cdot 10^3$ Да або трохи більше. Протаміни в порівнянні з гістонами істотно багатші на аргінін, зате деяких інших амінокислот в їх складі немає зовсім. Особливістю протаміну є високий вміст цистеїну, завдяки чому окремі молекули цього білка об'єднуються дисульфідними зв'язками в високополімерну нерозчинну сполуку, яка захищає ДНК спермія. Завдяки протамінам геном спермія повністю репресується і деблокується лише після запліднення. Слід пам'ятати, що заміна гістонів протамінами в процесі сперматогенезу спостерігається не у всіх тварин. У деяких із них відбуваються лише зміни у співвідношенні фракцій гістонів або окремі гістони терплять істотні хімічні

модифікації. Після запліднення протаміни батьківських хромосом замінюються гістонами, однак механізм цього явища не з'ясований.

Одна із дуже важливих особливостей гістонів — їх здібність до численних біохімічних модифікацій, без яких була б неможливою нормальна функція геномних генів. Серед цих так званих мікро-модифікацій — фосфорилування залишків серину, ацетилювання і метилювання залишків лізину, а також метилювання бокового ланцюжка аргініну. Ще одна мікромодифікація гістонів полягає в їх ADP-рибозилуванні. При цьому поодинокий ADP-рибозил або полі(ADP-рибоза), що утворюється із NAD, приєднується до аміногруп білка і впливає на взаємодію гістону і ДНК. Такі ж значення мають і деякі інші модифікації, наприклад, фосфорилування.

За цих перебудов послаблюються позитивні заряди гістонів, і ДНК хромосом декомпактизується, що сприяє її реплікації і транскрипції. Відомо, що в районах активно функціонуючого хроматину гістон H2а зустрічається у вигляді кон'югату з іншим білком — убіквітином (76 амінокислотних залишків). Ця своєрідна модифікація гістону H2а не спостерігається в гетерохроматині, де майже немає активно функціонуючих генів.

За виключенням метилювання всі інші модифікації гістонів є зворотними. Вони відбуваються в чітко визначені строки клітинного циклу, і це свідчить про певний зв'язок між зазначеними модифікаціями і функціями ДНК. Однак пряма участь гістонів у регуляції активності генів експериментально не доведена.

2.4.2 Негістонні білки хроматину

Як свідчить сама їх назва, негістони — це всі інші білки хроматину. В кількісному відношенні їх менше, ніж білків гістонів, але вони дуже різноманітні за будовою і функцією. Методом електрофоретичного розподілу в ядрах клітин HeLa знайдено 450 фракцій негістонних білків, більшість з яких міститься в ядрі в дуже незначній кількості — менше 10 000 молекул. Ці білки в протилежність гістонам виявляють значну міжвидову і міжтканинну специфічність, їм властиві як слаболужні, так і кислі властивості. До негістонів відносяться білки-ферменти, що необхідні для реплікації, транскрипції, репарації та інших генетичних процесів, серед них є білки-активатори та репресори генів (в більшості не ідентифіковані) та інші. Серед мажорних негістонів — група швидко рухливих в електрофоретичному полі HMG білків. Особливий інтерес являють білки HMG-14 і HMG-17, які, очевидно, є у всіх ссавців і ви являються головним чином у складі активного хроматину.

Вважають, що негістонні білки не тільки приймають участь у функціонуванні геному і в регулюванні його функцій, але разом з гістонами забезпечують необхідну структурну організацію хромосом, впливаючи на ступінь компактизації ДНК у хромосомі.

2.4.3. Надмолекулярна організація хромосом еукаріотів

В 1974 р. було з'ясовано, що хроматин складається із субодиноць, які мають однаковий тип організації у всіх еукаріотів. Ця субодиноця, так звана **нуклеосома**, являє собою глобулу із восьми молекул гістонів і намотаного на неї фрагмента ДНК довжиною близько 200 п. н.

Ядро нуклеосоми складають гістони H2a, H2b, H3, H4 — по дві молекули кожного, отже всього вісім молекул. Крім того, з кожною нуклеосомою зв'язана одна молекула H1. Ця молекула з'єднує сусідні нуклеосоми, які, крім того, зв'язані між собою молекулою ДНК, що намотана на ці нуклеосоми і робить приблизно 1,8 витка навкруги кожного білкового октамеру. Таким чином, між кожними двома нуклеосомами є певної протяжності (від 8 до 114 п. н.) фрагмент ДНК, який називають **лінкерною ДНК**.

Довжина тієї ДНК, що входить до складу нуклеосоми, може коливатись від 180 до 260 п. н. залежно від об'єкту дослідження, стадії індивідуального розвитку та інших причин. Однак після обробки нуклеосом нуклеазою мікрокока можна отримати мономери хроматину з меншою, але досить стабільною довжиною ДНК, що намотана на білковий октамер. Субодиноці хроматину, кожна з яких складається із восьми молекул гістонів і відносно нечутливого до нуклеази фрагмента ДНК (146 п. н.) назвали **мінімальними нуклеосомами** або **кор-частками**. Їх препарати використовують у різних структурних дослідженнях замість препаратів нуклеосом, у яких довжина фрагмента ДНК буває різною. В дослідях по реконструкції міні-нуклеосом із вільної ДНК і гістонів переконливо показана участь негістонових білків у структуризації хроматину. Одним із таких негістонових білків ядра є **нуклеогістон** (м. м. 29 000 Да), який взаємодіє з гістонами в процесі утворення нуклеосом і тим запобігає неупорядкованому хаотичному утворенню останніх. Крім того, негістонові білки приєднуються до ДНК в деяких інших стратегічних ділянках, захищаючи їх від нуклеазного розщеплення і виявляючи функцію регуляторів або каталізаторів хромосомних функцій.

Електронномікроскопічні та інші підходи до вивчення структури хроматину привели до досить чітких уявлень щодо шляхів ком-

пактизації ДНК, тобто її укладки в невеликих за розмірами хромосомах.

Розрізняють декілька рівнів такої укладки. **Перший рівень** — це утворення нуклеосом (нуклеосомний рівень). Довжина ДНК при цьому скорочується в 6,5—7 разів, а ДНК, намотана на гістонові октамери, утворює нуклеосомну нитку діаметром $D = 11 \text{ нм}$ (рис. 2.17).



Рис. 2.17. Схема компактизації хроматину у еукаріотів

Другий рівень компактизації ДНК — супернуклеосомний — полягає в утворенні хроматинової фібрили $D = 30 \text{ нм}$. Є підстави вважати, що в залежності від умов структура хроматину на цьому

рівні може змінюватися за рахунок деякої свободи у взаєморозміщенні нуклеосом уздовж нуклеосомної фібрили. Вважається, що укладка нуклеосом у складі хроматинової фібрили багато в чому залежить від гістону H1. Молекула цього білка має центральну



Рис. 2.18. Схема взаємодії молекул гістону H1 з нуклеосомами

($D = 11$ нм) спіралізується. На один виток цієї спіралі приходить 6 нуклеосом. У цьому випадку діаметр фібрили другого порядку буде складати біля 20 нм, однак у залежності від концентрації двовалентних катіонів, NaCl та інших умов кількість нуклеосом на один виток може змінюватися, що пояснює варіабельність діаметра фібрили (20—30 нм) у спостереженнях різних авторів.

глобулярну частину і продовгуваті N- і С-кінці (рис. 2.18). Центральна глобулярна структура молекули гістону H1 приєднується до специфічної ділянки на поверхні нуклеосоми, а продовгуваті кінці примикають з одного боку до лінкерної ДНК, а з другого — до гістонового ядра наступної нуклеосоми. Таким чином, гістон H1 наче притягує сусідні нуклеосоми одна до одної (рис. 2.18). Загальне розташування нуклеосом у гетерохроматинових і еухроматинових районах хромосом не однакове. Для гетерохроматину характерні компактні хроматинові фібрили, в той час як активному хроматинові властиве більш рихле розташування нуклеосом («намісто на нитці»). В останньому випадку гістон H1 виявляє менш міцний зв'язок з хроматином, гістони нуклеосом ацетильовані і зв'язані частково білками HMG-14 і HMG-17, а гістон H2a, крім того, частково зв'язаний з убіквітином. Нерівномірне розташування нуклеосом уздовж нуклеосомної нитки, залежне від нуклеотидної послідовності ДНК, називають **фазуванням** нуклеосом.

Запропоновано декілька моделей упаковки нуклеосом у складі хроматинової фібрили. Одна із них полягає в тому, що нуклеосомна нитка

Інші електронномікроскопічні, а також біохімічні дані приводять до висновку, що нуклеосомна нитка (11 нм) на другому рівні компактизації утворює структури, які не мають ознак спіральності. Пропонуються моделі з двотяжним і радіальним розташуванням нуклеосом (рис. 2.19). За рахунок другого рівня компактизації довжина молекули ДНК скорочується у 40 разів.

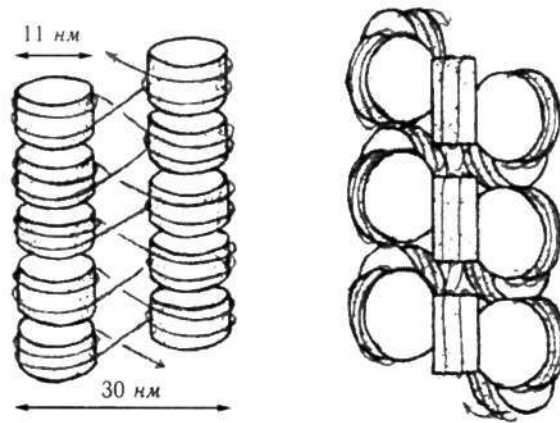


Рис. 2.19 Дві моделі можливої укладки нуклеосомної нитки в хроматиновій фібрилі

Щодо **третього рівня** укладки, то сучасні моделі будуються на уявленні про утворення хроматиною фібрилою (20 нм) петельних структур з їх подальшою спіралізацією (рис. 2.20). Поодинокі

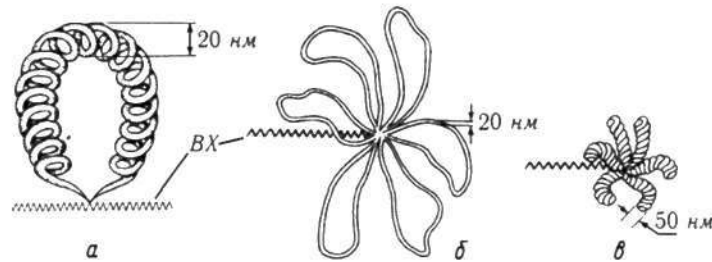


Рис. 2.20 Схематичне зображення третього рівня укладки дезоксирибонуклеопротеїдного тяжа у хромосомі

a — одна петля нуклеосомної нитки, що сформувала соленоїд. *б* — група нескладених петель; *в* — надспіралізація кожної петлі (нуклеомерів) з утворенням хромомера *ВХ* — вісь хромосоми

суперспіралізована петля, що утворена хроматиною фібрилою, називається нуклеомером; розетка із нуклеомерів утворює хромомер — характерну структуру метафазної хромосоми. Кожна хромосома являє собою певну послідовність зазначених хромомерів, які виявляються цитологічно завдяки більш інтенсивному забарвленню.

Є переконливі докази того, що всі хромосоми мають петельну організацію, тобто являють собою серію петельних доменів. У хромомерах ці петельні домени надспіралізовані і компактно укладені в кластери; в місцях активного хроматину петлі вивільнюються і розкручуються. Спостереження на політенних хромосомах і хромосомах типу «лампової щітки» свідчать про те, що кожен петельний домен є самостійною функціональною одиницею і утримує послідовності ДНК, які кодують одну або декілька РНК.

За рахунок надспіралізованих петельних доменів (третього рівня компактизації) протяжність ДНК зменшується ще в 10^3 разів, що характерно для інтерфазної хромосоми.

В процесі поділу клітин здійснюється подальша конденсація хромосом за рахунок нового рівня спіралізації (рис. 2.13, б), а загальне скорочення довжини ДНК досягає 10^4 — 10^5 разів. На цьому рівні організації хроматину, за Г. П. Георгієвим, найбільш вірогідною є спіральна укладка ниток з утворенням соленоїда другого порядку. Діаметр зазначеного соленоїда складає близько 2 мкм, тобто дорівнює діаметру метафазної хромосоми.

ОРГАНІЗАЦІЯ І ФУНКЦІЯ ГЕНОМІВ

3.1. Деякі загальні риси організації та функції геномів

Довжина молекули нуклеїнової кислоти найбільш дрібних вірусів — від 0,4 до 1,0 мкм, інших вірусів, а також пластид і мітохондрій — 5—100 мкм, бактерій — 1000—2000 мкм. Молекулярна маса цих молекул коливається від 1000 до 2—4 млн кДа. У еукаріотів довжина молекул ДНК в ядрі клітин може вимірюватися сантиметрами, а молекулярна маса складає приблизно 10^9 — 10^{11} Да. Розмір геному можна вимірювати не тільки одиницями довжини або молекулярної маси (1 мкм дволанцюгової ДНК складає $2 \cdot 10^9$ Да), але й кількістю нуклеотидів або пар нуклеотидів (п. н.), якщо мова йде про дволанцюгову молекулу. Фрагмент дволанцюгової ДНК, що містить 1000 п. н., позначають як один **кілобаз** (кб).

Для гаплоїдних клітин і організмів поняття геному і генотипу співпадають. Нерідко весь геном являє собою лише одну молекулу нуклеїнової кислоти — ДНК або РНК. Таким є більшість вірусів та бактерій, хоч є і такі віруси, у яких геном складається з декількох молекул РНК, а серед бактерій є форми, що утримують більш ніж один геном.

Нуклеїнова кислота, що складає геном (одна чи більше молекул) певною послідовністю нуклеотидів кодує сукупність білків, необхідних для життєдіяльності.

Крім генів рибонуклеїнових кислот, молекула ДНК може містити так звані **незначущі** послідовності, які не утримують генів. До складу цих послідовностей відносяться різні за будовою регуляторні ділянки ДНК, а також досить монотонні послідовності нуклеотидів, функція яких не завжди з'ясована.

Гени в молекулі геномної нуклеїнової кислоти розташовані лінійно, хоч є і такі, що повністю чи частково перекриваються.

Наявність в ДНК незначущих послідовностей та повторів обумовлює так звану **надлишковість** геномів. Суть останньої полягає в тому, що довжина молекул геномних ДНК значно більша, ніж це потрібно для кодування необхідної кількості білків. Деяка надлишковість бактеріальних геномів пояснюється значною протяжністю

спейсерів — незначущих послідовностей, що розділяють окремі гени, а також **регульовальних ділянок** в ДНК, що приєднують до себе окремі регуляторні білки-активатори, репресори та інші. Ці регульовальні ділянки (або так звані **акцепторні гени**) розкидані по геному і займають значну частину молекули ДНК, особливо у еукаріотів. Кожна з таких ділянок, залежно від конкретної функції і об'єкту дослідження, має свої структурні особливості, але є і багато спільного в будові різних акцепторних генів. Структура та функція цих генетичних елементів краще вивчена у вірусів та бактерій.

У прокаріотів існують досить досконалі механізми регуляції функцій геному, що діють завдяки спеціалізованим регульовальним послідовностям ДНК — **промоторам, операторам, термінаторам** та іншим (розділ 6.1). Взаємодія цих послідовностей з певними хімічними сполуками (регуляторами) лежить в основі численних механізмів як **позитивної**, так і **негативної** регуляції функцій генів. Позитивна регуляція призводить до стимуляції генної активності, а **негативна** — до її пригнічення або повного виключення.

Такі ж і ще більш складні і досконалі системи регуляції функцій геномів знайдено у еукаріотів. За незначною кількістю винятків кожний еукаріотний ген має власну систему регуляції, що значно збільшує кількість регульовальних ділянок у геномі. Значно збільшується у еукаріотів і кількість молекул, що виконують регуляторні функції на рівні геному.

Геном бактеріальної клітини складається із молекули кільцевої дволанцюгової хромосомної ДНК та численних позахромосомних кільцевих ДНК — **плазмід**.

У складі геномів вірусів виявляється одна або декілька молекул генетичної нуклеїнової кислоти (гНК), кожна така молекула оточена білковою оболонкою — **капсидом**. Якщо вірусний геном містить декілька окремих молекул (фрагментів) гНК, то його називають **фрагментованим**.

Важливою особливістю еукаріотних геномів є наявність в їх складі **повторів і мультиплікацій** (множинних повторів) окремих послідовностей, **сімейств функціонально споріднених генів**, їх структурно змінених і нефункціонуючих копій (**псевдогенів**), а також численних коротких і довгих **незначущих послідовностей** як між генами, так і в середині генів. Все це обумовлює виразну надлишковість геномів еукаріотних клітин.

Слід зазначити, що звичні уявлення про стабільність генетичної інформації в живій природі були порушені в 70-х роках відкриттям **мігруючих (транспозибельних) генетичних елементів (МГЕ)** у бактерій. Вони були виявлені як причина виникнення певного типу

мутацій. Сьогодні відомо дуже багато різновидностей МГЕ, здатних переміщуватись у геномах бактерій і еукаріотів (розділ 11.6)

Структурна організація всіх компонентів геному, їх кількісне співвідношення, взаємне розташування, функціонування і взаємодія у різних представників живої природи дуже відрізняються. Тому більш детально структурну організацію геномів вірусів, бактерій і еукаріотів краще розглянути окремо

3.2. Геноми вірусів

Геноми нуклеїнові кислоти вірусів представлені молекулами ДНК або РНК. ДНК можуть бути як лінійними, так і кільцевими. РНК вірусів, як правило, лінійні (рис. 3.1). Геноми РНК вірусів у середньому коротші за геноми ДНК. Вони можуть бути несегментованими (неперервними), тобто складатися з однієї молекули

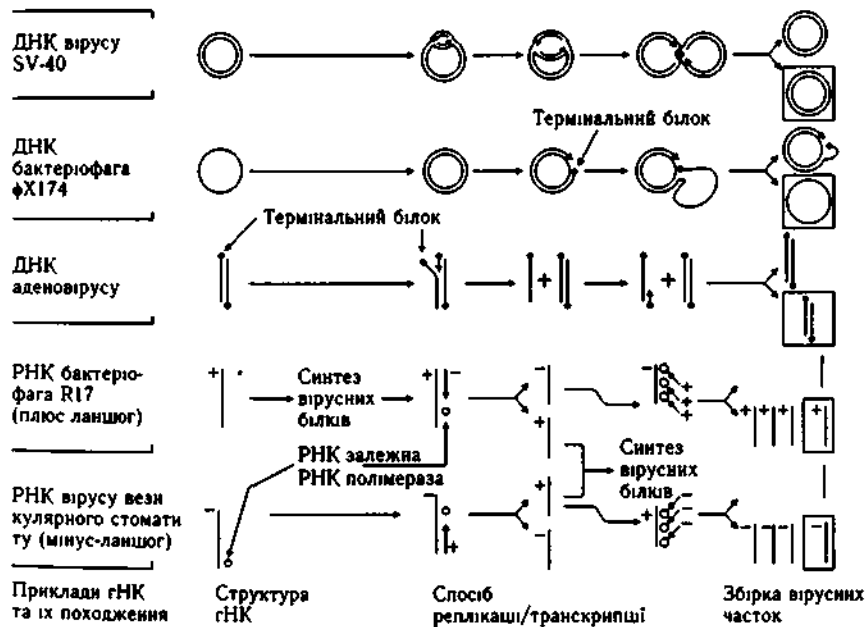


Рис. 3.1. Різновидності ДНК- та РНК геномів вірусів: основні типи їх реплікації/транскрипції за розмноження вірусних часток

РНК, або сегментованими (переривчастими), коли генетична інформація розподілена між декількома молекулами.

Вірусні РНК-геноми поділяються на такі три групи:

1. Одноланцюгові геноми **позитивної полярності** або **(+)РНК-геноми** з нуклеотидною послідовністю, яка відповідає будові іРНК, і може безпосередньо транслюватися (РНК фага Q β , вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ), коронавірусів, поліомієліту тощо);

2. Одноланцюгові **(-)РНК-геноми**, послідовність нуклеотидів в яких комплементарна кодогенному (+) ланцюгу РНК (геноми вірусів грипу, сказу, везикулярного стоматиту та ін.);

3. Двониткові геноми (реовірусів, цитоплазматичного поліедрозу комах тощо).

Відомі дволанцюгові РНК-геноми завжди сегментовані; в двох інших групах вірусів є представники як з сегментованими, так і з несегментованими геномами. Розмаїття вірусних РНК-геномів доповнюється наявністю віроїдів, які не є вірусами в повному розумінні. **Віроїди** — це низькомолекулярні (250—370 нуклеотидів) одностричкові кільцеві (+) РНК, які проявляють властивості інфекційних патогенів рослин.

Вірусні одноланцюгові (+) РНК-геноми звичайно кодують декілька білків і часто вся генетична інформація міститься в єдиній молекулі РНК. В повній мірі це справедливо для (+) РНК-геномів фагів, у яких кожен ген може зчитуватись окремо. У РНК-вірусів еукаріотів вся молекула (+) РНК часто являє собою один спільний для багатьох генів транскриптон, але транслюються не тільки окремі повномірні (+) ланцюги, але також і більш короткі субгеномні (+) РНК, кожна з яких утворюється в процесі зчитування певного фрагмента попередньо синтезованого ланцюга (-) РНК і потім транслюється самостійно. У альфа-вірусів утворюється лише один вид субгеномних іРНК, у інших (в тому числі у ВТМ) — декілька.

В клітинах, заражених коронавірусами, на геномному (+) РНК-ланцюгу синтезується повномірний (-) РНК, на якій можуть утворюватись як повноцінні геномні (+) РНК, так і шість класів субгеномних (+) РНК (див. рис. 6.14).

В усіх цих випадках у реплікації РНК приймають участь **РНК-залежні РНК-полімерази** (реплікази), що кодуються РНК-хромософою вірусу. У так званих вірусів з негативним геномом інфікуючий ланцюг РНК не кодує ніяких білків. Тому у складі таких інфікуючих вірусних часток мусить бути заздалегідь синтезована репліказа (приклади — вірус грипу, везикулярного стоматиту та ін.).

Інфікуючі частки деяких вірусів (**ретровіруси**) утримують одноланцюгову (+) РНК, яка й проникає в клітину хазяїна (рис. 3.2). В клітині за рахунок зворотної транскрипції (фермент — РНК-

залежна ДНК-полімераза або ревертаза) синтезується ДНК-копія геному вірусу, яка може вбудовуватись у хромосому хазяїна. Такі інтегровані вірусні геноми називають **провірусами**.



Рис. 3.2. Життєвий цикл ретровірусу

Представником сімейства ретровірусів є вірус СНІДу (синдрому набутого імунodefіциту). Його геном складається із двох ідентичних одноланцюгових РНК позитивної полярності (+ РНК), що несуть кеп (розділ 2.2) на 5'-кінці і полі(А) — на 3'-кінці. Ці два ланцюги нековалентно зв'язані один з одним поблизу 5'-кінців. Віріон, крім свого геному, містить фермент ревертазу і суміш молекул тРНК попереднього хазяїна, одна з яких слугує затравкою в полімеразній реакції. Єдина відома функція геномної РНК — це матрична функція в процесі синтезу ДНК-копії вірусного геному шляхом зворотної транскрипції. При цьому спершу утворюється одноланцюгова, а потім дволанцюгова кільцева ДНК, яка вбудовується в геном хазяїна. Наступна експресія генів вірусу не обов'язкова, але якщо вона відбувається (розвивається СНІД), то вірусні ДНК транскрибуються РНК-полімеразою клітини-хазяїна.

Геноми ДНК-утримуючих вірусів, які вперше вдалося вивчити, були простими лінійними двоспиральними ДНК. Пізніше з'ясувалося, що геноми вірусів можуть бути представлені також дволанцюговими ДНК, замкнутими в кільце (віруси SV40 і поліоми), кільцевими молекулами одноланцюгової ДНК (бактеріофаги M13 і φX174),

або лінійними молекулами одноланцюгової ДНК (парвовіруси). Щодо лінійних дволанцюгових ДНК-геномів, то вони дуже розповсюджені. Їхні розміри коливаються в широких межах — найчастіше від 30 до 150 кб. Із крупних таких геномів з повністю розшифрованою первинною структурою можна назвати вірус Епштейна—Бар (172 кб). У деяких бактеріофагів і у аденовірусів до 5'-кінців ланцюгів ДНК ковалентно приєднані білки, а у дуже великого вірусу віспи і деяких іридовірусів два комплементарних ланцюги ДНК з обох кінців спаяні один з одним ковалентним фосфодіефірним зв'язком.

Для реплікації лінійних молекул ДНК вірусів особливе значення має структура їх кінцевих ділянок. Вони можуть бути представлені прямими кінцевими повторами довжиною від сотні і більше (наприклад, ДНК фага T7) до тисяч (T-парні фаги) пар нуклеотидів. У фага T7 всі геномні молекули ДНК ідентичні, а у T-парних фагів (і деяких інших вірусів) вони істотно відмінні — для них властиві так звані кільцеві перебудови в процесі реплікації і укладки ДНК у капсид, внаслідок яких початок і кінець кожної геномної ДНК може бути унікальним, незважаючи на ідентичність інформації в цих ДНК. У інших дволанцюгових вірусних ДНК утворюються одноланцюгові «липкі» (тобто комплементарні) кінці, довжина яких може бути різною — від 10—20 нуклеотидів (фаги λ , P2, P4) до одного (герпес-віруси).

Лінійні ДНК деяких інших вірусів можуть мати інвертовані кінцеві повтори довжиною від декількох (фаг ϕ 29) до 100—150 нуклеотидів (аденовіруси) і більше.

Відмінності між вірусними геномами полягають не тільки у значених особливостях. Відомо, що до складу ДНК-вірусів входять незвичайні (модифіковані) основи. Так, наприклад, ДНК T-парних фагів замість цитозину містить 5-оксиметилцитозин (ОМЦ), причому часто у вигляді глюкозил-ОМЦ і гентобіозил-ОМЦ.

Молекули кільцевих ДНК вірусів суперспіралізовані, а якщо їх у клітині багато, то можуть утворюватись **катенани** (зчеплені кільця).

Спільною рисою геномних нуклеїнових кислот вірусів є висока мінливість структури їхніх молекул, чим пояснюється поява нових і нових антигенних типів вірусних часток.

ДНК-геноми багатьох вірусів можуть повністю включатися у хромосому клітини-хазяїна. Бактеріофаги, здатні вбудовуватися у хромосому бактерії і залишатися там у неактивному стані, отримали назву **лізогенізуючих** бактеріофагів, а саме явище відоме під назвою **лізогенії**. Прикладом лізогенізуючих бактеріофагів можуть бути фаги λ , Mu та інші.

Коли фаг λ розмножується у клітині і призводить її до лізису, то це так звана **літична** інфекція. Значно рідше лінійні молекули

фагової ДНК замикаються в кільце і включаються в кільцеву хромосому *E. coli*. Після такої інтеграції виникає **лізогенна** бактерія, що несе хромосому бактеріофага у вигляді **провірусу**. Ця фагова ДНК реплікується разом з хромосоною кишкової палички, але за певних умов (ультрафіолетове, іонізуюче опромінення, інші умови) може вивільнитися і обумовлювати літичний шлях розвитку фага.

Всі ці особливості розвитку вірусних часток обумовлені генетичною інформацією їх геномів, і чим складніший вірус, тим більшу кількість білків кодує його геном. Які ж саме білки кодуються вірусними геномами? У різних вірусів це різні білки. Віруси можна розглядати як ДНК або РНК, одягнуті в захисну білкову оболонку і здатні переходити із однієї клітини в іншу. Білкова оболонка (**капсид**) побудована із одного або декількох типів білків. Розмір геному у вірусів корелює з розміром оболонки, збудованої із білка або білків, що кодуються вірусними генами. Збірка капсиду безпосередньо навкруги геному проходить у нитковидних вірусів і фагів, що містять одноланцюгову РНК. Прикладом слугує вірус тютюнової мозаїки (ВТМ). Як видно з рис. 3.3, у цього вірусу в середині білкової оболонки, що складається із одного типу поліпептидів, міститься єдина молекула РНК, закручена у спіраль.

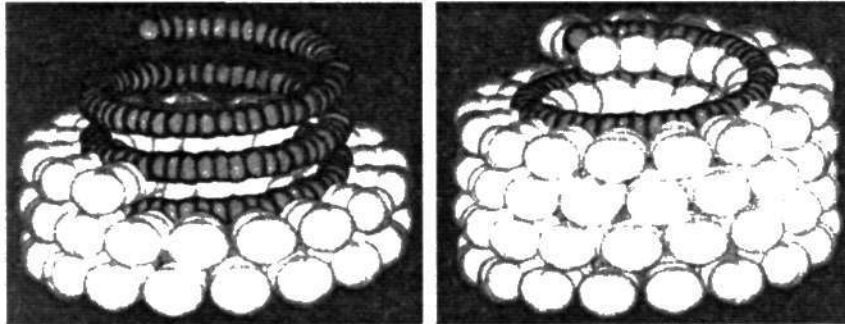
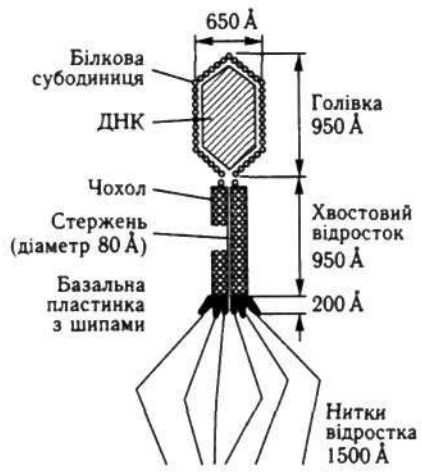


Рис. 3.3. Об'ємні моделі двох стадій самозбірки вірусу тютюнової мозаїки.

Темна спіраль — молекула РНК, зовні білі шарики — білки оболонки

У більш складних ДНК-вірусів (λ , T4 та інших) спершу збирається головка оболонки шляхом взаємодії різних білків. Потім дволанцюговий геном упроваджується в голівку і нарешті заповнена голівка з'єднується з хвостовим відростком (рис. 3.4).

Існують віруси, геном яких складається із декількох молекул нуклеїнової кислоти. Реовіруси, наприклад, містять десять дволанцюгових фрагментів РНК, кожен з яких упаковується в окремий



3.4.

Т-парних
(2; 4;)

білки, білки-ферменти білки-регу-

РНҚ-поліме-

(Q ,)

(T4, 7),

()

1500 нуклеотидів,

64

1000—
(супут-

ника вірусу некрозу тютюну) може утримувати лише один ген, бо вона складається з 1200 нуклеотидів.

Інший РНК-вірус (фаг MS2) містить 3569 нуклеотидів і три гени, розташовані тандемно (рис. 3.5) — ген білка А, необхідного для збірки білків оболонки, ген, що кодує білок-мономер оболонки, і



Рис. 3.5. Гени фага MS2:

Розміри і відносьне розташування генів визначено на основі даних нуклеотидного аналізу

ген реплікази. Ці гени відділяються один від одного невеликими незначущими послідовностями нуклеотидів — спейсерами (26 і 36 нуклеотидів). Молекула РНК розпочинається і закінчується нуклеотидами, які не транслюються. Таким чином, геному вірусу MS2 властива незначна надлишковість геному за рахунок невеликих незначущих послідовностей, однак ці останні, можливо, також несуть певну генетичну інформацію. Вважають, що саме вони є сигналами для приєднання рибосом.

ДНК фагів λ і T4 в той момент, коли вона може заповнювати голівку оболонки, знаходиться у вигляді **конкатемерних** молекул, тобто являє собою послідовність множинних геномів, з'єднаних кінець у кінець (рис. 3.6). У цьому конкатемері кінець кожного окремого геному фага λ маркований послідовностями, що отримали назву со-сайтів. У голівку фага проникає лише один геном, який міститься між двома найближчими со-сайтами. У фага T4 упаковка ДНК розпочинається з будь-

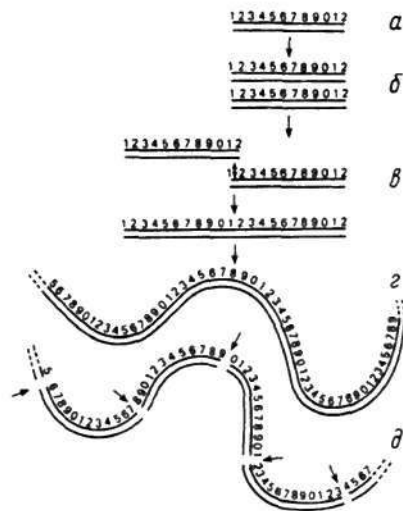


Рис. 3.6. Конкатемери — проміжні продукти синтезу ДНК фага T4:

a — інфікуючий геном. *b* — реплікація, *в* — рекомбінація; *г* — подальша реплікація і рекомбінація з утворенням конкатемерів; *д* — упакування ДНК, яке супроводжується нарізанням геномів (показано стрілками) з кінцевою надлишковістю і кільцевими перестановками генів. Гени фага позначено цифрами

якого місця молекули-конкатемера і продовжується до тих пір, поки голівка не заповниться такою кількістю ДНК, яка дорівнює цілому геномові. Насправді кількість ДНК, що вміщується в голівці, дещо більша одного геномного розміру. Внаслідок цього виникає кінцева надлишковість у послідовності нуклеотидів і на обох кінцях геномної ДНК знаходяться одні і ті ж гени (див. рис. 3.6).

Дволанцюгова ДНК вірусів дуже компактно скручується в капсиді. Цій компактизації сприяють так звані «внутрішні» білки, які також є специфічними білками вірусів і кодуються їх власними геномами.

У дрібних вірусів транскрипція їх нечисленних генів здійснюється одночасно, в той час як у складноорганізованих вірусів гени, як правило, згруповані в блоки (**оперони**), що функціонують на різних стадіях дозрівання вірусних часток. Після проникнення фага в клітину спершу функціонують гени, що кодують так звані **ранні** (у інших вірусів — надранні) білки-ферменти, необхідні для реплікації вірусної ДНК, для пригнічення синтезу ДНК клітини-хазяїна і т. ін. Пізніше транскрибуються інші гени, відповідальні за синтез білків капсиду, збірку віріонів і їх вивільнення із зараженої клітини.

Прикладом може бути геном фага Т5, який містить біля 100 генів, що відносяться до трьох часових класів — **надранніх**, **ранніх** і **пізніх**. Безпосередньо після зараження клітини 8% фагової ДНК, що містить надранні гени, зразу ж транскрибується. Транскрипція решти 92% ДНК залежить від наявності білка одного з надранніх генів. Функція ранніх генів розпочинається через 5 хв після інфікування, а пізніх — через наступних 5 хв і продовжується аж до моменту лізису клітини-хазяїна. Встановлено, що ДНК фага Т5 містить біля 40 промоторів — ділянок ДНК, з яких розпочинається транскрипція. З допомогою електронної мікроскопії з'ясовано, що 6 промоторів відносяться до надранніх, 29 — до ранніх і 5 — до пізніх.

В групі надранніх фагових генів є такі, продукти яких необхідні для запуску транскрипції з ранніх генів. В свою чергу продукти деяких ранніх генів блокують функцію надранніх, зате включають пізні гени вірусу. Така часова регуляція функцій різних ділянок геному отримала назву **каскадної регуляції**.

Крім надранніх, ранніх і пізніх, гени складноорганізованих вірусів поділяють на **істотні** (позначаються великими буквами) і **неістотні** (позначаються малими буквами або буквами грецького алфавіту).

Істотні гени — це життєво необхідні гени. Геноми найпростіших вірусів повністю складаються саме з них. Щодо більш складних вірусів (Т-парні, Т-непарні фаги, фаг λ та інші), то істотні гени в їх

геномі складають меншість. Переважна більшість генів — це неістотні гени, що обумовлюють менш важливі функції вірусного геному (здатність до лізогенії, до утворення прозорих негативних колоній тощо).

З використанням мутантів та сучасних методичних підходів вдалося з'ясувати особливості організації геномів багатьох вірусів і побудувати їх генетичні карти. Для ряду вірусів методами молекулярної генетики повністю розшифрована нуклеотидна послідовність їх геномної РНК або ДНК. З'ясувалося, що характерною рисою вірусних геномів є їх висока **економічність**, суть якої полягає в тому, що майже вся РНК або ДНК вірусу зайнята структурними генами. Ступінь економічності вірусних геномів ще більш зростає за рахунок поширеного явища — **перекривання рамок зчитування**. В цьому випадку один і той же фрагмент нуклеїнової кислоти може нести інформацію про первинну структуру двох або й більшої кількості поліпептидів. Факт перекривання рамок зчитування був виявлений у вірусів методом генетичного аналізу (побудовою груп комплементатії), а потім був підтверджений розшифровкою первинної структури вірусних РНК і ДНК. (Про групи комплементатії див. розділ 13.2.3).

Після з'ясування повної нуклеотидної послідовності РНК близьких за будовою бактеріофагів MS2, R17, f2, Q β стало відомо, що їх хромосома повністю зайнята трьома генами — білка оболонки, білка дозрівання і реплікази.

Крім цих трьох груп комплементатії, у фага MS2 існує ще одна група некомплементарних мутантів, що нездатні призводити до літичного розпаду клітини. Отже, геном фага MS2 складається із чотирьох генів, для одного з яких не вистачає нуклеотидної послідовності РНК. Виявилось, що цей ген перекривається іншими генами: він займає фрагмент РНК, який відповідає частково гену білка оболонки (47 нуклеотидів), генному інтервалу (36 н.) і частково гену РНК-реплікази (142 н.).

Явище **перекривання генів** властиве також ДНК-вірусам: ϕ X174, G4, SV40 та іншим. Однориткова ДНК фага ϕ X174 кодує 9 різних білків з загальною м. м. 250 кілодальтонів (*кДа*). Однак кількість триплетів в цій ДНК достатня для кодування білків з м. м. лише 200 *кДа*. З'ясувалося, що геном фага допускає як часткове, так і повне перекривання деяких генів (рис. 3.7).

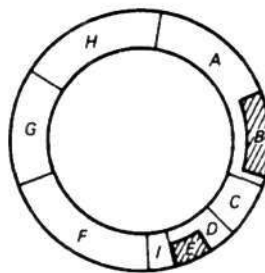


Рис. 3.7. Схема структури геному фага ϕ X174. Перекривання генів

Як видно з рисунка, ген *E* знаходиться в межах гена *D*, а ген *B* повністю перекривається з геном *A*. Ген *I* та ген *D* також перекриваються, але частково. Таким чином, геном фага φX174 дуже економічний — три гени кодують п'ять білків. Перекривання генів у вище зазначений спосіб — явище дуже поширене серед вірусів, але зустрічається також у геномах інших представників живої природи.

Перекривання генів зовсім не означає, що може перекриватися код. У кожному з генів, що перекриваються, триплети зраховуються, починаючи з іншої фіксованої у просторі точки (нуклеотиду), завдяки чому транскрипція здійснюється в різних рамках зчитування. Одночасне списування інформації з генів, що перекриваються, неможливе.

Дуже цікаві дані отримано щодо молекулярної організації і функції геному фага λ (рис. 3.8).

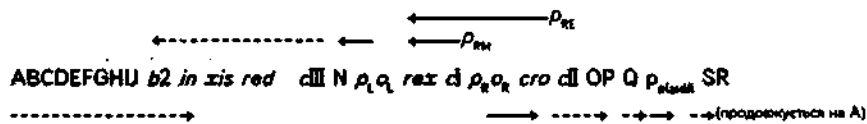


Рис. 3.8. Схема розташування генів і регуляторних ділянок у геномі фага λ:

Напрямок стрілок показує напрямки транскрипції. Неперервними стрілками показана обмежена транскрипція за термінації цього процесу; пунктирні стрілки — продовження транскрипції за антитермінації. Слід зауважити, що транскрипція здійснюється на кільцевій формі ДНК

Всю сукупність генів (біля 50) цього досить складного фага поділяють на три групи — надранні або негайно ранні, затримано ранні і пізні. Два надранніх гени — *N* і *cro* — розташовані в протилежних ланцюгах ДНК і зчитуються в протилежних напрямках з різних промоторів (останні позначаються як P_L і P_R — лівий і правий). З'ясувалося, що білок *N* (продукт гена *N*) є антитермінатором, тобто фактором, що забороняє закінчення транскрипції в кінці генів *N* і *cro* і тим самим обумовлює її продовження в область затримано ранніх генів (рис. 3.9). Здатність окремих фагових білків блокувати функцію деяких термінаторів відома як явище анти-термінації. Слід зазначити, що це явище дуже властиве фаговим геномам.

За рахунок антитермінуючої дії продукту надраннього гена *N* у фага λ функціонують затримано ранні гени, що обумовлюють здатність фага до лізогенії (завдяки синтезу особливого репресора), а також перехід від лізогенного до літичного циклу розвитку. В останньому випадку вирішальна роль належить деяким регуля-

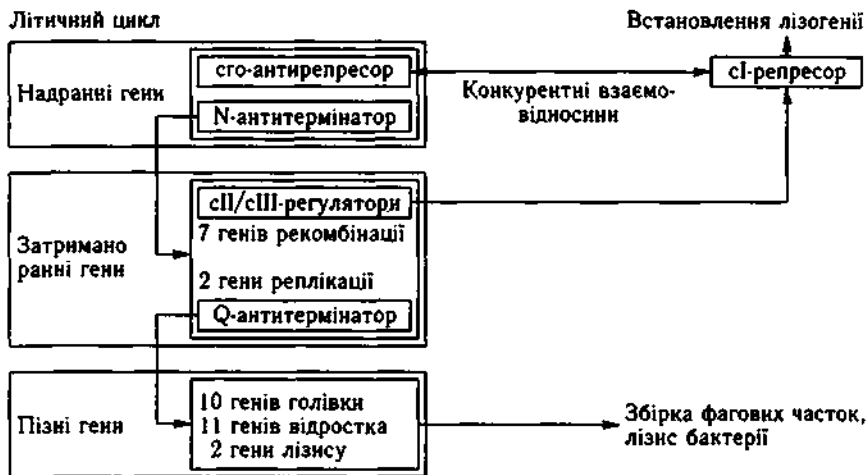


Рис. 3.9. Система літичного каскаду та лізогенії фага λ

торним генам фага, що є затримано ранніми. Дуже важливе значення має затримано ранній ген Q, що кодує Q-білок — антитермінатор, необхідний для переходу транскрипції в область пізніх генів. Останні кодують структурні компоненти капсиду, а також інші білки, що потрібні для синтезу фагової ДНК та утворення фагових часток.

Детальне порівняльне вивчення геномів вірусів дало можливість виявити такі особливості їх структури та функцій:

1. Геноми вірусів представлені молекулами як РНК, так і ДНК. РНК-геноми вірусів можуть бути несегментованими і сегментованими.

2. У деяких лінійних двониткових ДНК наявні «липкі», тобто одноланцюгові і комплементарні кінці. Завдяки цьому геном фага λ і деяких інших вірусів може існувати як у лінійній, так і в кільцевій формі.

3. Для окремих вірусів (фаг λ та інші) доведена наявність генетичної інформації в обох ланцюгах ДНК, так що в одній частині геному зчитується один ланцюг, а в іншій — йому протилежний. Наявність інформації в обох нитках ДНК показана не тільки для вірусів, але й для інших об'єктів.

4. Гени деяких фагів згруповані в оперони. Такі групи генів функціонують як одне ціле і мають спільну систему регуляції. В процесі розвитку вірусу не всі гени функціонують одночасно — є надранні, затримано ранні і пізні гени.

5. Існують специфічні для вірусів механізми регуляції функцій геному, про що свідчить явище антитермінації, відоме лише для фагів.

6. Вірусні геноми дуже економічні — майже вся протяжність хромосоми вірусу зайнята значущими послідовностями нуклеотидів. Крім того, у вірусів дуже поширене явище перекривання генів.

7. РНК-геноми окремих вірусів еукаріотів являють собою складно організовані гени-кластери, які кодують поліпротеїни — білки-передники інших, менших за розмірами, білкових молекул. Часто РНК таких вірусів, з одного боку, є носіями генетичної інформації, а з другого — виконують роль іРНК.

8. Окремим ДНК- та РНК-вірусам еукаріотів (SV40, поліоми, саркоми Рауса та ін.), як і самим еукаріотним клітинам, властива інтрон-екзонна (мозаїчна) структура генів. Гени з такою структурою складаються із значущих (**екзони**) і незначущих (**інтрони**) послідовностей.

3.3. Структура і функція геномів бактерій

Клітини бактерій, наприклад *E. coli*, можуть містити по декілька різних генетичних елементів, кожен з яких здатний самореплікуватися. Хромосома бактерії *E. coli* — це дволанцюгова кільцева молекула ДНК з молекулярною масою близько $2,5 \cdot 10^9$ Да, що відповідає $3,2 \cdot 10^6$ п. н. Ця хромосома має один сайт ініціації реплікації і являє собою один реплікон (розділ 4.1). На відміну від багатоклітинних організмів у бактерій немає чітко сформованого ядра. Його заміняють різні за формою і величиною структури — **нуклеоїди**, що в основному складаються з хромосомної ДНК, але містять також РНК і білки. Крім хромосоми, у більшості видів бактерій існують інші здатні до автономної реплікації структури — **плазмід**и.

Нуклеоїди із клітин *E. coli* були виділені безпосередньо у вигляді комплексу, що дуже швидко седиментується і на 80% своєї маси складається із ДНК. У бактерій з двома або більшою кількістю геномів (внаслідок реплікації ДНК) цей комплекс пропорційно збільшується у розмірі. За лізису клітин *E. coli* звільнюються фібрили у вигляді петель, зафіксованих на уламках клітинної оболонки. ДНК цих петель закручена в більш компактні структури завдяки спеціальним ДНК-зв'язуючим білкам. Вважають, що кожна така суперспіралізована петля ДНК являє собою самостійний домен; загальна кількість доменів — біля 100 на один бактеріальний геном.

В генетичному відношенні найкраще вивчена *E. coli* та деякі інші бактерії (*Salmonella typhimurium*, *Bac. subtilis*), для яких побудовані досить детальні генетичні карти. З кожним роком список ідентифікованих і локалізованих у хромосомах бактеріальних генів збільшується. Досить значні послідовності нуклеотидів у складі ДНК бактерій повністю розшифровані.

Вважають, що хромосома *E. coli* містить біля 2000 структурних генів, значна частина яких добре вивчена і точно локалізована. Слід зазначити, що довжина молекули ДНК у кишкової палички майже в 2 рази більша, ніж це потрібно для утворення її структурних генів. Таким чином, бактеріальному геному властива значно більша надлишковість, ніж вірусному. Це свідчить про те, що в порівнянні з вірусами у бактерій значно більша частина геному не несе генетичної інформації про первинну структуру білків, а виконує іншу (в першу чергу регулювальну) функцію.

3.3.1. *Гени та оперони*

Кожен структурний чи регуляторний ген має свою унікальну послідовність нуклеотидів і, як правило, не повторюється в геномі. Лише деякі гени бактерій, наприклад, гени рРНК і тРНК, мають у геномі копії і утворюють **кластери** (групи). Так, наприклад, в геномі кишкової палички є кластери генів 23S, 16S і 5S рРНК. Ці гени розташовані тандемно, входять до одного оперона і транскрибуються як одне ціле з утворенням 30S-РНК-попередника.

Характерною рисою бактеріального геному є те, що лише поодинокі гени функціонують як самостійні одиниці транскрипції. Більшість структурних генів згруповані в **оперони**, отже мають спільну систему регуляції і функціонують як одне ціле. Як правило, оперон об'єднує гени функціонально споріднених білків-ферментів, що каталізують послідовні реакції синтезу або розпаду певного продукту. Найкраще вивчені оперони, гени яких кодують ферменти синтезу амінокислот (**анаболітні оперони**) та використання цукрів як енергетичних субстратів (**катаболітні оперони**).

Група генів, що відносяться до одного оперона, транскрибується в одну іРНК, яка послідовно транслюється рибосомами з утворенням кожного із білків. Крім генів ферментів, які безпосередньо приймають участь у синтезі чи розпаді певної сполуки, до оперона можуть входити гени, що мають споріднену функцію — наприклад, кодують білки, відповідальні за транспорт необхідних субстратів у клітину або за включення генів іншого оперона.

Прикладом такого типу структурної організації геному слугує **лактозний оперон** (*lac*-оперон) кишкової палички. До нього входять три структурних гени (рис 3 10)

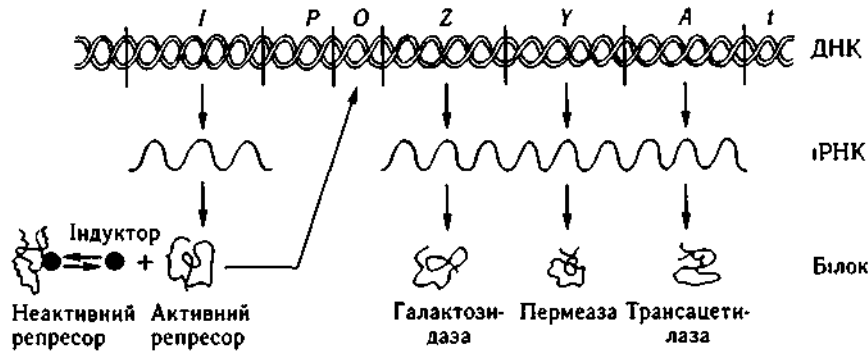


Рис 3 10 Модель регуляції активності генів *lac*-оперона *E coli* (по Жакобу та Моно)

Один із них, *lacZ*, кодує фермент β -галактозидазу, який гідролізує молочний цукор на глюкозу і галактозу. Другий ген, *lacY*, несе інформацію про β -галактозидпермеазу — білок, що зв'язується з мембраною і є компонентом системи транспорту. Третій, *lacA*, кодує β -галактозидтрансациетилазу — фермент, який переносить ацетильну групу від ацетил-СоА до β -галактозидів. Мутації в генах *lacZ* або *lacY* можуть приводити до Lac^- -фенотипу, за якого клітини не можуть використовувати лактозу. У мутантів $LacA^-$ не виявлено фенотипових дефектів, і функція відповідного гена не з'ясована.

Названі три гени утворюють групу (кластер) *lacZYA* і транскрибуються в одну молекулу іРНК з промотора (*P*), що прилягає до гена *lacZ*.

Транскрипція закінчується в області **термінатора** (*t*), який сприймається ферментом синтезу (РНК-полімеразою) як сигнал про закінчення транскрипції. В *lac*-опероні є ще одна регуляторна ділянка ДНК, що отримала назву **оператора** (*lacO*). Оператор розташований між промотором *lacP* і кластером структурних генів *lacZYA*, частково перекриваючись із промотором. Він має специфічну будову, розпізнається **білком-репресором**. Цей білок приєднується до оператора і цим блокує транскрипцію генів *lacZYA* з промотора *P*. Зауважимо, що репресор кодується окремим **регуляторним геном** *lacI*, який знаходиться безпосередньо перед промотором *lac* оперона. Цей ген має свої власні регулювальні ділянки — промотор і термінатор. Білок-репресор є тетрамером, побудованим

із ідентичних субодиниць m m 38 кДа кожна. Крім здібності приєднуватися до оператора і виключати оперон, цей тетрамерний білок має алостеричні центри для взаємодії з алолактозою — ізомером лактози. Приєднання алолактози до білка-репресора призводить до втрати ним здібності взаємодіяти з оператором і блокувати *lac*-оперон. Отже, за наявності лактози в живильному середовищі *lac*-оперон включається, а за відсутності цього субстрату — виключається. Лактоза таким чином грає роль низькомолекулярного індуктора, що провокує транскрипцію кластера генів *lacZYA*. Не тільки *lac*-оперон, але й інші оперони бактерій, що регулюються у такий спосіб, називаються індукцибельними, а їх регуляція з допомогою білків-репресорів є класичним прикладом негативної регуляції.

Є і репресибельні оперони, що теж регулюються білками-репресорами, але, на відміну від індукцибельних оперонів, репресори в цьому випадку синтезуються неактивними і не можуть одразу ж взаємодіяти з операторами. Вони перетворюються в активні лише в комплексі з низькомолекулярними ефекторами — корепресорами. У випадку триптофанового оперона роль корепресора виконує триптофан — амінокислота, що синтезується ферментами цього оперона. П'ять структурних генів триптофанового оперона (*trp*-операона) розташовані лінійно і кодують три ферменти, необхідні для перетворення хоризмової кислоти у триптофан (рис 3.11).

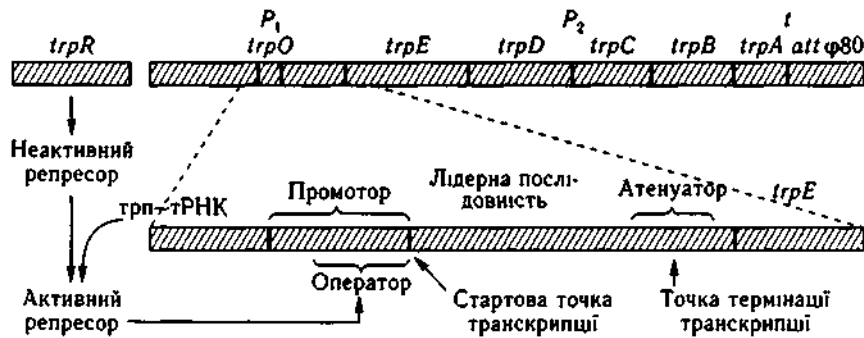


Рис 3.11. Організація триптофанового оперона у кишкової палички

P_1 ; P_2 — промотори t — термінатор $att\ \phi 80$ — сайт інтеграції відповідного фага $trpO$ — оператор $trpR$ — ген регулятор $trpE$ D C B A — структурні гени

Цим структурним генам (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, *trpA*) передують так звана лідерна послідовність ДНК (162 нуклеотиди), що транскрибується у складі спільної РНК. В межах цієї лідерної ДНК знаходиться особлива регульовальна ділянка — атенуатор, що своєю

будовою дуже нагадує р-незалежний термінатор. Атенуатор слугує бар'єром транскрипції за наявності триптофану. У відсутність цієї амінокислоти (точніше її активованої форми — $\text{trp}\sim\text{тРНК}$) РНК-полімераза здійснює транскрипцію в повному обсязі, не закінчуючи її достроково в атенуаторі. Атенуація може змінювати інтенсивність транскрипції у 8—10 разів, тобто не дуже істотно.

Значно ефективніше (в 70 разів) транскрипція пригнічується білком-репресором, що є продуктом **гена-регулятора *trpR***. Цей ген розташований віддалік від *trp*-оперона, але його продукт досягає операторної області оперона і міцно з нею з'єднується, що призводить до різкого зменшення транскрипції. Однак, в протилежність лактозному оперону, репресор, що кодується геном *trpR*, синтезується неактивним і перетворюється в активну форму лише після взаємодії з триптофаніл~тРНК, яка виступає в ролі алостеричного ефектора-корепресора. Оскільки наявність $\text{trp}\sim\text{тРНК}$ пригнічує функцію *trp*-оперона, то цей оперон називається **репресибельним** в протилежність **індуцибельному** *lac*-оперону, функція якого індукується лактозою.

Слід відмітити ще деякі відмінності в структурі і функціонуванні триптофанового і лактозного оперонів *E. coli*. Триптофановий оперон, крім основного промотора (P_1), має ще додатковий промотор (P_2), що розташований між структурними генами *trpD* і *trpC*. Завдяки цьому, в умовах репресії основний рівень транскрипції генів *trpCBA* у 5 разів перевищує рівень транскрипції генів *trpED*. Промотор P_2 не регулюється і має малу спорідненість до РНК-полімерази. Слід підкреслити, що наявність внутрішніх (додаткових) промоторів властива і іншим оперонам прокариотів. Те ж саме можна сказати про явище атенуації, яка, наприклад, є найважливішим механізмом негативної регуляції гістидинового оперона.

Гістидиновий оперон містить дев'ять структурних генів, відповідальних за ферменти синтезу гістидину. У відсутність цієї амінокислоти транскрипція генів оперона збільшується у 10 разів, але може і плавно змінюватися в залежності від кількості $\text{his}\sim\text{тРНК}$. Цей ефект пояснюється наявністю атенуатора в межах лідерної ДНК, що розташована між промотором і першим структурним геном.

Атенуація триптофанового і гістидинового оперонів дуже подібна. В обох випадках відсутність відповідних аміноцил-тРНК підсилює транскрипцію структурних генів. Це пов'язано з тим, що лідерна послідовність ДНК містить досить значну кількість кодонів тієї амінокислоти, синтез якої кодується генами даного оперона. У відсутність цієї амінокислоти (а, отже, і відповідної аміноцил-тРНК) рибосоми розпочинають біосинтез пептиду, що кодується лідерною ДНК, але зупиняються в лідерній області іРНК, на

кодонах відсутньої амінокислоти. Ця затримка рибосом впливає на просторову конфігурацію транскрипту, що синтезується РНК-полімеразою (рис. 3.12). За цих умов стає неможливим утворення на

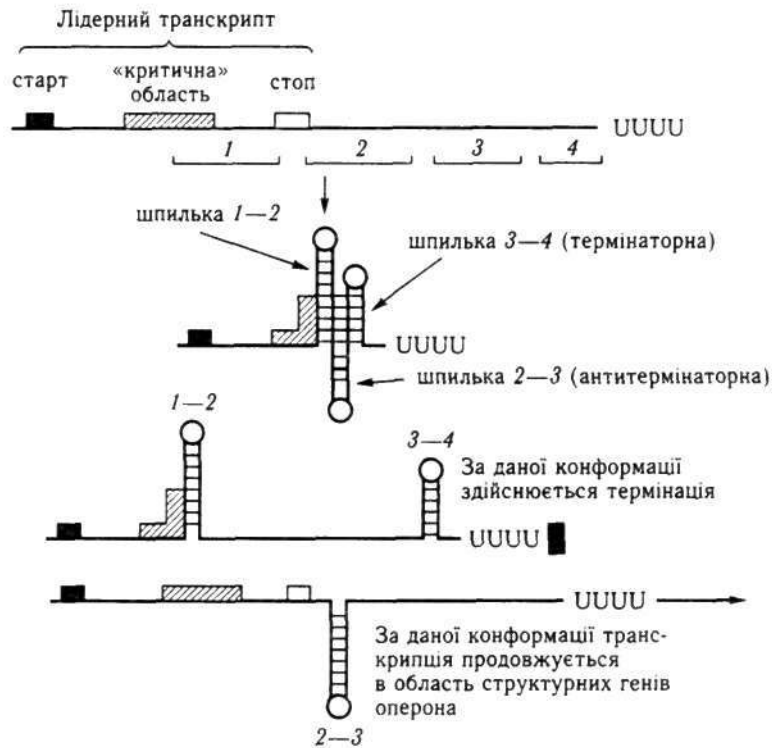


Рис. 3.12 Атенуатор триптофанового оперона

1, 2, 3, 4 — ділянки РНК, що в різних поєднаннях утворюють шпильки. Шпильку 3-4 називають термінаторною.

РНК так званої **термінаторної шпильки**, яка зупиняє транскрипцію. Отже, послідовність подій без атенуації виглядає так:

Відсутність амінокислоти → відсутність відповідної аміноцил-тРНК → зупинка рибосоми на відповідних кодонах лідерного транскрипту (РНК) → відсутність термінуючої шпильки в лідерному транскрипті → подальше просування РНК-полімерази по ДНК оперона → повна транскрипція оперона

У випадку наявності готового гістидину в живильному середовищі термінуюча шпилька в лідерному транскрипті утворюється,

і подальша транскрипція оперона даною молекулою РНК-полімерази стає неможливою.

Слід зазначити, що атенуація в гістидиновому опероні є чи не єдиним способом контролю транскрипції, в той час як триптофановий оперон, крім атенуації, має ще репресорно-операторний контроль.

Прикладом оперонів, яким властива більш складна організація операторної області, може бути арабінозний оперон (*ara*-оперон). Основна група генів цього оперона кодує три ферменти, що перетворюють α -арабінозу в *D*-ксилулозу-5-фосфат. Ці три зчеплених гени позначають як *araBAD* (рис. 3.13). Крім того, є ще два не-

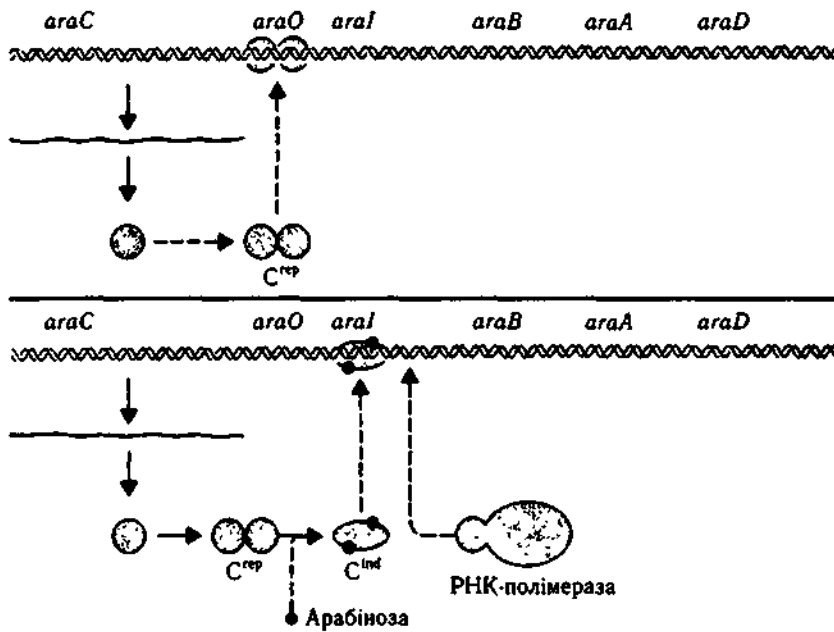


Рис 3.13 Схема структурної організації і регуляції арабінозного оперона
araO і *araI* — регульовальні (инс-активні) ділянки оперона

зчеплених структурних генів — *araE* і *araF*, що кодують білки мембрани і периплазми відповідно. Обидва ці гени підлягають тій же регуляції, що і гени *araBAD*. Інколи систему, що об'єднує роз'єднані гени спільним контролем, називають регулоном.

Ген *araC* є регуляторним і кодує білок-репресор — C^{rep} . Цей ген розташований перед промотором генів *araBAD* і транскрибується

з власного промотора в напрямку, протилежному напрямку транскрипції генів *araBAD*. Отже, область між генами *araBAD* і *araC* має два промотори протилежної орієнтації. Між стартовими точками цих двох дивергентних промоторів розташована контролююча область *ara*-оперона.

Білок-репресор C^{rep} , приєднуючись до цієї регулювальної ділянки, може виключати *ara*-оперон, проте він втрачає таку активність після взаємодії з низькомолекулярним алостеричним індуктором — арабінозою. Отже, за наявності субстрату (арабінози) у середовищі *ara*-оперон індуктується так само, як і *lac*-оперон за наявності лактози. Однак з'єднання з арабінозою не тільки інактивує репресор C^{rep} , але й перетворює його на білок-індуктор C^{ind} . Останній також взаємодіє з контролюючою областю оперона, але в іншій регульовальній ділянці, і ця взаємодія сприяє початку (ініціації) транскрипції. Отже, один і той же білок (продукт *araC*) може перебувати в двох формах, одна із яких виконує функцію **негативного**, а інша — **позитивного контролю**.

Транскрипція з генів *araBAD* і *araC* неможлива також без іншого фактора позитивного контролю — білка БАК (CAP), з'єданого з сАМР. Площадка для взаємодії з комплексом БАК-сАМР в ДНК знаходиться між регулювальними ділянками, що приєднують білки C^{rep} і C^{ind} (рис. 3.14). Просторове розташування цих ділянок у ДНК,

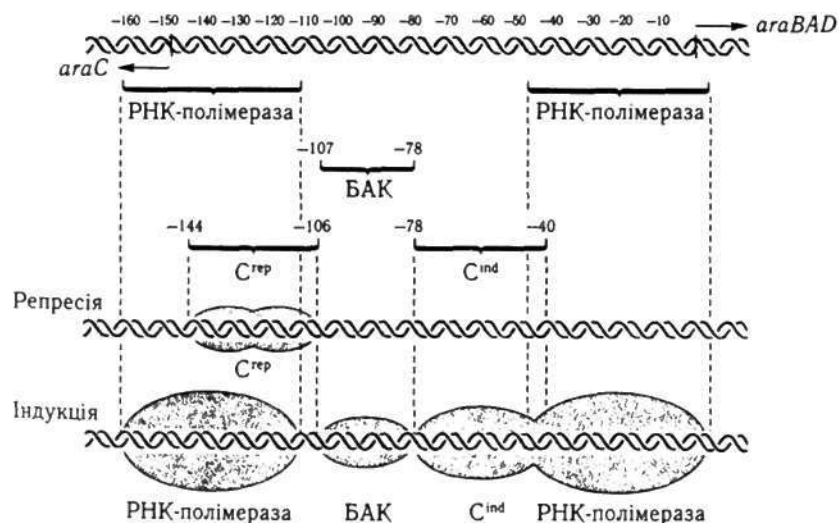


Рис. 3.14 Взаємне розташування регулювальних ділянок ДНК, які забезпечують репресію і індукцію арабінозного оперона (пояснення в тексті)

часткове перекривання правого і лівого промоторів із зони зв'язування білків C^{cr} і C^{nd} лежать в основі механізмів репресії та індукції *aga*-оперона. Як видно з рисунка 3.14, приєднання C^{cr} до ДНК виключає можливість її взаємодії з комплексом БАК-сАМР, а також з РНК-полімеразою. Це пояснюється не тільки частковим перекриванням відповідних ділянок зв'язування, але й тим фактом, що промотор пізнається РНК-полімеразою лише тоді, коли комплекс БАК-сАМР знаходиться в контролюючій області оперона.

Гени галактозного оперона *galKTE* відповідальні за перетворення галактози в галактозо-1-фосфат. Вони транскрибуються з однієї із двох стартових точок у поліцистронну РНК, яка послідовно транскрибується з утворенням трьох ферментів. Процес транскрипції підлягає класичній негативній регуляції: репресор, який кодується окремим незчепленим геном *galR*, інактивується за наявності галактози. Для транскрипції необхідний БАК-білок. Якщо він є, то ініціація транскрипції здійснюється в точці +1 (розділ 6.1). Ця стартова точка належить промотору *galP₁*. Якщо ж білок БАК відсутній, то оперон транскрибується з іншої точки ініціації, яка знаходиться в положенні -5 і відповідає промотору *galP₂* (рис. 3.15).

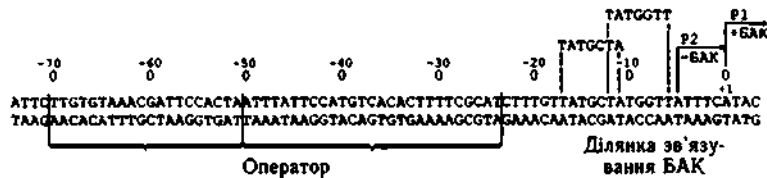


Рис. 3.15. Дві стартові точки галактозного оперона

Таким чином, в *gal*-опероні існує два промотори, які перекриваються. Стартові точки цих промоторів віддалені одна від одної на п'ять нуклеотидів. Сайт зв'язування білка БАК розташований досить близько від стартової точки +1 в межах відстані, що перекривається РНК-полімеразою. Якщо БАК зв'язується з цією ділянкою ДНК, то РНК-полімераза використовує промотор *galP₁*. Дещо далі проти ходу транскрипції розташований оператор. Якщо він зв'язується з репресором (продуктом гена *galR*), то жоден з промоторів не функціонує і транскрипція зупиняється.

Порівняння способів регуляції різних оперонів свідчить про те, що у бактерій функціонує ряд спільних механізмів, в основі яких лежить приєднання регулювальних білків до специфічних послідовностей ДНК. В кожному такому випадку здійснюється контроль здатності РНК-полімерази зв'язуватися з промотором і транскрибувати ДНК геномів.

Наведені приклади оперонної організації геномів бактерій свідчать про її різноманітність та функціональну доцільність. У споріднених представників бактерій (наприклад, у *E. coli* і *Salmonella typhimurium*) знайдено одні і ті ж оперони, проте послідовності розташування в них генів, як і нуклеотидів в генах, можуть мати істотні відмінності.

3.3.2. Плазмідни та епісоми

Крім хромосомної ДНК, клітини більшості видів бактерій і інших прокаріотів містять позахромосомні генетичні структури — плазмідни і епісоми. Плазмідни — це дволанцюгові кільцеві ДНК розміром від 10^3 п. н. до майже $1/3$ розміру хромосоми. Вони несуть гени, що необов'язкові для клітини-хазяїна, або гени, які необхідні лише за певних умов існування. Так, наприклад, *R*-плазмідни містять гени стійкості до хімічних сполук, як правило, зразу до декількох. Інші плазмідни визначають патогенність бактерій, наприклад деяких штамів *E. coli*, збудників чуми та ін. Треті — обумовлюють здатність бактерій використовувати незвичні джерела вуглецю, наприклад нафталин, камфору, нафтопродукти та ін. Реплікація плазмід здійснюється за допомогою реплікаційного апарату клітини-хазяїна, однак незалежно від хромосоми. Плазмідна сама контролює власну реплікацію і утримується в клітині в певній кількості копій. Плазмідні реплікони поділяють на групи сумісності. Якщо реплікони двох різних плазмід дуже подібні, то система регуляції реплікації їх не розрізняє, і ці плазмідни виявляються несумісними в одній клітині: в неселективних умовах після декількох поділів клітин у них залишається лише одна із плазмід. Плазмідни різних груп несумісності можуть стабільно співіснувати в одній клітині.

Деякі досить великі бактеріальні плазмідни здатні передаватися під час кон'югації із однієї клітини в іншу, іноді навіть в таку, що належить іншому виду. Такі плазмідни називаються інфекційними, кон'югаційними або трансмісивними, в протилежність так званим нетрансмісивним плазміднам. Властивості інфекційних плазмід визначаються групою генів, відповідальних за зазначений кон'югаційний перенос. Ці гени утворюють найбільший у бактерій оперон (*tra*). Гени *tra*-операона обумовлюють утворення спеціальних ворсинок або пилів на поверхні клітин. Ці пилі властиві клітинам чоловічого типу і необхідні для взаємодії двох бактерій, які вступають у процес кон'югації. Суть кон'югації полягає у виникненні цитоплазматичного мостика між двома клітинами, через який плазмідна ДНК може передаватись від донорної в реципієнтну клітину.

Гени *tra* різних плазмід, як і загальна структура *tra*-оперонів, часто дуже подібні. Дрібні за розміром плазмід не мають власних *tra*-оперонів і можуть передаватися в іншу клітину лише за наявності трансмісивних плазмід, використовуючи для цього їх апарат кон'югації. Такі плазмід називають мобілізаційними.

Найбільш вивченими бактеріальними плазмідами можна вважати статевий фактор *F* і його варіанти *F'*, а також фактори лікарської резистентності бактерій (*R*-плазмід) і бактеріоциногенії (наприклад, коліциногенні фактори ColE, що кодують бактеріоцини у *E. coli*).

В залежності від властивостей пилів на поверхні бактерій кон'югаційні плазмід поділяють на *F*-подібні і *I*-подібні. До *F*-подібних плазмід відносять фактор *F* і деякі інші плазмід, що контролюють синтез пилів, на яких можуть адсорбуватися *F*-специфічні фаги MS2, R17, I2, Q β , m2, Id. Клітини, що містять плазмід *F* (фактор фертильності, статевий фактор або фактор кон'югації) позначають як клітини *F*⁺. Бактерія, у якій *F*-плазмід відсутня, позначається як *F*⁻. Клітини, що несуть фактор *F* в автономному стані, за кон'югації є донорами цих плазмід для клітин *F*⁻.

Методом електронної мікроскопії в 1975 р. встановлено, що плазмід *F* містить декілька функціонально різних нуклеотидних послідовностей:

- а) послідовність, що забезпечує гомологію між плазмідною *F* і *F*-подібними плазмідами R1, R100, R6 і ColV;
- б) послідовності генів *tra*;
- в) послідовності для генів, що детермінують автономну реплікацію і O-пункт кон'югаційного переносу;
- г) послідовності для генів резистентності щодо фагів T3, T7 і ϕ 11;
- д) послідовності, які є «гарячими точками» інтеграції плазмід *F* в хромосому клітини.

I-подібні плазмід контролюють синтез пилів, на яких немає сайтів для адсорбції *F*-специфічних фагів, але є сайти для адсорбції інших (*I*-специфічних) фагів. Третя група кон'югаційних плазмід забезпечує синтез I_{k1}-пилів, на яких адсорбується фag I_{k1}.

Фактори лікарської резистентності (фактори *R*) являють собою плазмід, яким властиві дві особливості: вони несуть гени резистентності до однієї або декількох лікарських речовин (антибіотиків і сульфаніламідів); крім того, багато з них виявляють властивості статевого фактора, тобто є кон'югаційними. Однак окремі *R*-плазмід кишкових бактерій і стафілококів не здатні до самостійного кон'югаційного переміщення. Таким чином, відомі як кон'югаційні (трансмісивні), так і некон'югаційні (нетрансмісивні) *R*-фактори.

Коліциногенні фактори (Col-плазмиди) *E. coli* детермінують синтез білків-коліцинів, які вбивають бактерій того ж самого виду за відсутності у них аналогічних плазмід. Всі коліциногенні фактори розподіляють на кон'югаційні (наприклад, ColI, ColB, ColIV) і некон'югаційні (наприклад, ColE1, ColE2, ColE3).

Формування ентеропатогенних властивостей деяких штамів *E. coli* обумовлюють плазмиди Ent (детермінують синтез ентеротоксину), Hly (визначають синтез гемолізину), K (блокують деякі поверхневі антигени) та ін.

На заключення слід відзначити, що в хромосому бактеріальних клітин можуть тимчасово включатися ДНК деяких фагів та плазмід. Такі ДНК-утримуючі структури, що можуть самостійно існувати поза хромосомою, а за певних умов ставати інтегральною (тобто складовою) частиною хромосоми бактерії, називаються **епісомами**. У випадку включення в хромосому плазмиди *F* клітина *E. coli* перетворюється в донор типу *Hfr* — від англ. high frequency recombination (висока частота рекомбінацій). В ролі епісом можуть виступати також численні лізогенізуючі фаги, серед яких фаг λ , Mu, SPO1 та інші.

3.4. Геноми еукаріотів

Із-за складності будови еукаріотних геномів їх організація з'ясована недостатньо, та й то лише для окремих видів. Однак вже сьогодні успішно виконана міжнародна програма, метою якої було з'ясування нуклеотидних послідовностей в усіх молекулах ДНК хромосом людини. Цей грандіозний і дуже дорогий науковий проект свідчить про великий інтерес вчених і всього людства до проблеми організації геному людини. Особливості організації і функції цього найскладнішого геному сьогодні інтенсивно з'ясовуються. Цьому дуже допомагають досліді на більш простих, ніж людина, еукаріотних об'єктах — дріжджах, дрозофілі, земноводних, мишах та ін. Вже відомі деякі особливості організації генетичного апарату еукаріотів, які можуть бути певною мірою властивими різним індивідуальним геномам.

Найважливішою особливістю еукаріотних геномів є дуже складна організація систем регуляції їх функцій. Крім тих структурних генетичних елементів, які необхідні для контролю функціонування структурних генів, тобто промоторів, термінаторів та інших, є і специфічні для еукаріотів генетичні системи регуляції. Це поясню-

ється значно більшою складністю самого геному, наявністю гормональної регуляції геномних функцій та багатьма іншими причинами.

Розміри геномів різних еукаріотів характеризує величина *C* — так називають кількість ДНК, що приходить на один геном. Для певного виду ця величина досить постійна і вимірюється в *пкг* ДНК, кількістю пар нуклеотидів або в дальтонах:

$$1 \text{ пкг} = 0,965 \cdot 10^9 \text{ п. н.} = 6,1 \cdot 10^{11} \text{ Да.}$$

Величина *C* коливається від 10^4 п. н. у мікоплазми до $\sim 10^{11}$ п. н. у деяких рослин і амфібій. Вважають, що еволюційний розвиток еукаріотів супроводжується збільшенням загальної кількості ДНК на один гаплоїдний набір хромосом. Однак прямої залежності тут немає: у деяких дуже споріднених видів спостерігаються разючі відмінності у значеннях величини *C*, інколи більш ніж у десять разів. У різних видів амфібій, наприклад, мінімальний розмір геному складає 10^9 п. н., а максимальний — $\sim 10^{11}$ п. н. Цей факт не можна пояснити різницею в кількості генів, бо вона не може так різко коливатися, тим більше у споріднених видів. Відомо, що кількість генів у дрозофіли — приблизно 5000, а у людини, за останніми даними, складає близько 30 000.

Середній розмір гена дрозофіли приймають за 2000 п. н., але конкретні гени еукаріотів можуть мати зовсім інші розміри (ген фіброїну шовку — 16 000 п. н.).

Загальна протяжність всіх ядерних генів еукаріотної клітини значно менша, ніж довжина молекул реальної ДНК. У людини число нуклеотидів у ДНК достатньо для утворення 2 000 000 структурних генів, хоч у дійсності цих генів нараховується кілька десятків тисяч. По довжині ДНК дрозофіли теоретично можна було б розмістити більш ніж 100 000 генів. Це означає, що лише менша частина протяжності ДНК еукаріотів є безпосереднім носієм генетичної інформації про структуру білків. Така виразна надлишковість еукаріотних геномів пояснюється рядом особливостей їх організації, серед яких в першу чергу слід зазначити такі:

1) наявність численних повторів значущих і незначущих послідовностей в ДНК;

2) множинність регуляторних послідовностей, що самі не кодують білків, але можуть взаємодіяти з білками-регуляторами або впливати на експресію генів іншим способом;

3) наявність спейсерів, що розділяють окремі гени і кластери генів;

4) мозаїчність структури еукаріотних генів, тобто наявність в них значущих і некодуючих послідовностей — екзонів і інтронів;

5) інші особливості геномів.

3.4.1. Особливості будови генів еукаріотів

У 1977 р. було з'ясовано, що структурні гени хромосом еукаріотних клітин мають переривчасту будову. Вони складаються із послідовностей двох типів: одні з цих послідовностей — **екзони** — кодують структуру кінцевого продукту гена і представлені в молекулі зрілої РНК, інші — **інтрони** — хоч і транскрибуються, але відсутні в зрілій РНК. Спочатку з молекули ДНК зчитується РНК-копія або **транскрипт**, нуклеотидна послідовність якого повністю повторює первинну структуру одного з ланцюгів ДНК. Однак це лише **РНК-попередник**, який безпосередньо не приймає участі у синтезі білка. Зріла РНК утворюється лише після вилучення із попередника всіх інтронів (детальніше — розділ 6.1.4). Такі гени, що складаються з певної послідовності екзонів і інтронів, отримали назву **мозаїчних генів**.

Розірвані (або мозаїчні) гени властиві самим різним представникам еукаріотів — рослинам, дріжджам, безхребетним, птахам і ссавцям, включаючи людину. Наявність і розташування інтронів вдалося з'ясувати шляхом гібридизації клонованих фрагментів геномної ДНК і зрілих іРНК. За такої гібридизації інтрони ДНК утворюють петлі, бо вони не можуть спаруватися з іРНК, яка не містить інтронів (рис. 3.16).

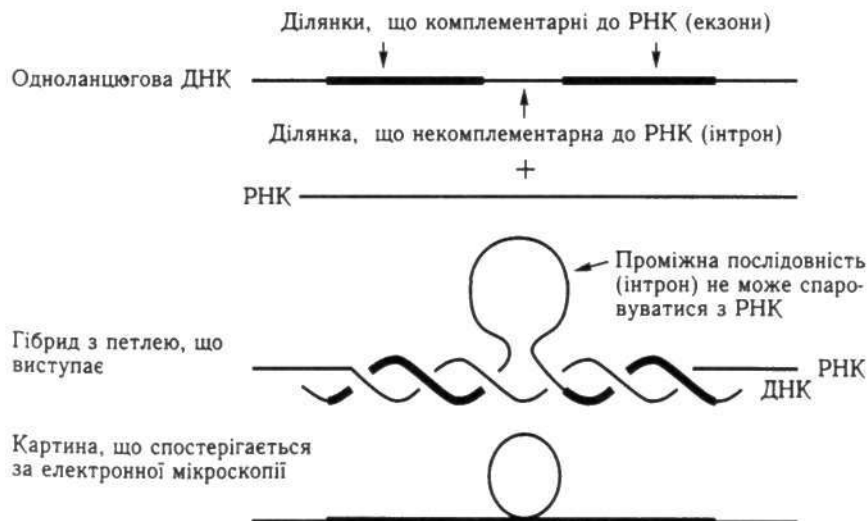


Рис. 3.16. Наслідки гібридизації зрілої РНК з одноланцюговим фрагментом відповідного еукаріотного гена

Кількість інтронів у різних генах дуже коливається: від одного (в гені актину дріжджів) до декількох десятків (17 у гені δ -кристаліну птахів, 31 — у гені вітелогеніну птахів, 50 — у гені проколагену ссавців). Сумісна довжина інтронів може в багато разів перевищувати довжину екзонів. Так, наприклад, в гені проколагену птахів екзони складають лише $\frac{1}{8}$ його частину, а в гені тіреоглобуліну ссавців — лише $\frac{1}{20}$. Екзони включають в себе не тільки ті послідовності, що кодують ділянки поліпептидів, але й послідовності, які містяться в зрілих РНК, але не транскрибуються. Ці райони відповідають «лідерній» області перед ініціюючим кодоном або послідовності на 3'-кінці іРНК, яка розташована після термінуючого триплету і не транскрибується. Іноді лідерна область (ген інсуліну) і 3'-кінець транскрипту (іРНК фібриногену щура) можуть бути представлені окремими екзонами.

Переважає більшість інтронів не має відношення до кодування структури білків, однак є інтрони (принаймні в деяких генах мітохондрій дріжджів), які можуть зчитуватися за трансляції. З'ясовано, що нативна структура інтронів дуже важлива для перетворення попередників РНК в зрілі молекули. Тому структурні порушення (мутації) в інтронах можуть мати серйозні наслідки для клітини.

Вважають, що не всі гени еукаріотів переривчасті. Деякі гени, як і гени бактерій, не мають інтронів, однак мозаїчних генів у еукаріотів значно більше, що і є однією з причин надлишковості еукаріотних геномів.

3.4.2. Типи нуклеотидних послідовностей еукаріотних геномів

Типи нуклеотидних послідовностей еукаріотних геномів можна визначити шляхом дослідження кінетики реасоціації денатурованих молекул ДНК. Реасоціація двох послідовностей ДНК здійснюється шляхом злучення комплементарних основ двох ланцюгів ДНК — в протилежність процесу денатурації, за якого ці основи розходяться. Основним параметром реакції реасоціації є добуток з концентрації ДНК (C_0) на час інкубації (t). Цю величину позначають як C_0t . Величина, що відповідає здійсненню реакції реасоціації у половини загальної кількості ДНК, позначається як $C_0t^{1/2}$. Чим повільніше йде реакція реасоціації ланцюгів денатурованої ДНК, тим більше значення має величина $C_0t^{1/2}$. Отже, по значенню C_0t можна судити про ступінь комплементарності ланцюгів, а також про вихідну концентрацію ДНК, що реасоціює.

Геноми еукаріотів складаються із дуже неоднорідних за кількістю і первинною структурою компонентів ДНК, кожному з яких властива своя кінетика реасоціації.

Фракцію ДНК, що реасоціює першою, називають швидко ренатуруючою. Вона складає в середньому біля 25% всієї ДНК і належить так званим високочастотним повторам або **повторам високої частоти**. Вони представлені відносно короткими і досить простими за первинною будовою послідовностями, частота яких у геномі дуже велика — від багатьох сотень тисяч до мільйонів.

Наступна фракція називається проміжною. Вона складає в середньому 30% всієї ДНК і являє собою так звані помірні або **середньочастотні повтори**. Частота їх повторностей у геномі — від десятків до сотень тисяч разів.

Останньою реасоціює повільно ренатуруюча фракція ДНК, що складає 45% геному. До неї входять так звані **унікальні послідовності** нуклеотидів, що не повторюються або майже не повторюються в геномі. В основному це кодуєчі послідовності, тобто ті, що входять до складу генів. Унікальні послідовності виявляються у переважній більшості еукаріотних геномів. Виключення складають лише ті організми, які виникли внаслідок поліплоїдизації. У них кожна послідовність ДНК може бути представлена у вигляді численних копій. Подібних прикладів чимало серед рослин.

Помірні або середньочастотні повтори складаються із великої кількості різних за будовою послідовностей. Серед них є як **значущі**, так і **незначущі** послідовності ДНК, що мають різну протяжність і частоту повторів. Більшість незначущих повторів досить короткі, розсіяні по геному і входять до складу промоторів, термінаторів та інших регуляторних елементів, що специфічно розпізнаються відповідними білками. Це так звані **сигнальні послідовності**, що відіграють дуже важливу роль у регуляції функцій геному. Особливої уваги в цьому відношенні заслуговують так звані зворотні повтори або **паліндроми**, що розкидані по геному і сприяють розпізнаванню білками-ферментами та регуляторами деяких стратегічних ділянок ДНК (промоторів, термінаторів тощо).

В геномі людини значна частина помірних повторів представлена послідовностями довжиною біля 300 п. н., які чергуються з унікальними послідовностями. Приблизно половина таких повторів розщеплюється ферментом рестриктазою AluI і складає одне **сімейство повторів**, назване Alu-сімейством. Окремі члени цього сімейства не ідентичні, але подібні. Слід зазначити, що в ядрах клітин еукаріотів виявлені малі ядерні РНК (мяРНК), одна з яких (7S-РНК) у людей і щурів дуже близька за будовою і комплементарна одному із мономерів Alu-сімейства.

До **значущих** полімерних повторів відносяться деякі гени. Так, наприклад, гени рибосомних РНК у еукаріотів розташовані поруч в послідовності 18S — 5,8S — 28S і таких трійок у геномі може бути багато (від 100 до 1000 у тварин, декілька тисяч — у квіткових рослин). Всі вони згруповані в блоки або **кластери** в прицентромernih гетерохроматинових ділянках хромосом. В геномі дрозофіли таких повторностей 7, у людини — декілька сотень (в п'яти хромосомах). Окремі повтори трійок розмежовані **спейсерами**, довжина яких складає $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$ загальної довжини структурних генів. В середині одиниці повтору — короткі спейсери між генами, які транскрибуються.

Ще більш численні гени 5S-рРНК — їх до 1000, навіть до 10—20 тис. копій. Гени 5S-рРНК теж утворюють кластери і відділені спейсерами, більш значними, ніж ген. У бактерій і деяких нижчих еукаріотів гени, кодуєчі 5S-РНК, входять у склад кластерів генів високомолекулярних рРНК і транскрибуються разом з ними. У вищих еукаріотів гени, кодуєчі 5S-РНК, організовані в самостійні кластери.

До складу **помірних повторів** входять також гени, що кодуєчі тРНК і гістони. Кластер генів гістонів (H4-H2b-H3-H2a-H1) у морського їжака транскрибується як одне ціле.

Сьогодні є підстави вважати, що хоч більшість генів за гібридації ДНК у розчині поводити себе як **унікальні послідовності**, в геномі є чимало інших комплементарних до них послідовностей. Інколи такі фрагменти ДНК є функціонуючими дивергованими в еволюції генами; інколи це нефункціонуючі **псевдогени**. Останні, як вважають, є реліктами еволюції, що виникли з колись діючих генів за рахунок мутагенезу. В подібній еволюції важливу роль могли зіграти подвоєння генів — **дуплікації**, за якими йшла **дивергенція копій** шляхом накопичення нуклеотидних замін та інших мутацій. Один із важливих шляхів утворення псевдогенів — інтеграція з хромосомою їх ДНК-копій, що синтезувалися за рахунок зворотної транскрипції на матрицях іРНК. Набір генів, що утворився шляхом дуплікацій і структурних змін гена-предка, називається **сімейством генів**. Члени одного сімейства можуть розташовуватися поруч в одній хромосомі або бути розсіяними по всьому геному. Кластери генів еукаріотів можуть складатися із двох локалізованих поряд генів, але можливі випадки, коли сотні ідентичних генів розташовуються тандемно.

Члени одного сімейства структурних генів мають подібні або ідентичні функції, але можуть функціонувати в різний час розвитку або в клітинах різних типів. Наприклад, в ембріональних і зрілих клітинах червоної крові синтезуються різні глобіни, а в мускульних і немускульних клітинах — різні актини. Висока тандемна повтор-

ність деяких генів пояснюється необхідністю в надзвичайно великій кількості їх продуктів. Прикладом цього можуть бути гени рРНК та гістонів.

Одна із особливостей організації геномів еукаріотів — наявність у них так званих складних локусів, що мають великі розміри і часто містять декілька генів, що іноді перекриваються. Саме такими є складні локуси *D. melanogaster*, що регулюють формотворчі процеси за індивідуального розвитку мухи. В кожному такому локусі міститься так званий «гомеобокс» із 180 п. н. Цікаво, що «гомеобокси» різних складних локусів на 80% гомологічні за нуклеотидним складом і можуть взаємодіяти з одними і тими ж регуляторами, але дещо по-різному.

Отже, наявність помірних повторів в геномі (як значущих, так і незначущих) не є випадковістю еволюції. Це одна із безперечних ознак більш високої — еукаріотної — організації життя, з якою пов'язані більш ефективні форми організації і функції геному.

Високочастотна фракція ДНК складається із коротких послідовностей, що багаторазово повторюються в геномі у вигляді тандему. Отже, це множинність копій незначущих коротких послідовностей. В одних випадках ці копії ідентичні, в інших вони близькі за будовою. Ця фракція ДНК дуже швидко регенерує після денатурації, може бути виділена як самостійна і отримала назву сателітної ДНК. Є різні типи сателітної ДНК навіть в одному і тому ж геномі. Так, у *D. virilis* є принаймні три основних типи сателітної ДНК, що являють собою численні повтори дуже схожих послідовностей із 7 п. н.

У ссавців нуклеотидні послідовності, що входять до складу тандемних повторів кожної сателітної ДНК, дуже різняться. Ряд варіантів короткої послідовності може формувати більш довгу послідовність, яка в свою чергу тандемно повторюється з деякими змінами.

Сателітні ДНК входять у склад гетерохроматину прицентромерних областей хромосом, а також теломер і супутників.

Кількість сателітної ДНК у геномі значно коливається в залежності від об'єкту дослідження: у людини вона складає до 15% загальної кількості ДНК, у миші — 12%, у квасолі 40%. Сателітна ДНК не несе генетичної інформації і не транскрибується.

В останні роки велику увагу дослідників привернули до себе так звані міні- та мікросателіти — короткі і частково гомологічні послідовності нуклеотидів, які розкидані по геному і часто оточують (фланкують) певні значущі послідовності. Кількість повторів цих мікросателітів у певних районах хромосом може бути різною навіть у представників одного виду, що дає можливість визначати ступінь спорідненості особин, їх схильність до спадкових хвороб та ін.



Частина II

**МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ
НАЙВАЖЛИВІШИХ
ГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ**

1

Загальна характеристика молекулярногенетичних процесів

До найважливіших молекулярногенетичних процесів, які забезпечують життєдіяльність і відтворення клітин та організмів, в першу чергу слід віднести:

1) процес передачі наступним поколінням спадкової інформації у вигляді генетичних молекул ДНК або РНК (гДНК, гРНК), що обумовлюється синтезом точних їх копій *de novo*;

2) молекулярні реакції, які спрямовані на збереження нативної структури генетичних нуклеїнових кислот (гНК) і гарантують передачу наступному поколінню безпомилкової інформації;

3) молекулярні процеси, що ведуть, навпаки, до змін спадкової інформації — або за рахунок нової комбінаторики генів у хромосомах, або шляхом виникнення нової чи втрати старої інформації (див. розділи 11—12);

4) процеси, які забезпечують внутрішньоклітинну передачу і реалізацію генетичної інформації, тобто фенотипове вираження генотипу;

5) складні регуляторні реакції на рівні молекул нуклеїнових кислот і білків, що забезпечують генетичний і метаболічний гомеостаз у клітині.

У деяких вірусів, а також у бактерій, рослин і тварин, що містять дволанцюгові гДНК, безпомилкова передача спадкової інформації наступному поколінню забезпечується здатністю клітин точно відтворювати гДНК перед кожним поділом. Цей процес, що призводить до утворення двох нових молекул ДНК на матриці вихідної молекули, називається **реплікацією**. При цьому здійснюється практично безпомилковий перенос інформації від ДНК до ДНК завдяки **напівконсервативному** механізмові реплікації, який базується на комплементарності азотистих основ двох ланцюгів ДНК. В деяких випадках синтез ДНК йде **консервативно**, і тоді одна із дочірніх молекул повністю синтезується заново і не містить матеріалу, що входив у структуру вихідної (батьківської) молекули ДНК. Незалежно від типу, реплікація ДНК забезпечується численними

ферментами, із яких найважливішими можна вважати **ДНК-полімерази**.

У вірусів, носієм інформації у яких є одноланцюгові або дволанцюгові молекули РНК, передача інформації нащадкам здійснюється шляхом утворення численних копій цих молекул. У реплікації РНК приймають участь специфічні РНК-залежні РНК-полімерази (або РНК-реплікази), які кодуються РНК-хромосомами вірусів.

У вірусів з так званим **негативним геномом** (вірус грипу, везикулярного стоматиту та ін.) інфікуючий ланцюг РНК не несе безпосередньої генетичної інформації. Лише комплементарний йому (кодогенний або змістовний) ланцюг несе необхідну інформацію, серед якої — запис про структуру найважливішого для вірусу ферменту — РНК-реплікази. Отже, інфікуючий ланцюг як такий, що не несе інформації, не може сам по собі індукувати розмноження вірусу. Однак наявні у складі таких вірусів молекули РНК-реплікази забезпечують синтез в інфікованій клітині кодогенного «плюс»-ланцюга РНК на матриці «мінус»-ланцюга. В подальшому «плюс»-ланцюг РНК слугує матрицею для синтезу великої кількості «мінус»-ланцюгів, необхідних для збірки вірусних часток з негативним геномом.

РНК-віруси з позитивним геномом (наприклад, бактеріофаг R17) містять кодогенний (значущий) «плюс»-ланцюг. Після інфікування на такому ланцюгу РНК-репліказою синтезується «мінус»-ланцюг, який в свою чергу слугує матрицею для синтезу вірусних геномів, тобто «плюс»-ланцюгів.

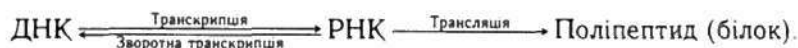
До механізмів, що гарантують передачу наступним поколінням інформації без помилок, слід віднести в першу чергу **систему модифікації-рестрикції**, яка захищає бактеріальні клітини від інформації чужих гДНК. Останні у випадку їх проникнення у клітину пізнаються і розрізаються бактеріальними ферментами — **рестриктазами**. Збереження структури власних геномних нуклеїнових кислот забезпечується також **коректорською функцією ДНК-полімераз** і **системою вилучення ушкоджень**, які можуть виникати як за рахунок неточної реплікації, так і ушкодження вже синтезованих молекул ДНК під впливом фізичних та хімічних факторів.

Системи виправлення ушкодженої структури ДНК, тобто **репарації**, дуже різноманітні як у прокаріотних, так і в еукаріотних клітинах. Як і інші молекулярногенетичні процеси, репарація здійснюється великою кількістю ферментів, інформація про які міститься в специфічних генних локусах ДНК. Чимало ферментів є спільними для реплікації, репарації та інших генетичних процесів. Системи корекції і репарації ДНК забезпечують стабільність генетичного матеріалу, однак ця стабільність відносна, бо одночасно на ДНК діють фактори, що призводять до змін спадкової інформації.

До молекулярних подій, що викликають зміни кількості або якості інформації в ДНК, відносяться **мутації** та **рекомбінації**. Відносність стабільності ДНК обумовлена тим, що не всі порушення її структури усуваються шляхом репарацій. Ряд невиправлених помилок закріплюються в геномі, а після реплікації ДНК відтворюються в наступних поколіннях. Такі спадкові зміни структури ДНК називають **мутаціями**. Виникнення мутацій (мутаційний процес) забезпечує мінливість спадкового матеріалу і лежить в основі еволюції.

Разом з мутаціями значний вклад в еволюцію вносить мінливість, обумовлена переносом і обміном генетичного матеріалу між різними хромосомами або окремими ділянками однієї хромосоми. Такі обміни і переноси можуть бути наслідком **генетичної рекомбінації** молекул ДНК (розділ 12), а також дещо відмінних за механізмом процесів — **транспозицій** (розділ 11.6.3). При цьому збільшується розмаїття комбінацій генів у хромосомах і зростає так звана **комбінаційна мінливість**, що дуже важливо для еволюції.

Внутрішньоклітинна передача і реалізація генетичної інформації згідно з так званою **центральною догмою** молекулярної біології здійснюється у напрямку:



Передача інформації з білків на нуклеїнові кислоти не доведена і вважається неможливою.

Реалізація генетичної інформації ДНК розпочинається з її переписування на РНК. Цей процес називають **транскрипцією**. Він забезпечує синтез молекул РНК, які являють собою копії певних ділянок змістовного ланцюга гДНК. Процес транскрипції каталізується ДНК-залежними РНК-полімеразами і полягає в тому, що після локального розкручування спіральної дволанцюгової структури ДНК на одному із її ланцюгів здійснюється синтез комплементарного ланцюга РНК. Тому кожна шойно синтезована РНК має таку ж послідовність азотистих основ, як і відповідний фрагмент значущого ланцюга ДНК з тією, однак, різницею, що замість тиміну РНК містить урацил.

В залежності від того, які гени транскрибуються, утворюються різні типи РНК: рибосомні — рРНК, транспортні — тРНК, інформаційні (матричні) — іРНК або мРНК, малі ядерні РНК — мяРНК та ін.

У еукаріотів всі РНК синтезуються у вигляді попередників (про-РНК). В ядрі йде процес «дозрівання» про-РНК, який отримав назву **процесингу**. Зрілі РНК залишають ядро і проникають у цитоплазму. Слід зазначити, що процесинг іРНК включає не тільки біохімічні модифікації нуклеотидів, але й вирізання певних послі-

довностей із молекул попередника. Тому повної відповідності (колінеарності) нуклеотидних послідовностей кодогенного ланцюга ДНК і відповідної йому зрілої РНК може й не бути.

РНК усіх зазначених типів необхідні для забезпечення наступного етапу реалізації генетичної інформації, який називається **трансляцією**. В процесі трансляції здійснюється переклад генетичної інформації з мови нуклеотидів на мову амінокислот. Внаслідок цього процесу синтезуються поліпептиди з первинною структурою, яка визначається послідовністю нуклеотидів у молекулі іРНК.

Синтез поліпептидів (білків) здійснюють **рибосоми** — цитоплазматичні структури із рРНК і рибосомних білків. Амінокислоти, необхідні для трансляції, транспортуються до рибосом з допомогою тРНК. З'єднавшись з останніми, амінокислоти утворюють так звані активовані форми (аміноацил-тРНК). В процесі трансляції молекула іРНК триплет за триплетом просувається через рибосому. При цьому до кодону іРНК, що знаходиться в певному активному центрі рибосоми, приєднується з допомогою водневих зв'язків антикодон тієї тРНК, яка є носієм відповідної (до змісту кодону) амінокислоти. Між амінокислотними залишками, що виявляються розташованими в двох сусідніх активних центрах рибосоми, утворюється пептидний зв'язок. Таким чином нуклеотидна послідовність іРНК перекладається (транлюється) на відповідну послідовність амінокислот у поліпептиді.

В процесі життєдіяльності в кожній клітині в залежності від стадії розвитку і умов існування функціонує лише певна частина геному. Отже, існують певні системи регуляції його функцій в онтогенезі, які хоч і визначаються геномом, можуть діяти на позагеномному (епігеномному) рівні. Генетична детермінація і механізми успадковування таких позагеномних процесів відносяться до сфери так званої **епігеномної спадковості**.

Існуюча в організмі система регуляції біосинтезу білків діє на рівні транскрипції і трансляції. В свою чергу регуляція транскрипції поділяється на **глобальну регуляцію**, яка забезпечує зміни окремих фаз або стадій життєвого циклу, і **регуляцію на рівні окремих генів чи оперонів** залежно від умов існування. Щодо механізмів регуляції біосинтезу білка на рівні трансляції, то вони дуже різноманітні. Все розмаїття зазначених систем регуляції спрямовано на найбільш ефективне використання генетичної інформації і на підтримання метаболічного гомеостазу в клітині.

Розділ 4

РЕПЛІКАЦІЯ ДНК ЯК ПЕРЕДУМОВА ПЕРЕДАЧІ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ НАЩАДКАМ

4.1. Загальна характеристика процесів реплікації

В зв'язку з тим, що в послідовності нуклеотидів ДНК закодovана генетична інформація, необхідне точне відтворення структури ДНК у процесі поділу клітин. Заново синтезована молекула ДНК мусить бути точною копією старої молекули. У постульованій Д. Уотсоном і Ф. Кріком структурі молекула ДНК складається із двох комплементарних полінуклеотидних ланцюгів, що передбачає матричний принцип біосинтезу. Це означає, що кожен із ланцюгів старої (вихідної, матричної) молекули ДНК у процесі її подвоєння (реплікації) слугує будівельною площадкою (матрицею) для синтезу нового комплементарного ланцюга.

Таким чином, із однієї материнської молекули утворюється дві дочірні, які повністю повторюють її будову (рис. 4.1). Зауважимо, що кожна дочірня молекула ДНК один полінуклеотидний ланцюг отримує від старої (вихідної) молекули, а другий, комплементарний до нього, синтезується заново. Цей, так званий **напівконсервативний механізм** реплікації ДНК був експериментально доведений М. Мезельсоном і Ф. Сталем у 1958 р. і виявився найбільш розповсюдженим у живій природі.

Однак у деяких випадках синтез ДНК здійснюється **консервативно**, і тоді одна із дочірніх молекул повністю синтезується заново. Прикладом консервативної реплікації є **сигма-тип** синтезу ДНК. Цей тип реплікації в основному властивий одноланцюговим кільцевим ДНК деяких вірусів (наприклад, бактеріофага фХ174); в цих випад-



Рис 4.1. Схема напівконсервативної реплікації ДНК

ках синтез здійснюється через дволанцюгову (реплікаційну) форму молекули.

Реплікація і ріст клітин у бактерій і еукаріотів тісно пов'язані, а завершення циклу реплікації узгоджується з актом поділу клітини.

В процесі синтезу ДНК, як і інших молекул (РНК, білків), виділяють три основні стадії: **ініціації** (початок синтезу), **елонгації** (наращення довжини полімерного ланцюга) і **термінації** (закінчення синтезу). Кожна з цих стадій здійснюється за участю ферментів та інших білкових факторів, що є специфічними як для кожної стадії, так і для об'єктів дослідження. Однак є багато спільних закономірностей в реплікації ДНК різної будови і різного походження, які на сьогодні з'ясовані завдяки успішним дослідом на кишкової паличці та деяких фагах.

Невеликі за розміром молекули ДНК вірусів і бактерій реплікуються як одне ціле, тобто за один акт реплікації. Гігантські молекули еукаріотів подвоюються завдяки дуже численним актам реплікації, що розпочинаються незалежно один від одного в різних місцях материнської молекули. Одиниця протяжності ДНК, що реплікується за один окремий акт реплікації, називається **репліконом**. В останньому обов'язково мусять бути необхідні для реплікації контролюючі елементи: точка початку або ініціації біосинтезу (origin) і точка його закінчення або термінації (terminus).

Бактеріальна хромосома містить один реплікон, отже з однієї точки ініціації (одного оріджина) реплікується весь геном. Плазмідні бактерій являють собою автономні кільцеві ДНК і теж є однорепліконними. Щодо хромосом еукаріотів, то вони утримують багато репліконів, отже є **полірепліконними**. У дріжджів *S. cerevisiae* нараховують приблизно 500 репліконів, у *D. melanogaster* — біля 3500, у ссавців — 20 000—30 000. Окремі реплікони в ДНК ссавців розташовані на відстані 100—200 тисяч п. н., у дрозофіли і дріжджів ця відстань менша. За один клітинний цикл всі реплікони хромосоми повинні бути один раз проактивовані, однак вони активуються неодноразово. Цим пояснюється неодноразовість подвоєння різних ділянок хромосом за клітинного циклу. Основна кількість ДНК подвоюється в S-фазі клітинного циклу, однак так звані **пахітенна** та **зиготенна** ДНК реплікуються значно пізніше, про що свідчать їх назви.

Точка, в якій здійснюється реплікація, отримала назву **вилки реплікації** або точки росту. Остання рухається послідовно вздовж ДНК від її **стартової точки** (тобто точки ініціації реплікації) до **точки термінації**. Розпочавшись в одній точці, подвоєння молекули ДНК може здійснюватись або в одному, або в двох протилежних напрямках (**односпрямована** і **двоспрямована реплікація**).

Так, реплікація хромосоми *E. coli*, розпочавшись в одній стартовій точці — origin C, йде в обох протилежних напрямках до тих пір, поки обидві вилки реплікації не зустрінуться (рис. 4.2). Вна-

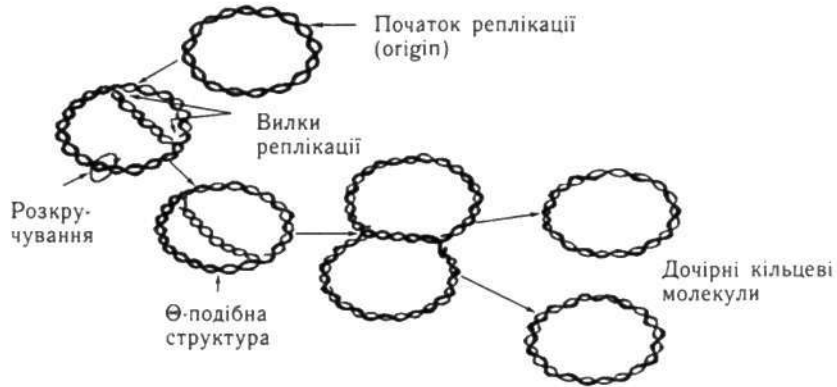


Рис. 4.2. Схема двоспрямованої реплікації кільцевої молекули ДНК за Θ -типом

слідок цього материнська кільцева молекула ДНК утворює дві ідентичні копії. В протилежність цьому, кільцева ДНК окремих плазмід, наприклад, плазмиди ColE1, реплікується односпрямовано і має ряд інших істотних відмінностей від реплікації бактеріальної хромосоми. У еукаріотів численні вилки реплікації в хромосомній ДНК згодом зливаються, що теж призводить до подвоєння цієї молекули (рис. 4.3).

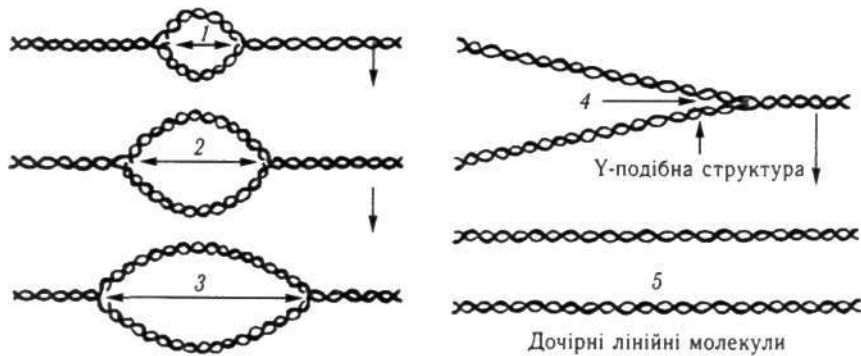


Рис. 4.3. Схема двоспрямованої реплікації лінійної молекули ДНК:

1—5 — різні стадії процесу

Інший тип поведінки реплікаційної вилки властивий деяким мітохондріям (рис. 4.4). Реплікація розпочинається в специфічній точці кільцевої дволанцюгової молекули мтДНК.

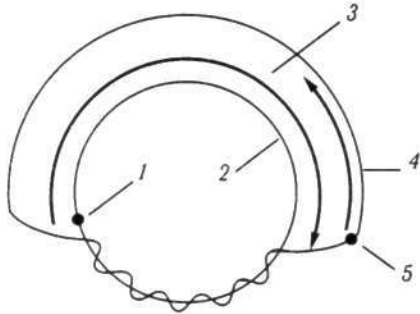


Рис. 4.4. Утворення D-петлі за реплікації мтДНК:

1 — точка ініціації реплікації лідерного ланцюга мтДНК; 2 — подвоєний ланцюг ДНК; 3 — D-петля; 4 — відслоєний неподвоєний ланцюг ДНК; 5 — Точка ініціації реплікації відстаючого ланцюга мтДНК; Стрілками позначено напрямки реплікації

Однак спочатку лише один із двох материнських ланцюгів використовується як матриця для синтезу. Реплікація охоплює лише коротку ділянку одного із ланцюгів ДНК і викликає витіснення комплементарного ланцюга материнської молекули, який залишається неподвоєним. Події, що відбуваються в цій ділянці мітохондріальної ДНК, були названі «витісненням» (displacement), а структура, що внаслідок цього утворюється, — **D-петлю**. Короткий подвоєний фрагмент одного з ланцюгів ДНК в D-петлі потім подовжується і розширює D-петлю, витісняючи все далі

неподвоєний ланцюг материнської молекули (рис. 4.4). Врешті решт в останньому відкривається власна точка початку реплікації, з якої розпочинається подвоєння і цієї, досі не реплікованої, нитки ДНК. Ця значно запізнена (в порівнянні з іншим ланцюгом) реплікація йде вздовж витісненої нитки ДНК у напрямку, протилежному реплікації, що розпочалася раніше на протилежному ланцюгу. В той момент, коли одне з кілець перетворюється в повністю подвоєне, на другому (комплементарному) синтез ще не закінчено, і це кільце на 60—70% залишається одноланцюговим. Його добудова здійснюється пізніше, після розходження двох дочірніх кільцевих молекул мтДНК. Отже, за D-петлі подвоєння двох комплементарних ланцюгів кільцевої ДНК мітохондрії здійснюється одночасно.

Слід зазначити, що реплікація дволанцюгових ДНК взагалі йде з різною швидкістю на кожному з двох комплементарних ланцюгів. Це пояснюється антипаралельністю молекули ДНК і неможливістю полімеризації нуклеотидів у напрямку 3' → 5', бо ДНК-полімераза нарощує лише 3'-кінець вже існуючого олігонуклеотиду, що править **затравкою** (праймером). Таким чином, єдино прийнятний для ферменту напрямок синтезу ДНК — це синтез від 5'-кінця до 3'-кінця молекули. Цей напрямок синтезу (5' → 3') на одному з лан-

цюгів співпадає з напрямком поширення реплікаційної вилки, а на іншому — йде в зворотному напрямку (рис. 4.5) і здійснюється

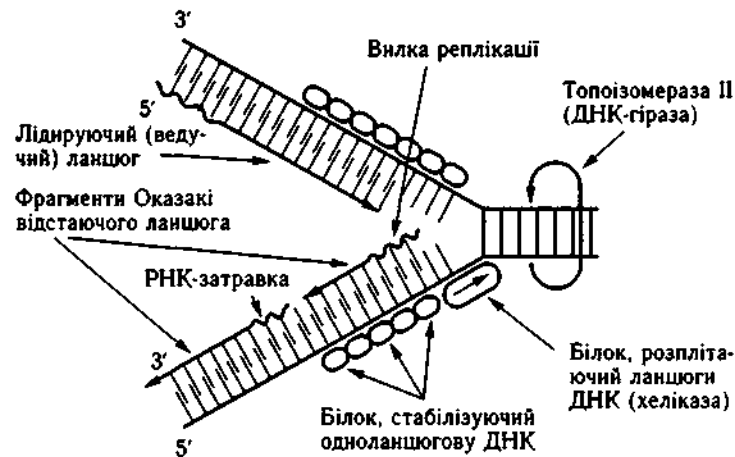


Рис 4.5. Реплікаційна вилка та напрямки синтезу ведучого та відстаючого ланцюгів дочірніх молекул ДНК

невеликими фрагментами, що називаються **фрагментами Оказакі**. Той ланцюг ДНК, синтез якого йде в напрямку 5' → 3' без перерви і зупинок, називається **лідируючим**. Комплементарний йому ланцюг, синтез якого теж йде в напрямку 5' → 3', але протилежно хвилі загальної реплікації і здійснюється переривчасто як у просторі, так і у часі, називають **відстаючим** або **запізнілим ланцюгом**.

В залежності від будови молекули ДНК (кільцева чи лінійна), а також від її походження (вірусна, бактеріальна чи еукаріотна) реплікація здійснюється за різними схемами. Спостерігаючи за такими молекулами з допомогою електронного мікроскопу, можна бачити різні структури, що нагадують деякі букви грецького алфавіту. Відповідно до цього розрізняють декілька типів реплікації ДНК: Υ (ігрек)-тип, θ (тета)-тип, σ (сигма)-тип, крім вже відомої нам D-петлі.

Υ -тип синтезу властивий лінійним дволанцюговим ДНК еукаріотів та деяких вірусів. Реплікаційні вилки в таких молекулах виглядають як характерні вздуття або вічка. В полірепліконних молекулах ці вічка поступово зливаються, а коли цей процес досягає одного з кінців материнської ДНК, вона за структурою дуже нагадує букву Υ (див. рис. 4.3). Коли реплікація закінчується, утворюються дві дочірні молекули — обидві лінійні дволанцюгові.

Кільцеві двоспиральні молекули ДНК (кишкової палички, інших бактерій, реплікаційна форма ДНК фага λ та ін.) за рахунок однієї або двох протилежно спрямованих вилок реплікації до закінчення синтезу утворюють фігури, що нагадують букву θ (див. рис. 4.2). Саме тому цю реплікацію називають **синтезом за тета-типом**.

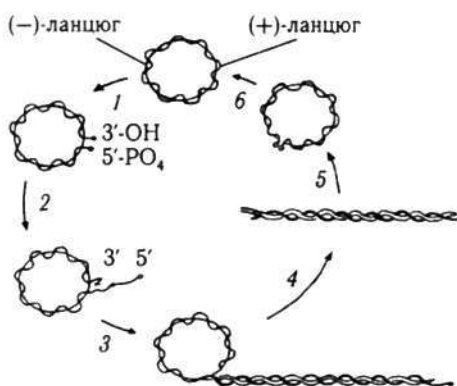


Рис. 4.6. Подвоєння кільцевої ДНК за θ -типом.

1 — специфічна до певної послідовності ендонуклеаза вносить одноланцюговий розрив в (+)-ланцюг; 2 — ДНК-полімераза приєднує нуклеотиди до 3'-кінця; 5'-кінець вивільняється із подвійної спіралі; 3 — на наростаючому хвості (з 5'-кінцем) починається синтез комплементарних фрагментів з утворенням дволанцюгової структури; 4 — нуклеаза вирізає фрагменти з липкими кінцями, рівні за довжиною вихідній ДНК; 5 — завдяки спаровуванню липких 5'-кінців ДНК переходить у кільцеву форму; 6 — лігаза зашиває розрив

Життєвий цикл ряду організмів передбачає перетворення кільцевих молекул ДНК у лінійні. Таке перетворення здійснюється за особливого способу реплікації ДНК, який відомий як **сигма-тип** (від грецької букви σ). Його ще називають **синтезом по типу кільця, що котиться**, або рулона, що розмотується. Сигма-реплікація розпочинається з розриву фосфодіефірного зв'язку в одній із ниток двоспиральної кільцевої ДНК з утворенням 3'-ОН- і 5'- PO_4 -кінців. Вивільнений 3'-кінець використовується як затравка синтезу, тобто він нарощується, а матрицею слугує неушкоджене комплементарне кільце. В міру того, як 3'-кінець подовжується, 5'-кінець цього ж ланцюга відходить від кільцевої матриці, утворюючи «хвіст» кільця (рис. 4.6).

Структура, що виникає, нагадує букву σ . Шляхом багаторазового обігання хвилі синтезу навкруги кільцевої матриці, утворюється полінуклеотидний ланцюг, який утримує численні тандемно розташовані копії одного з кілець материнської ДНК. В подальшому на такій одноланцюговій молекулі може бути побудована комплементарна нитка, а за розмноження деяких вірусів, хромосома яких являє собою одноланцюгову кільцеву ДНК (фаг $\phi\text{X}174$), така побудова є зайвою. Синтез ДНК за σ -типом йде дуже швидко, чим пояснюється бурхливе розмноження багатьох вірусів і фагів. Синтезована в цих випадках полігеномна ДНК розрізається на фрагменти, кожен із яких дорівнює геномові і поміщається в капсид.

Встановлено, що спочатку дволанцюгова ДНК бактеріофагів P2, λ та інших проникає в клітину хазяїна у лінійній формі, після чого замикається в кільце, завдяки наявності комплементарних («липких») кінців. Утворена дволанцюгова кільцева молекула є так званою **реплікаційною** формою ДНК, яка може слугувати материнською молекулою за реплікації. Реплікаційні форми ДНК багатьох вірусів спочатку накопичуються в клітині шляхом тета-реплікації, а потім швидко реплікуються за сигма-типом. Сказане відноситься і до одноланцюгових кільцевих ДНК вірусів, які після проникнення в клітину спершу перетворюються в дволанцюгову кільцеву реплікаційну форму, а на більш пізніх етапах розвитку вірусів (фагів) реплікуються за σ -типом (рис. 4.7).

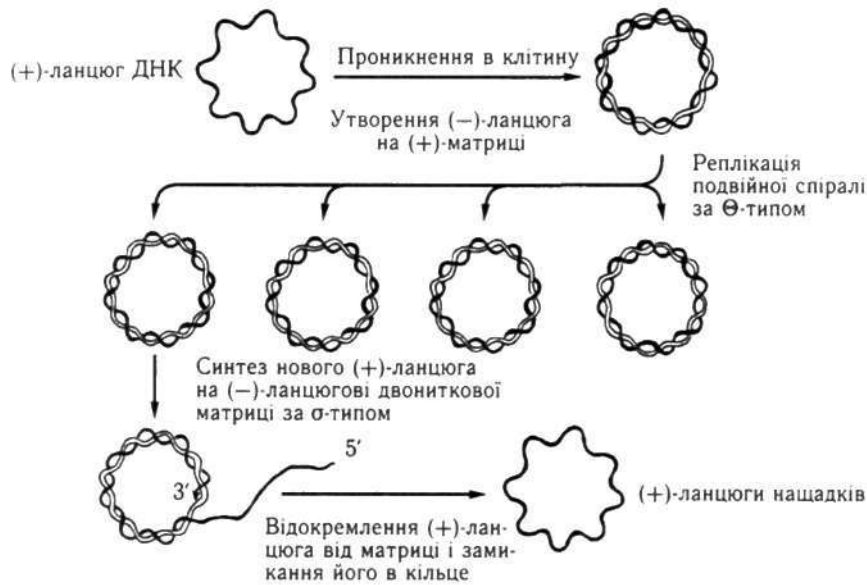


Рис. 4.7. Реплікація одноланцюгової молекули ДНК:

Кожна подвійна спіраль є матрицею для утворення численних нових (+)-ланцюгів

Сигма-тип реплікації спостерігається за кон'югації у бактерій і в оогенезі деяких еукаріотних організмів, у яких відбувається ампліфікація (помноження) генів у складі нехромосомних кільцевих ДНК. Внаслідок сигма-реплікації кільцева дволанцюгова материнська молекула ДНК перетворюється у дві дочірні, одна із яких дво-спірально кільцева, а друга — одноланцюгова лінійна.

Хоч вирази «реплікація» і «синтез ДНК» вживаються як синоніми, слід зауважити, що ототожнювати їх не можна. Термін «реплікація» або «реплікаційний синтез» означає біосинтез ДНК, внаслідок якого кожна молекула ДНК подвоюється, завдяки чому і стає можливою передача нащадкам генетичної інформації. Однак є і такий синтез, за якого лише ліквідуються виломи в певних ділянках того чи іншого ланцюга молекули ДНК. Цей локальний синтез також є матричним і теж ферментативним, проте молекула ДНК не реплікується (не подвоюється). **Нереплікаційний синтез** властивий процесам репарації — вилученню і заміні ушкоджених ділянок ДНК. Тому його називають **репараційним біосинтезом**.

Невеликі протяжності нуклеотидів на кінцях реплікованої молекули можуть добудовуватись без наявності матриці так званими **термінальними нуклеотидтрансферазами**. Загальний об'єм такого синтезу незначний, проте є інформація, що він дуже важливий для збереження розмірів теломерних ділянок ДНК за поділу хромосомом.

4.2. Білки реплікації, їх генна детермінація

Основні закономірності реплікації ДНК і конкретна участь у цьому процесі білкових факторів у загальних рисах з'ясована в дослідях на кишковій паличці. Функцію найважливіших білків, що причетні до реплікації у *E. coli*, а також відповідні генні локуси наведено в табл. 4.1.

Для початку (запуску) акту реплікації дуже важлива функція білків, що розпізнають специфічні послідовності нуклеотидів у сайті *oriC*, з якого розпочинається реплікація ДНК кишкової палички. Першим до локусу *oriC* приєднується білок-ініціатор DnaA, а потім білки — DnaC, DnaB, DnaG, DnaT та інші, що разом утворюють **праймосоми** — комплекс білків, із яких найважливішими є ферменти **хелікази** (DnaB) і **праймази** (DnaG). Гідролізуючи АТР, праймосома рухається по матриці для синтезу відстаючого ланцюга ДНК у напрямку 5' → 3'. При цьому материнська молекула ДНК розплітається, а позаду праймосоми на відстаючому ланцюгу залишаються невеликі (до 10 нуклеотидів) затравки РНК (**праймери**). Є підстави вважати, що в склад праймосоми входять і інші білки, які ще мало вивчені і генні локуси яких не з'ясовані.

Розплітання комплементарних ланцюгів материнської молекули ДНК досягається сумісною дією вже згаданої **хелікази В**, що входить до складу праймосоми, і допоміжною **гер-хеліказою**. Остання

Таблиця 41

Найважливіші білки реплікації, генні локуси та функції

Білок	Локуси	Функція
DnaA РНКаза H	<i>dnaA</i> <i>rnh</i>	Ініціація реплікації Участь в ініціації, забезпечення її вибірковості
Топоізомераза I ДНК-гіраза (топоізомераза II)	<i>topA</i> <i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	Ініціація акту реплікації і усунення топологічних утруднень за реплікації кільцевих ДНК
Хеліказа B DnaC Праймаза DnaT Інші білки	<i>dnaB</i> <i>dnaC</i> <i>dnaG</i> <i>dnaT</i> Інші локуси	Розплітання дволанцюгової спіралі ДНК і синтез праймерів на відстаючому ланцюгу
Rep (хеліказа)	<i>rep</i>	Розплітання подвійної спіралі
SSB	<i>ssb</i>	Зв'язування і захист одноланцюгової ДНК
ДНК-полімераза III, субоднини α β δ γ ϵ θ τ	<i>dnaE</i> <i>dnaN</i> <i>dnaZ</i> <i>dnaX</i> ? <i>dnaθ</i> ?	Елонгація ланцюгів ДНК, основний фермент реплікації
ДНК-полімераза I	<i>pol A</i>	Вилучення РНК-затравок (праймерів), за- будова виломів у відстаючому ланцюгу
ДНК-лігаза	<i>lig</i>	З'єднання фрагментів Оказаки фосфодіеф- ним зв'язком

рухається по ДНК разом з праймосомою, але по іншому (лідуючому) ланцюгу материнської молекули. Одноланцюгові ДНК, що утворюються після розходження комплементарних ланцюгів материнської молекули, зв'язуються білками, стабілізуються останніми і захищаються від нуклеаз. Білок SSB, що зв'язується з одноланцюговою ДНК, являє собою тетрамер з м. м. 74 000 Да. Приєднання однієї молекули цього білка до ДНК полегшує приєднання наступної, тому вже розпочата реакція швидко розповсюджується на всю одноланцюгову ДНК. Слід відзначити, що цей білок не є розплітаючим, — він лише стабілізує одноланцюгову ДНК.

ДНК-топоізомерази

Пізнання ініціаторними білками оріджина і розплітання ДНК хеліказами забезпечується попередньою топологічною перебудовою ДНК. Вважається, що, незалежно від походження, ДНК поводить себе як замкнута структура, що втратила вільні кінці. Встановлення цього факту з усією серйозністю загострило проблему топологічних перебудов молекули ДНК за реплікації та інших генетичних процесів.

Сам по собі рух реплікаційної вилки лише збільшує позитивну суперспіралізацію попереду неї і робить подальше поширення реплікаційної вилки неможливим. Проблема може бути вирішена шляхом тимчасового одноланцюгового розтинку. Наявність внутрішнього вільного кінця дає можливість розрізаному ланцюгові прокручуватись навкруги інтактного ланцюга, за рахунок чого напруга в молекулі спадає. Таке розрізання і зшивання однієї з ниток ДНК може повторюватися під час просування реплікаційної вилки. Всі реакції здійснюються ферментами топоізомеразами, які здатні змінювати ступінь надспіралізації замкнутої материнської молекули ДНК, полегшуючи її подальше розплітання.

Дволанцюгова ДНК може закручуватись навколо своєї осі у просторі в тому ж напрямку, в якому закручена сама подвійна спіраль (**позитивна надспіралізація**), або в протилежному напрямку (**негативна надспіралізація**). Для таких суперспіралізованих молекул введено поняття «число зачеплень». Це число визначає, скільки разів два ланцюги замкнутої молекули перехрещуються у просторі. Однакові молекули, які відрізняються тільки числом зачеплень, називаються **топологічними ізомерами**. Останні можуть перетворюватись із одного в інший за допомогою ДНК-топоізомераз.

Найбільш повно охарактеризована **топоізомераза I** із *E. coli* (локус *topA*). Цей фермент ефективно релаксує (розслаблює) ДНК, яка має певний ступінь негативної надспіралізації (перекрути кільцевої молекули вліво). На позитивно надспіралізовану молекулу (перекрути вправо) топоізомераза I не діє. Фермент здатний тимчасово розрізати один ланцюг ДНК, завдяки чому утворюються нові зачеплення типу катенанів та інші.

Еукаріотні топоізомерази типу I мають схожі властивості, однак, в протилежність аналогічним ферментам *E. coli*, вони можуть релаксувати як негативні, так і позитивні суперспіралі.

Топоізомерази типу II, знайдені як у прокаріотів, так і у еукаріотів, здатні утворювати наскрізний розріз дволанцюгових молекул і розслабляти як негативні, так і позитивні суперспіралі. На роботу

цього ферменту витрачається енергія АТР. Топоізомераза II кишкової палички, крім зазначеного, може збільшувати негативну надспіралізацію релаксованих кільцевих молекул, тому її ще називають ДНК-гіразою. Активна ДНК-гіраза — це тетрамер, що складається із двох субодиниць А (локус *gyrA*) і двох субодиниць В (локус *gyrB*). Топоізомеразна активність властива цьому ферментові в його димерній формі, в якій субодиниця А поєднана з фрагментом субодиниці В.

У бактерій топоізомерази грають важливу роль не тільки за ініціації та продовження реплікації, але й на заключних стадіях цього процесу. ДНК-гіраза може роз'єднувати зачеплені дволанцюгові кільця (катенани), що часто утворюються за реплікації ДНК бактерій (рис. 4.8). Слід відзначити, що топоізомерази необхідні також для розходження лінійних дочірніх молекул еукаріотних ДНК, які

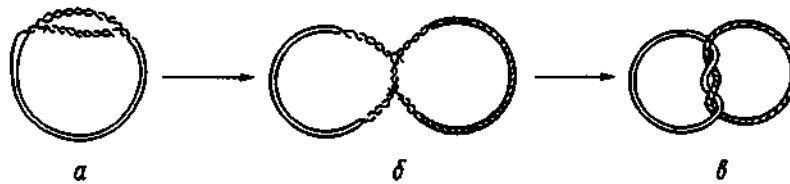


Рис. 4.8 Утворення катенанів за реплікації кільцевих ДНК:

а — реплікація кільцевої ковалентно-замкнутої молекули, б — заключна стадія реплікації, в — реплікація закінчена з утворенням катенана

після реплікації часто виявляються заплутаними і уподібнюються катенанам бактеріальних ДНК.

ДНК-полімерази

У кишкової палички знайдено три ДНК-полімерази. ДНК-полімераза I є в основному ферментом репарації, а не реплікації. В напівконсервативній реплікації кільцевої хромосоми вона виконує лише допоміжну роль. Разом з тим у деяких випадках (наприклад, за реплікації плазмиди ColE1) ця ДНК-полімераза вкрай необхідна для початку реплікації, утворення D-петлі та розщеплення РНК-затравок.

ДНК-полімераза I (локус *polA*) має м. м. 109 кДа. Це фактично декілька ферментативних активностей, властивих одному поліпептидному ланцюгу. Крім полімеразної активності, фермент має 5'-екзонуклеазну і 3'-екзонуклеазну активності. Останні можуть бути використані для вилучення помилково включених у ДНК нуклеотидів.

ДНК-полімераза II (локус *polB*) — це один поліпептид з м. м. біля 140 кДа, має полімеразну і 3'-екзонуклеазну активності. Краще працює на дволанцюговій ДНК з виломами довжиною в декілька десятків нуклеотидів в одному із ланцюгів. На цій підставі можна вважати, що це фермент репарації.

ДНК-полімераза III грає головну роль у реплікації ДНК кишкової палички. Складається із багатьох субодиниць і має сумарно м. м. біля 500 кДа. Для утворення комплексу ДНК-полімерази III з матрицею і затравкою необхідна енергія АТР. За оптимальних умов швидкість синтезу ДНК цим ферментом складає біля 1000 нуклеотидів у секунду. ДНК-полімераза III здійснює елонгацію в напрямку 5' → 3'; крім того, виявляє 3' → 5'- і 5' → 3'-екзонуклеазну активність.

В еукаріотних клітинах знайдено п'ять ДНК-полімераз (α , β , γ , δ , ϵ), функція остаточно з'ясована для трьох — α , β , γ . **ДНК-полімераза α** (м. м. — 500 кДа) є єдиним ферментом, рівень активності якого зростає в S-фазу клітинного циклу. Антибіотик афідиколін пригнічує реплікацію еукаріотної ДНК *in vivo*; єдиним ферментом, чутливим до цього антибіотика, є ДНК-полімераза α . Цей фермент вважають ядерною ДНК-полімеразою. Він складається із декількох субодиниць, одна із яких виконує функцію ДНК-праймази. Існує думка, що ДНК-полімераза α синтезує відстаючий ланцюг ДНК, а синтез лідируючого ланцюга забезпечує δ -полімераза.

ДНК-полімераза β — це поліпептид (м. м. — 40 кДа), що добувають короткі виломи в одному із ланцюгів двоспіральної молекули. Основна роль цієї полімерази полягає в репарації ДНК.

ДНК-полімераза γ складається з декількох субодиниць (м. м. — 50 кДа). Цей фермент здійснює синтез ДНК мітохондрій. Схожий фермент виявлено у хлоропластах рослин.

ДНК-полімерази еукаріотів виявляють, як правило, лише ДНК-синтезну активність, в той час як більшість бактеріальних ферментів може виконувати також функції екзонуклеаз. Однак відомо, що деякі еукаріотні ДНК-полімерази є одночасно 3'-екзонуклеазами.

Оскільки за реплікації на одному із ланцюгів материнської молекули утворюються комплементарні фрагменти Оказакі, то для утворення цілісного комплементарного ланцюга ДНК необхідно з'єднати ці фрагменти фосфодіефірними зв'язками. Цю функцію в клітинах здійснюють ферменти **ДНК-лігази**, які знайдено як у прокаріотів, так і у еукаріотів. Найбільш повно вивчені лігази кишкової палички і фага T4. Вони можуть відновлювати в ДНК фосфодіефірні зв'язки між сусідніми нуклеотидами за наявності вільних 3'-ОН і 5'-фосфатних кінців. Кофактором лігази *E. coli* слугує NAD, а лігаз вірусів та еукаріотів — АТР.

На тих чи інших етапах реплікаційного чи репараційного синтезу ДНК виникає необхідність в дії нуклеаз — ферментів, що гідролізують полінуклеотидний ланцюг або з середини (ендонуклеази), або з його 5'- чи 3'-кінця (5'- і 3'-екзонуклеази). Крім того, що багатьом ДНК-полімеразам властива та чи інша екзонуклеазна активність, у клітині є великий вибір різних нуклеаз, що можуть спільно діяти з ДНК-полімеразами за реплікативного або репаративного біосинтезу.

Як приклад можна навести РНКазу H — фермент, що у *E. coli* вибірково гідролізує РНК у складі гібридних дуплексів з ДНК. Дія цього ферменту направлена проти гібридних ДНК-РНК-ділянок, які можуть випадково утворитися на ДНК і слугувати помилковими затравками для початку синтезу ДНК. Слід зазначити, що така дія РНКазу H кооперується з дією топоізомерази I — ферменту, який підтримує нормальний ступінь спіралізації ДНК і тим проти-діє утворенню помилкових праймерів (затравок). У мутантів *E. coli* по гену РНКазу H (локус *rnh*) або топоізомерази I (локус *topA*) ініціація реплікації може здійснюватися не тільки на оріджині, але й в інших місцях материнської молекули. Отже, РНКазу H і топоізомераза I забезпечують вибірковість ініціації реплікації у кишкової палички, про що переконливо свідчать досліди на хромосомі і плазміді ColE1 цієї бактерії.

4.3. Механізми реплікації ДНК у кишкової палички

Хромосомний оріджин *oriC* пізнається специфічним білком-ініціатором DnaA. Молекули цього білка зв'язуються з певними ділянками оріджина, якщо він завдяки топоізомеразам надспіралізований. Участь ДНК-гірази в ініціації реплікації не тільки в тому, щоб полегшити білку DnaA задачу розплітання оріджина, але й в тому, щоб перевірити цілісність ланцюгів ДНК — майбутніх матриць для синтезу. Комплекс [DnaA — розплетений *oriC*] приєднує до себе шість молекул білка DnaC і шість молекул білка DnaB (хелікази). Хеліказа в свою чергу зв'язана з праймазою або білком DnaG, утворюючи праймосому. Крім названих білків, до складу бактеріальної праймосоми входять і інші (*n*, *n'*, *n''*, *i*). Білок *n'* є ДНК-залежною АТР-азою і може рухати праймосому в напрямку 5' → 3' по одноланцюговій ДНК, що покрита SSB-білком.

Гідролізуючи АТР, праймосома рухається по матриці для синтезу відстаючого ланцюга дочірньої ДНК, розплітає перед собою под-

війну спіраль материнської молекули, а за собою залишає невеликі РНК-праймери.

Допоміжну роль виконує хеліказа Rep (продукт гена *rep*), яка рухається в тому ж напрямку, що й праймосома, і приєднана до матриці синтезу ведучого ланцюга. Таким чином, хелікази DnaB і Rep просувуються по різних ланцюгах материнської молекули ДНК, але рухаються в одну сторону — в сторону розкриття реплікативної вилки (рис. 4.9).



Рис. 4.9. Схема синтезу ДНК в реплікаційній вилці

Холоферменти ДНК-полімерази III синтезують комплементарні ланцюги ДНК, приєднуючись до матриць після проходження хеліказ. Лідируючий ланцюг, що синтезується на одній із матриць, нарощується безперервно у просторі по мірі просування реплікативної вилки.

Зовсім по-іншому синтезується відстаючий ланцюг. 3'-Кінці РНК-праймерів, що утворились раніше (за проходження праймосоми), нарощуються ДНК-полімеразою III до тих пір, поки фермент не досягне сусідньої РНК-затравки. Так утворюються фрагменти Оказакі, які далі подовжуються вже іншим ферментом — ДНК-полімеразою I. Цей фермент здатний розчистити перед собою дорогу для такого синтезу, бо за рахунок своєї 5'-екзонуклеазної активнос-

ті здійснює гідроліз РНК-затравки попереднього фрагмента. Після дії ДНК-полімерази I між двома сусідніми фрагментами ДНК залишається лише одноланцюговий розрив, який зашиває ДНК-лігаза.

Отже, в реплікаційній вилці одночасно функціонує досить велика група білків, яка здійснює складний, чітко упорядкований і енергоємкий процес реплікації. Цей комплекс білків, який рухається по материнській ДНК, одночасно синтезуючи обидва нових ланцюги, називають **реплісомою**. Остання із ДНК-матриці для синтезу відстаючого ланцюга утворює петлі, завдяки яким РНК-праймери і фрагменти Оказакі синтезуються в напрямку $5' \rightarrow 3'$.

Зазначену схему біосинтезу бактеріальної ДНК підтверджують спостереження за фенотипом мутантів, у яких порушена реплікація. Термозалежні (*ts*) мутації в локусах *dnaE*, *dnaB*, *dnaG*, *dnaX*, *dnaN* та інші зразу ж припиняють реплікацію за переносу бактерій на непермісивне середовище. Мутації в генах *polA* і *lig* приводять до накопичення в клітинах великої кількості нез'єднаних фрагментів Оказакі. Мутації в генах *dnaA*, *topA* і *rnh* впливають на ініціацію циклу реплікації.

4.4. Особливості реплікації ДНК еукаріотів

Молекули ДНК еукаріотів значно довші, ніж у бактерій, а швидкість реплікації у еукаріотів значно менша (десятки, а не сотні нуклеотидів за секунду). Ситуація виправляється тим, що синтез ДНК у еукаріотів розпочинається одночасно в багатьох точках хромосоми, тобто є полірепліконним. Середній розмір одного еукаріотного реплікону — біля 100 000 п. н. Про те, що у еукаріотів синтез ДНК теж розпочинається в спеціальних місцях — оріджинах, свідчать досліді на дріжджах. Оріджини у *Sacch. cerevisiae* названі ARS (від англ. *autonomously replicating sequence* — послідовності, що реплікуються автономно). Вони відрізняються порядком розташування нуклеотидів, але мають декілька ділянок гомології для приєднання білків, що необхідні для ініціації та регуляції реплікації. У вищих еукаріотів різні реплікони активуються неодноразово: одні — на початку S-фази, інші — пізніше, а треті — в кінці. Важливо те, що один і той же реплікон може активуватися лише один раз на один клітинний поділ. Однак інколи така заборона на повторну ініціацію реплікації все ж порушується. Це призводить до **ампліфікації** (появи численних копій) тих чи інших генів хромосоми еукаріотного організму. Щодо бактерій, то у них повторна ініціа-

ація циклу реплікації часто буває ще до закінчення попереднього циклу за умови високої швидкості росту клітин. Така «дихотомічна» реплікація (рис. 4.10) за сприятливих умов значно зменшує час генерації бактерій.

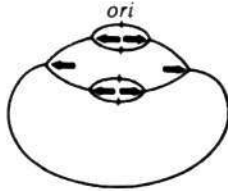


Рис. 4.10. Схема дихотомічної реплікації у бактерій

Ще одна особливість реплікації еукаріотних хромосом полягає в тому, що їх ДНК лінійна, і ДНК-полімерази не можуть повністю зкопіювати матрицю з огляду на те, що РНК-праймери можуть утворюватися на самісіньких кінцях матричних ланцюгів, де робота ДНК-полімерази неможлива. За цих умов з кожним циклом реплікації довжина еукаріотної хромосоми мала б скорочуватися за рахунок теломерної області. Однак насправді розміри теломер хромосом

дуже стабільні, а інколи після подвоєння хромосом навіть збільшуються.

В дослідях на нижчих еукаріотах — інфузоріях і дріжджах — було з'ясовано, що на кінцях їх хромосом є проста послідовність, яка багаторазово повторюється і врешті ковалентно замикається в петлю, так що вільних 5'- і 3'-кінців хромосома може й не мати. У тетрагімени ця послідовність виглядає як TTGGGG-3'/AACCCC-5', а у хребетних, включаючи й людину, — як TTAGGG-3'/AATCCC-5'. Саме ця послідовність за поділу клітин ампліфікується з участю ферменту **теломерази**. Теломераза безматрично нарощує 3'-кінець теломерної ДНК завдяки наявності у власному складі короткої РНК. Так, наприклад, теломераза тетрагімени утримує РНК довжиною 159 нуклеотидів, яка містить С-багату послідовність СААСССАА. Остання використовується як матриця за нарощування 3'-кінця теломерної ДНК. С-багатий (5') кінець цієї молекули добудовується з участю праймази і ДНК-полімерази на матриці раніше подовженого теломеразою 3'-кінця.

Зазначений механізм відновлення теломер за поділу еукаріотних клітин не можна вважати універсальним. Стало відомо, що нормальні соматичні клітини ссавців не виявляють теломеразної активності, в той час як зародкові та злоякісні клітини містять активну теломеразу.

ГЕНЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ, ЩО ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ ВІДНОСНУ СТАБІЛЬНІСТЬ ГЕНОМУ

Для того, щоб клітина могла передати своїм нащадкам генетичну інформацію в незмінному стані, вона мусить мати надійні механізми захисту власної ДНК від чужої інформації і від можливих ушкоджень. Невластива даній клітині генетична інформація може вноситись зовні у складі вірусів та інших інфекційних агентів, деякі з яких можуть включати свій генетичний матеріал у хромосому клітини-хазяїна. В процесі еволюції клітини надбали механізми захисту від чужої генетичної інформації; прикладом таких механізмів можуть бути **системи модифікації і рестрикції** у бактерій.

Молекули геномної ДНК у клітині можуть підлягати також різним ушкодженням. Відомо, наприклад, що ДНК кожної клітини організму людини втрачає за добу біля 5000 пуринових основ внаслідок теплового розриву N-глікозидних зв'язків між пурином і дезоксирибозою (**процес апуринізації**). При цьому утворюються **апуринові сайти** (AP-сайти). Крім того, щодобово дезамінується біля 100 цитозинів, кожен з яких перетворюється в урацил.

Під впливом реакційноздатних метаболітів у процесі реплікації може порушуватися правильне парування нуклеотидів. Останнє трапляється спонтанно, оскільки в нормальній ДНК на короткий час із частотою 10^{-4} — 10^{-5} виникають рідкісні таутомерні форми всіх чотирьох її основ. Ці таутомерні форми здатні до утворення помилкових пар. Цитозин в іміноформі спаровується з аденіном замість гуаніну, аденін в іміноформі з'єднується з цитозином, а не з тиміном і т. ін. Такі зміни в ДНК приводять врешті або до заміни нуклеотидних пар, або до їх вилучення (делецій).

Таким чином, за відсутності систем захисту під впливом лише теплової енергії і реакційноздатних метаболітів у ДНК клітини могли б траплятися тисячі випадкових змін. Частота їх значно зростає за дії на організм ультрафіолетового випромінювання, іонізуючої радіації, численних хімічних речовин тощо.

Причиною структурних порушень ДНК, що можуть призводити до спонтанних мутацій, є помилки в роботі ДНК-полімераз. Теоре-

тично частота помилкового включення нуклеотидів у ДНК за реплікації може складати 10^{-2} , але в дійсності спонтанні мутації виникають досить рідко (10^{-6} — 10^{-10}).

В геномі клітин зародкового шляху ссавців, який складається в середньому із $3 \cdot 10^9$ пар основ, за рік трапляється лише 15 замін цих основ. Така висока стабільність структури генетичного матеріалу забезпечується як точністю механізмів реплікації ДНК, так і ефективними системами репарації, які розпізнають ушкодження в ДНК і виправляють їх.

Таким чином, до систем захисту геномної ДНК клітини відносяться принаймні такі:

1) системи захисту від стороннього генетичного матеріалу, прикладом яких можуть бути **модифікація і рестрикція ДНК** у бактерій;

2) системи виправлення помилок, що включають коректорську функцію ДНК-полімераза та інших ферментів, які поправляють нуклеотидний склад ДНК по ходу реплікації (**реплікаційна репарація**);

3) системи репарації, що усувають ушкодження в уже синтезованих молекулах ДНК (**постреплікаційна репарація**).

5.1. Системи модифікації і рестрикції ДНК у бактерій

Проникнення чужої генетичної інформації у клітину може виявитися шкідливим і навіть згубним, особливо якщо мова йде про проникнення вірусів або фагів. Щоб успішно боротися з чужою ДНК, клітина мусить добре відрізнити свою ДНК від сторонньої. Бактерії досягають цього, позначаючи свою ДНК з допомогою спеціальних ферментів — **метилаз**, які модифікують аденін і цитозин в певній, характерній для даного виду, послідовності нуклеотидів. Дією цих метилаз можна в певній мірі пояснити наявність у ДНК із різних джерел мінорних азотистих основ, наприклад, 5-метилцитозину, 6-метиламінопурину та ін. Ці незвичайні основи безпосередньо не включаються в ДНК під час реплікації, вони виникають у складі вже синтезованих полінуклеотидів внаслідок ферментативної модифікації їх основ.

Інші спеціальні ферменти, ендонуклеази рестрикції (**рестриктази**), розпізнають у ДНК ту чи іншу послідовність і розрізають її, якщо вона належить чужій ДНК, яка шойно попала в клітину і не метильована ферментами певним способом.

Зазначені дві ферментативні активності — метилазна і рестриктазна — можуть належати різним білкам або одному і тому ж білку-ферменту. І в тому, і в іншому випадку вони утворюють поєднані системи захисту бактеріальних клітин від чужої генетичної інформації — системи модифікації-рестрикції або **MR-системи** клітин.

Послідовності нуклеотидів, що розпізнаються ферментами різних MR-систем і слугують місцями приєднання ферментів до ДНК (**сайти пізнання**), можуть залежно від типу MR-систем співпадати або не співпадати з послідовностями, що розтинаються рестриктазами (**сайти рестрикції** або сайти-мішені).

Системи модифікації і рестрикції були відкриті завдяки їх дії на інфікуючу фагову ДНК. Фагова ДНК може успішно інфікувати бактерії одного і того ж штаму, оскільки всі ці клітини мають однаковий тип модифікації. Однак за переносу фагової ДНК від одного штаму бактерії до іншого вона атакується рестрикційними ендонуклеазами нового штаму. Таким чином, фаг обмежений (*restricted*) певним бактеріальним штамом, звідки і походить термін «рестрикція». Слід зазначити, що рестрикція не завжди обов'язкова. Деякі інфікуючі фаги уникають її, що обумовлено або мутаціями в сайтах-мішенях, або неточністю роботи MR-системи клітини, що інфікована. В цьому випадку фаг надбає тип модифікації нового штаму-хазяїна. В подальшому з'ясувалося, що один і той же штам може здійснювати декілька типів модифікації і рестрикції. Відомо понад 400 рестриктаз різного походження, що здатні розпізнати біля 100 специфічних сайтів-мішеней; отже ферменти, отримані із різних джерел (**ізошизомерази**), можуть розрізати одну і ту ж послідовність.

Ферменти рестрикції і відповідно MR-системи поділяють на три типи.

Рестриктази типу I відомі, наприклад, у штамів *E. coli* B і K і відповідно називаються рестриктазами Eco B і Eco K. Всі ферменти I типу являють собою комплекси, що складаються із трьох типів субодиниць: R-субодиниць, що відповідають за рестрикцію, M-субодиниць, що здійснюють метилування, і S-субодиниць, відповідальних за розпізнавання сайту рестрикції і за специфічність ферменту. Отже, в MR-системах I типу і рестрикцію, і модифікацію здійснює один фермент. Зазначені субодиниці цього ферменту кодуються відповідно генами *hsdR*, *hsdM* і *hsdS*. Після того, як певний сайт пізнається S-субодиницею, фермент зв'язується з ДНК, а потім здійснюється або її рестрикція, або модифікація; активності субодиниць R і M взаємно виключають одна одну. Рестриктаза типу I, приєднуючись до одного сайту чужої ДНК, здійснює її гідроліз в іншому сайті на відстані більш ніж 1000 пар основ від сайту

пізнання. Якщо ж це власна ДНК бактерії, то сайти-мішені в ній або повністю метильовані, або напівметильовані (наприклад, після реплікації або репарації, коли метильованим може бути лише один із двох ланцюгів молекули). Напівметильовані сайти метилуються *M*-субодиницями, які використовують *S*-аденозилметіонін за донора метильної групи. *S*-аденозилметіонін потрібен також і для рестрикції, але лише як алостеричний ефектор. Оскільки розрізання ДНК здійснюється на значній відстані від сайту пізнання, то шлком можливо, що ДНК утворює петлю або «протягується» через структуру ендонуклеази, для чого необхідна енергія.

Бактерії, мутантні по генах *hsd*, виявляють ті чи інші порушення функцій *MR*-систем. Мутанти *hsdR*⁻ мають фенотип γ - π ⁺, вони не здатні до рестрикції ДНК, але можуть її модифікувати. Мутація в гені *hsdS* призводить до того, що фермент не може пізнати свій сайт, і тому такі мутанти мають фенотип γ - π ⁻, тобто не модифікують і не рестрикують ДНК. Мутація гена *hsdM* (дефект метилази) теж запобігає як рестрикції, так і модифікації, що свідчить про участь *M*-субодиниці в функціонуванні субодиниці *R*. Мутанти за фенотипом γ ⁺ π ⁻ нежиттєздатні, бо наявність рестрикційної активності за відсутності метилази може супроводжуватись деградацією власної немодифікованої ДНК бактерії.

До рестриктаз типу II відносяться дуже розповсюджені ферменти, що здійснюють розріз молекули ДНК безпосередньо в сайті пізнання (приклади — рестриктази *Eco* RI, *Bst* I, *Hind* III, *Alu* I, *Pst* I та ін.). Ці ферменти (на відміну від типу I) відповідають тільки за акт рестрикції, метилування того ж сайту здійснює інший фермент — метилаза. Рестриктаза *Eco* RI являє собою димер із двох ідентичних субодиниць. Більшість рестриктаз типу II розрізають ДНК у неметильованих сайтах-мішенях, утворюючи або тупі, або «липкі» одноланцюгові кінці фрагментів ДНК. Сайт рестрикції рестриктази II, як правило, симетричний, нуклеотидні послідовності обох ланцюгів ДНК в одному і тому ж напрямку (наприклад, від 5'- до 3'-кінця) читаються однаково, тобто утворюють паліндром з центральною симетрією.

Завдяки здібності розрізати ланцюги ДНК у місцях з дуже специфічними нуклеотидними послідовностями, які можуть зустрічатися лише певне число раз по всій довжині молекули ДНК (табл. 5.1), рестриктази II широко використовуються для визначення послідовностей ДНК. Їх застосування багато чим нагадує використання трипсину з метою розщеплення поліпептидів на менші за розміром фрагменти.

Прикладом застосування рестриктаз II типу може бути вивчення нуклеотидної послідовності ДНК вірусу SV40. Цей вірус

Таблиця 5.1

Послідовності, що розпізнаються деякими рестриктазами типу II

Мікроорганізми	Фермент	Сайт пізнання	Число сайтів мішеней у вірусному геномі		
			SV40	λ	Аденовірус 2
<i>Escherichia coli</i> KY 13	Eco RI	5' G [*] AA [*] T T C 3' C T T A [*] A [*] G	1	5	5
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind II	5' GT Pu [*] PuA [*] C 3' CA [*] Pu [*] PyT G	7	34	> 20
	Hind III	5' A [*] AG [*] C T T 3' T T C G A A [*]	6	6	11
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	5 G T T [*] A A C 3' C A A T T G	5	11	6
	Hpa II	5 C [*] C [*] G G 3' G G C C	1	> 50	> 50
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	5 G G C C 3' C C G G	18	> 50	> 50

Примітка Зірочками позначено основи, які можуть бути метильовані ферментами модифікації. Малюми стрілками показано місця розрізів за рестрикції. Довга вертикальна стрілка — вісь симетрії. Pu — пурин, Py — піримідин. Розміри геномів SV40 — 5224 п. н., λ — 48 502 п. н., аденовірус 2 — 38 200 п. н.

мавп. здатний включитися в геном клітини-хазяїна і перетворювати її в пухлинну, містить кільцеву дволанцюгову ДНК. Як видно з табл. 5.1, рестриктази різного походження розрізають ДНК вірусу на різну кількість фрагментів, що взаємно перекриваються. Аналіз продуктів часткового гідролізу і фрагментів, що перекриваються, дав можливість з'ясувати місцеположення всіх фрагментів на кільцевій карті.

Шляхом з'ясування нуклеотидних послідовностей в окремих фрагментах вдалося розшифрувати первинні структури ДНК багатьох вірусів. Аналогічні методичні підходи використовуються також за вивчення структури ДНК мітохондрій, пластид, а також окремих фрагментів хромосомної ДНК.

Рестриктази III за своїми властивостями є проміжними між ферментами I і II типів (табл. 5.2). Подібно до ферментів I типу, фермент III типу діє як рестриктаза, і як метилаза. Рестриктази III розривають ланцюг ДНК не в сайті пізнання, але, в протилежність рестриктазам I типу, роблять це неподалік від нього.

Таблиця 5.2

Порівняльна характеристика властивостей рестриктаз різних типів

Критерій	Тип II	Тип III	Тип I
Структура білка	Окремо ендонуклеаза і метилаза	Біфункціональний фермент із двох типів субодиниць	Біфункціональний фермент із трьох типів субодиниць
Сайт пізнання	Коротка послідовність (4—6 пар основ), часто паліндромна	Асиметрична послідовність (5—7 пар основ)	Двостороння і асиметрична послідовність
Сайт розрізання	Той самий, що і сайт пізнання або поруч з ним	Віддалений від сайту пізнання на 24—26 пар основ	Неспецифічний, віддалений на 1000 пар основ або й більше від сайту пізнання
Рестрикція і метилювання	Окремі реакції	Одночасні	Взаємно виключаючі
Чи потрібна АТР для рестрикції	Ні	Так	Так

В еукаріотних клітинах метилювання ДНК не пов'язане з процесами рестрикції і виконує іншу роль — забезпечує різний функціональний стан генів. Отже, хоч у еукаріотів є метильована ДНК і принаймні у деяких — сайт-специфічні ендонуклеази, вони не утворюють єдиної захисної системи. Захист еукаріотних клітин від вірусів базується на інших механізмах.

5.2. Системи виправлення помилок реплікації

Усунення нуклеотидів, помилково включених у наростаючий ланцюг ДНК *E. coli* під час реплікації, в першу чергу обумовлюється **коректорськими властивостями ДНК-полімераз I і III**. Ці ферменти здійснюють контроль загального розміру нової пари основ, що виключає можливість утворення некомплементарних пар. Завдяки такому контролю частота виникнення помилок зменшується до 10^{-4} — 10^{-5} . Повторна перевірка комплементарності основ здійснюється в центрі зв'язування кінцевої ділянки затравки.

Вилучення помилкових пар, утворюваних нечастими таутомерними формами основ, обумовлено тим, що ДНК-полімераза не може використовувати як матрицю молекулу ДНК з затравкою, у якої 3'-кінець неспарований. ДНК-полімераза, приєднавшись до неспарованого кінця затравки, виявляє 3'-5'-екзонуклеазну активність і відщеплює неспаровані нуклеотиди до тих пір, поки у затравки не появиться спарований кінець і не утвориться активна матриця. Діючи таким способом, ДНК-полімераза усуває свої власні помилки, допущені в процесі реплікації.

ДНК-полімеразам еукаріотних клітин 3'-5'-екзонуклеазна активність невластива, однак є дані про наявність спеціальної 3'-5'-екзонуклеази, яка діє в контакті з ДНК-полімеразою α і забезпечує коректорську функцію *in vivo*.

Незважаючи на коректорські здібності ДНК-полімераз, деякі нуклеотиди в новоутвореному ланцюгу ДНК все-таки можуть виявитися помилковими. виправлення цих помилок ДНК-полімераз може здійснюватись іншими ферментами як в процесі реплікації, так і після неї. Найбільш повно система виправлення помилок реплікації з'ясована для *E. coli*.

Для нормального функціонування апарата виправлення помилок, пов'язаних з включенням неправильних нуклеотидів, необхідний механізм, що дає можливість чітко відрізнити новосинтезований ланцюг ДНК від батьківського матричного ланцюга. В іншому випадку з імовірністю $1/2$ могло б здійснюватись «виправлення» нуклеотиду в батьківському ланцюгу і закріплення потенційно мутагенної помилки, допущеної ДНК-полімеразою.

Відмінності між батьківським і дочірнім ланцюгами ДНК у *E. coli* обумовлюються метилюванням аденіну в послідовності $\begin{matrix} \text{GATC} \\ \text{CTAG} \end{matrix}$. Ця паліндромна послідовність в нормі метильована в обох ланцюгах батьківської ДНК. В процесі напівконсервативної реплікації такої молекули виникають дві дочірні ДНК, в яких один ланцюг, що належить батьківській молекулі, метильований, а новосинтезований ланцюг деякий час після виходу із реплікаційної вилки залишається неметилюваним. ДНК, що знаходиться у такому стані, називається напівметилюваною.

Слід зазначити, що метилювання новоутвореного ланцюга ДНК здійснюється ферментом, відмінним від метилаз, які входять у системи модифікації-рестрикції. Кодується цей фермент геном *dam*.

Бактерії *dam⁻*, дефектні по метилюванню аденіну в послідовності GATC, виявляють високу частоту спонтанних мутацій, що підтверджує гіпотезу про участь метилази Dam у системі виправлення помилок реплікації.

Отже, системи виправлення помилок, що діють під час реплікації або зразу ж після неї, включають декілька різних ферментативних функцій. Процес виправлення може розпочинатися з вирізання ділянки новоутвореного і ще не метильованого ланцюга, що містить некомплементарний нуклеотид, після чого вилом у вказаному ланцюгу забудовується шляхом репараційного синтезу ДНК з використанням як матриці правильної послідовності батьківського ланцюга. З'ясована участь у цьому процесі декількох генів (*mutH*, *mutL*, *mutS*, *uvrD*), структурні порушення яких стимулюють спонтанний мутагенез у *E. coli*. Для роботи цієї системи виправлення помилок необхідні АТР і дезоксирибонуклеотиди.

Виправлення помилок ДНК-полімерази може здійснюватися й іншими механізмами, наприклад, шляхом рекомбінаційної репарації.

Таким чином, низький рівень спонтанних мутацій, що спостерігаються у *E. coli* в нормі, обумовлюється коректорською функцією ДНК-полімераз I і III, яка додатково підстрахована іншими системами виправлення помилок у новоутвореному ланцюгу ДНК.

5.3. Механізми репарації ушкодженої ДНК

Крім помилок, що виникають у процесі реплікації, ДНК може нести ушкодження, що виникають спонтанно або під дією певних чинників незалежно від роботи реплікаційних ДНК-полімераз. Такі ушкодження можуть полягати в будь-яких відхиленнях від звичайної структури ДНК — від точкових уражень до більш глибоких перестроєвань. Наявність у ДНК внутрішньоланцюгових поперечно зчеплених структур або міжланцюгових зшивок може бути серйозною завадою для реплікації і транскрипції. Такі ушкодження сприяють виникненню мутацій, якщо вони не будуть усунуті до початку наступного циклу реплікації. Усунення зазначених ушкоджень в ДНК здійснюється за допомогою систем репарації, які за своєю складністю часто не поступаються реплікаційному апаратові.

Одні репараційні системи відносно специфічні у відношенні певних ушкоджень, інші реагують на будь-які відхилення в структурі ДНК.

У найбільш вивченого об'єкта — кишкової палички — відомо чимало механізмів репарації ДНК, серед яких розрізняють механізми прямої реактивації і темної репарації ДНК. До прямої реактивації відноситься світлова репарація (або фотореактивація) ДНК

та деякі інші. Темнова репарація включає ексцизійну, рекомбінаційну та ряд індукцибельних репаративних систем.

5.3.1. Пряма реактивація ушкоджених молекул ДНК

Деякі ушкодження ДНК усуваються шляхом **прямої реактивації**.

У бактерій існує спеціальний фермент **метилтрансфераза**, який переносить метильну або етильну групу з основи, що була алкілована хімічними сполуками, на один із власних цистеїнових залишків. При цьому метилтрансфераза інактивується, але в такому стані може стимулювати активність власного гена і деяких інших, що призводить до включення індукцибельної системи репарації у відповідь на дію алкілюючих сполук.

У багатьох організмів виявлена так звана **світлова репарація**, завдяки якій в умовах видимого світла (особливо 300—400 нм) розриваються ковалентні зв'язки між сусідніми піримідиновими основами, які утворюються в умовах ультрафіолетового опромінення (220—320 нм). Саме так ліквідуються найчастіше виникаючі внутрішньоланцюгові тимінові димери.

Світлова репарація тимінових димерів здійснюється фотореактивуючим ферментом або **фотоліазою**. У *E. coli* цей фермент кодується одним геном (*phr*) і являє собою поліпептид з молекулярною масою 35 кДа, який міцно зв'язаний з олігорибонуклеотидом (10—15 основ). Фотоліаза приєднується до ДНК у місці знаходження піримідинового димера і в умовах освітлення (300—600 нм) ліквідує ковалентний зв'язок між основами, що утворюють димер.

Піримідинові димери усуваються також і іншими механізмами, які відносяться до систем **темнової** репарації, оскільки вони не потребують умов освітлення. Наявність таких систем дуже важлива, бо фоторепарація може усувати до 90% ушкоджень, індукованих ультрафіолетовим опроміненням, але ніколи не буває повною.

5.3.2. Ексцизійна репарація ДНК

Якщо неможлива пряма реактивація, то працюють **механізми ексцизійної репарації**. Остання здійснюється шляхом вирізування ушкоджених ділянок ДНК і наступного забудовування утворених виломів новими нуклеотидами на матриці комплементарного неушкодженого ланцюга. Таку систему репарації іноді називають сис-

темою «вирізай і латай». Процес ексцизійної репарації складається із таких етапів:

- 1) розпізнавання ушкодження;
- 2) розрізання (інцизії) спотвореного ланцюга поблизу ушкодження;
- 3) вилучення (ексцизії) ушкодженої ділянки відповідного ланцюга;
- 4) репараційного синтезу ДНК на місці вилому;
- 5) відновлення неперервності репарованого ланцюга шляхом лігандної реакції.

Ферментативна система ексцизійної репарації добре вивчена у *E. coli*. Виявлені та картовані відповідні гени, мутації в яких порушують репарацію і стимулюють мутаційний процес.

Репарація таких ушкоджень, які істотно порушують структуру ДНК, наприклад тимінових димерів, здійснюється за участю спеціального ферменту — ендонуклеази UvrABC або **УФ-ендонуклеази** (гени *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*). Ця ендонуклеаза розпізнає тиміновий димер (або інші спотворення ланцюга ДНК) і здійснює два одноланцюгові розтини ДНК з 5'- і 3'-боків від ушкодження. Відстань між цими двома інцизіями — 12—13 нуклеотидів. В інших випадках ексцизія дефектних фрагментів здійснюється з допомогою так званої **ексцизійної нуклеази** або **ексцизії**.

Внаслідок ексцизії і наступної деградації ушкодженого фрагмента утворюються одноланцюгові виломи або прогалини, які забудовуються **ДНК-полімеразою I** (рис. 5.1). Однак у мутантів *polA*⁻, де-



Рис. 5.1. Основні шляхи ексцизійної репарації:

а — за незначних ушкоджень ДНК (наявність аномальних основ); б — за більш істотних ушкоджень (наявність тимінових димерів та ін.)

фектних по ДНК-полімеразі I, все ж спостерігається залишковий репараційний синтез, який пояснюють активністю **ДНК-полімерази II**.

Останній етап ексцизійної репарації — відновлення безперервності репарованого ланцюга — забезпечує фермент **ДНК-лігаза**, яку у *E. coli* кодує ген *lig*. Температурночутливі мутанти по цьому гену не здатні завершити ексцизійну репарацію в непермісивних умовах і накопичують фрагменти Оказакі за реплікації ДНК.

Інший тип ексцизійної репарації діє у випадку менш істотних порушень структури ДНК — наявності в ній аномальних основ. З'ясувалося, що практично на кожен аномальну основу, яка може виникнути в ДНК, існує своя **ДНК-N-глікозилаза** — фермент, що розпізнає пошкоджену основу (наприклад, формамідопіримідин) і вирізає її, розриваючи N-глікозидний зв'язок з цукрофосфатним остовом ланцюга ДНК.

У кишкової палички є біля 20 різних ДНК-N-глікозилаз. Роль цих ферментів у репарації підтверджена дослідями на мутантах: мутанти по гену *ung*, який кодує урацил-ДНК-глікозилазу, виявляють підвищений рівень спонтанного мутагенезу, а мутації в гені 3-метил-аденін-ДНК-глікозилази (ген *tag*) збільшують чутливість клітин до мутагену метилметансульфонату.

За дії вказаних ДНК-N-глікозилаз спостерігається локальна **апуринізація** або **апіримідинізація**. За вилучення пуринових основ виникають так звані апуринові сайти (АР-сайти), які репаруються одним із двох способів.

У еукаріотів знайдені **ДНК-інсертази** — ферменти, здатні безпосередньо приєднати до дезоксирибози пуринову основу, комплементарну основі неушкодженого ланцюга ДНК. В інших випадках АР-сайт розпізнається **АР-специфічними ендонуклеазами**, які розривають фосфодіефірний зв'язок поруч з АР-сайтом. Існує два типи таких ферментів — одні розтинають ланцюг з 3'-кінця від АР-сайту, інші — з 5'-кінця.

В деяких випадках АР-ендонуклеаза і ДНК-N-глікозилазна активності можуть поєднуватися в одному ферменті. Прикладом може бути ендонуклеаза III *E. coli* — це АР-ендонуклеаза і глікозилаза, специфічна до дигідро- і дигідрокситиміну — продуктів ультрафіолетового опромінення.

Розірваний після дії АР-ендонуклеази ланцюг ДНК підлягає дії екзонуклеаз, які вилучають ушкоджену ділянку. У *E. coli* цю функцію можуть виконувати різні ферменти. Один із них — **екзонуклеаза III** (ген *xthA*) — відриває незв'язаний з азотистою основою залишок дезоксирибози, якщо він знаходиться на 5'-кінці одноланцюгового розтину, вчиненого АР-ендонуклеазою. Вилучення ушкодженої ділянки здійснюють також інші екзонуклеази і в деяких випадках ДНК-полімераза I за рахунок своєї 5'-екзонуклеазної активності. Виникаючий внаслідок такої ексцизії вилом забудо-

вується ДНК-полімеразою I, а фермент ДНК-лігаза зшиває розірвані кінці фосфодіефірним зв'язком.

ДНК-полімерази I слід вважати основним ферментом, необхідним для забудови виломів, які виникають під час репарації. Розрізняють **два типи забудови** цих виломів: за допомогою **коротких** (20—30 нуклеотидів) і **довгих** (приблизно 1500—9000 нуклеотидів) послідовностей. Репарація короткими послідовностями використовується в 99% випадків. Лише біля 1% репараційних подій здійснюється шляхом забудови довгими послідовностями за участю ДНК-полімерази III.

Різниця між вказаними двома способами ексцизійної репарації полягає в тому, що репарація короткими послідовностями являє собою конститутивну функцію бактеріальної клітини, а репарацію довгими послідовностями розглядають як індуковану відповідь на ушкодження ДНК.

Різні варіанти ексцизійної репарації широко розповсюджені серед про- і еукаріотів. Усування тимінових димерів у клітинах ссавців супроводжується так званим неплановим біосинтезом ДНК, який є репараційним і здійснюється поза S-фазою клітинного циклу. На кожний вилучений тиміновий димер у ДНК ссавців включається в середньому 20 нуклеотидів.

Відомі мутантні форми еукаріотів з ослабленим неплановим синтезом ДНК і тому з підвищеною чутливістю до ультрафіолетового випромінювання та інших мутагенних чинників.

Деякі люди, гомозиготні по мутантному гену **пігментної ксеродерми** (*xeroderma pigmentosum*), виявляють підвищену чутливість до сонячного світла, схильні до аномальної пігментації шкіри і до захворювання шкірним раком. Відомо декілька різних генетичних форм цієї хвороби, і принаймні деякі з них пояснюються нездатністю клітин до вирізання тимінових димерів. Так, наприклад, пігментна ксеродерма I (ХРІ) супроводжується чутливістю клітин хворих людей до ультрафіолетового опромінення у зв'язку з їх дефектністю по УФ-ендонуклеазі — ферменту, що першим розпізнає тимінові димери та деякі інші ушкодження.

5.3.3. Постреплікаційна (рекомбінаційна) репарація

У тих випадках, коли ушкодження в ланцюгах ДНК з тих чи інших причин не були вилучені до початку реплікації, їх наслідки можуть бути зведені до мінімуму в процесі так званої постреплікаційної (рекомбінаційної) репарації.

Пошкодження в одному з ланцюгів ДНК, наприклад, тимінові димери, являють собою серйозну перешкоду на шляху просування реплісоми, в зв'язку з чим синтез комплементарного ланцюга ДНК утруднюється. Коли реплісома досягає ушкодженої ділянки, її подальше просування затримується приблизно на 10 с. За цей час формується нова реплісома за ушкодженим сегментом матричного ланцюга, і реплікація продовжується. В результаті такого переривчастого синтезу в дочірньому ланцюгу напроти ушкоджених ділянок матриці утворюються прогалини довжиною більше 1000 нуклеотидів. Для їх забудови (репарації) вирізається відповідний неушкоджений фрагмент із аналогічного ланцюга сестринської молекули ДНК, який використовується для латання вилому (рис. 5.2). Зрозуміло, що цей шлях репарації може нормально здійснюватися лише

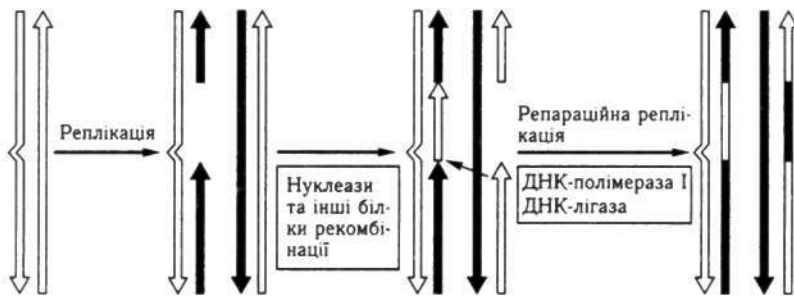


Рис. 5.2. Постреплікаційна (рекомбінаційна) репарація.

Заново синтезовані послідовності ДНК зображено чорним

після редуплікації ДНК і тільки за функціонування генів рекомбінації (*recA*, *recB*, *recC*, *recD* та ін.). Якщо в клітинах разом з порушенням ексцизійної репарації (*uvr⁻*) трапляється мутація в гені *recA*, вони втрачають всі відновлювальні властивості. Ось чому подвійний мутант кишкової палички *uvr⁻recA⁻* може містити в своєму геномі не більше 1—2 димерів тиміну, в той час як бактерії дикого типу можуть переносити наявність біля 50 димерів.

Білок RecA забезпечує обмін фрагментами між аналогічними ланцюгами ДНК. Функція цього білка необхідна як для процесу рекомбінації, так і для одноланцюгового обміну в процесі рекомбінаційної репарації. У кишкової палички існує два *rec*-залежні шляхи рекомбінації і відповідно — репарації. Основний *rec*-шлях забезпечують гени *recBCD*; в клітинах, дефектних з цих генів, включається обхідний шлях — *recF*. Гени *recB*, *recC* і *recD* кодують три субодиниці АТФ-залежної ексзонуклеази V або нуклеази RecBCD.

Це — поліфункціональний фермент, якому властива топоізомераза, а також екзо- і ендонуклеазна активності. Вважають, що цей фермент розрізає дволанцюгову ДНК в певних сайтах і тим самим сприяє як рекомбінації, так і постреплікативній репарації. Білок RecA за наявності АТР забезпечує спаровування донорної і реципієнтної молекул ДНК і перенос одноланцюгових фрагментів після розкручування ланцюгів ДНК. Для RecA-білка одноланцюгова ділянка двоспіральної молекули ДНК, в якій наявне ушкодження (особливо вільний 3'-кінець), є «улюбленим» місцем зв'язування.

Безпосередня участь RecA-білка в рекомбінаційній репарації являє собою лише одну із його функцій. Не менш важлива і інша функція — активність RecA-білка є відповідальною за індукцію експресії багатьох генів, продукти яких виконують різні функції, включаючи і репараційні.

Таким чином, надійне збереження генетичної інформації в нуклеотидних послідовностях ДНК обумовлюється наявністю в клітині великого набору різноманітних репараційних ферментів. Процеси безпомилкової репарації ґрунтуються на тому, що генетична інформація представлена в ДНК двома комплементарними ланцюгами. В зв'язку з цим структура ушкодженого ланцюга ДНК може бути повністю відновлена ферментами репарації за рахунок або за програмою неушкодженого ланцюга. Однак така безпомилкова репарація не завжди можлива.

Постреплікаційна репарація існує не тільки у бактерій, але й у клітинах еукаріотів. Один із типів **пігментної ксеродерми** у людей (*XPvar*) пов'язаний з блоком рекомбінаційної репарації. Високу частоту хромосомних аберацій, що спостерігається у випадку рецесивної хвороби у людей — **синдрома Блума**, також пояснюють порушенням цієї репарації.

5.3.4. Системи індукованої репарації. *SOS-репарація*

Багато чинників, які ушкоджують структуру ДНК або пригнічують її реплікацію (ультрафіолетові та іонізуючі випромінювання, алкілюючі сполуки тощо), стимулюють репараційну здатність клітин *E. coli*. Системи репарації, що включаються у відповідь на дію провокуючих факторів, отримали назву **індуцибельних**. Таких систем у живій природі досить багато.

Однією з них є наявна у *E. coli* **система репарації**, яка індукується у відповідь на дію алкілюючих сполук. Завдяки цій системі невисокі концентрації останніх значно збільшують стійкість

бактерій до наступної дії високих концентрацій цих речовин. Вже зазначалося, що механізм індукції в данному випадку полягає в тому, що інактивована в процесі прямої реактивації метилтрансфераза активує транскрипцію ряду генів, серед яких — власний ген метилтрансферази *ada* і ген *alkA*, який кодує специфічну щодо алкілюючих сполук ДНК-N-глікозилазу.

Інший класичний приклад індукованої репарації — так звана **реактивація Уейгла або W-реактивація**. Це явище полягає в тому, що опромінений ультрафіолетом бактеріофаг λ може розмножуватися лише в тих клітинах *E. coli*, які також підлягали ультрафіолетовому опроміненню. Цей цікавий факт вказує на існування у *E. coli* системи репарації, яка індукується ультрафіолетом і яка вкрай необхідна для виживання опромінених фагових часток. Зазначена система репарації отримала назву **SOS-репарації**, тобто репарації, яка включається для спасіння. SOS-відповідь *E. coli* на опромінення досягається шляхом індукції ексцизійної репарації довгими послідовностями, а також *rec*-залежної репарації. Одночасно блокуються клітинні поділи в зв'язку з тимчасовою зупинкою реплікації. Слід підкреслити, що в протилежність безпомилковій темновій репарації, яка фактично функціонує постійно, SOS-репарація включається через деякий час після ушкоджуючого впливу і, як правило, йде з помилками. Отже, цей тип репарації може закріпити ушкодження, що раніше виникли в ДНК, тобто спричинити виникнення мутацій. SOS-репарація включається у тих випадках, коли безпомилкова репарація не справляється з вилученням ушкоджень. Для індукції системи SOS-репарації у *E. coli* необхідно 30—60 ушкоджень на геном, однак вона може включитись і за умови значно меншої кількості ушкоджень, якщо точна репарація блокувана мутаціями. На відміну від конститутивного способу репарації індукційбельна SOS-репарація блокується інгібіторами біосинтезу білка (хлорамфеніколом, циклогексимідом та ін.).

Сигналом для запуску SOS-репарації слугує затримка реплікації на ушкоджених ділянках матриці, що призводить до накопичення низькомолекулярних олігонуклеотидів.

Ступінь індукції SOS-системи визначається кількістю ушкоджень у ДНК: якщо їх небагато, то зростає експресія генів тих репараційних білків, які функціонували і до індукції, наприклад, UvrA, B, C і D. За більшої кількості ушкоджень блокується поділ клітин і індукується синтез білка — продукту гена *recA*, необхідного для рекомбінаційної репарації і для подальшої індукції SOS-системи. За ще більшої кількості ушкоджень ДНК індукуються гени *htrA*, *umuC*, *umuD*, *umuS* та інші, відповідальні за особливий шлях репарації з можливими помилками і виникненням мутацій.

Механізм індукції SOS-системи *E. coli* оснований на взаємодії продуктів двох генів: *recA* і *lexA*. Білок LexA є універсальним репресором приблизно двох десятків генів, серед яких — власний ген, гени *recA*, *uvrABC*, *umuCD* та ін. Експресія гена *lexA* в свою чергу контролюється концентрацією білка RecA. Цей білок легко зв'язується з ушкодженими ділянками ДНК (наприклад, з тиміновими димерами) або з продуктами деградації ушкодженої ДНК (олігонуклеотидами). Такий зв'язаний RecA-білок є активованою його формою, здатною, з однієї сторони, здійснювати рекомбінаційний перенос одноланцюгових фрагментів, а з другої — зв'язуватися з білком LexA і активувати його приховану автопротеазну активність.

Автогідроліз репресора (саморозрізання його на дві частини) призводить до активації *recA*-гена і накопиченню його продукту — протеази RecA. Поступове зростання концентрації білка RecA супроводжується відповідним зменшенням концентрації LexA-репресора і поступовим включенням все нових генів SOS-репарації. Гени *umuC* і *umuD* активуються високими концентраціями RecA, отже репарація з помилками індукується в останню чергу.

Вважають, що продукти генів *umuC* і *umuD* модифікують властивості ДНК-полімерази III, внаслідок чого цей фермент отримує здатність працювати на некомплементарній ділянці ДНК і забезпечує забудову виломів довгими послідовностями. Одночасно білком RecA пригнічується коректорська функція ϵ -субодиниці ДНК-полімерази III. Подібна сумісна дія продуктів генів *umuCD* і RecA-білка на ДНК-полімеразу може бути корисною для виживання в умовах, коли ушкоджень у ДНК дуже багато. Щоправда, це оплачується великою кількістю мутацій, які виникають завдяки дії продуктів генів *umuC* і *umuD*. Добре відома індукція фага λ за умови включення SOS-системи пояснюється тим, що репресор фага, який забезпечує лізогенний цикл розвитку, має таку ж структуру, як і білок LexA, і розрізається, зв'язавшись з активованим RecA-білком.

Таким чином, сучасні уявлення про механізми SOS-репарації добре пояснюють раніше встановлені взаємозв'язки між багатьма фенотиповими явищами, що виникають у бактерій після ультрафіолетового опромінення:

- 1) індукція профага λ ;
- 2) реактивація Уейгла;
- 3) блокування клітинних поділів у деяких мутантів, в зв'язку з чим клітини стають нитковидними;
- 4) збільшення частоти мутацій;
- 5) зростання частоти рекомбінацій.

Все сказане про особливості функцій генів *lexA*, *recABCD*, *uvrABCD*, *umuCD* та інших свідчить про участь продуктів біль-

шості цих генів як в безпомилкових системах репарації, так і в SOS-репарації, яка призводить до виникнення мутацій. Отже, репараційні і мутаційні процеси не слід протиставити один одному, бо фактично це єдиний процес, результати якого (повне відновлення структури ДНК або закріплення змін і поява мутацій) залежать від конкретних умов.

Слід зазначити, що репарація з помилками потребує реплікації ДНК. У випадку мутацій, що призводять до втрати активності ДНК-полімерази III, репарація, схильна до помилок, стає неможливою.

МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ

Реалізація інформації генів здійснюється завдяки двом основним молекулярногенетичним процесам — **транскрипції** (синтезу РНК на матриці генетичної нуклеїнової кислоти) і **трансляції** (синтезу поліпептидів на матриці іРНК). Важливі не тільки самі ці процеси, але й інші біохімічні перетворення, без яких неможлива поява в клітині функціонально активних молекул РНК та білків, — наприклад, **процесинг** — утворення «зрілих» РНК із «незрілих» про-РНК, пост-трансляційні модифікації поліпептидів, формування відповідних конформаций білкових молекул та інше.

6.1. Транскрипція

Транскрипція — це перша стадія реалізації (зчитування) генетичної інформації, внаслідок якої послідовність нуклеотидів ДНК переписується (транскрибується) у послідовність РНК. В основі механізму копіювання інформації в процесі транскрипції лежить той же структурний принцип комплементарного спаровування нуклеотидів, що й за реплікації.

Процес синтезу РНК каталізується ферментами **РНК-полімеразами**, які поділяються на ДНК-залежні і РНК-залежні відповідно до матриць, на яких ці ферменти синтезують РНК із рибонуклеозидтрифосфатів. **ДНК-залежні РНК-полімерази** (або просто РНК-полімерази) виявлені у всіх об'єктів, у яких носієм інформації є ДНК (еукаріоти, бактерії, ДНК-віруси тощо), **РНК-залежні РНК-полімерази** (або **РНК-реплікази**) властиві РНК-вміщуючим вірусам і забезпечують реплікацію і транскрипцію їх геномів.

У еукаріотів та деяких найпростіших вірусів (фагів) більшість генів функціонують (транскрибуються) як самостійні одиниці, в той час як у інших вірусів та у бактерій гени в основному згруповані в так звані **оперони** — регульовальні одиниці геному. **Оперон** — це група функціонально пов'язаних генів, які транскрибуються і регулюються як одне ціле (розділ 3.3.1).

6.1.1. Промотори і термінатори. Транскриптон

Синтез молекул РНК розпочинається в певних місцях ДНК, які називаються **промоторами**, а закінчується в **термінаторах**. Послідовність ДНК, розташована між промотором і термінатором, складає один **транскриптон**, який зчитується як одне ціле і являє собою одиницю транскрипції. В межах транскриптона синтез РНК здійснюється на одному із двох ланцюгів ДНК, який називають **антикодогенним** або **матричним**. Одні транскриптони зчитуються в одному напрямку, а інші — в протилежному. В багатьох випадках роль матриці виконують різні (протилежні) ланцюги ДНК.

Сусідні транскриптони можуть відмежовуватись один від одного ділянками ДНК, що не транскрибуються, а можуть і перекриватися, наприклад так, що в межах перекривання матричними виявляються обидва ланцюги ДНК. У еукаріотів транскриптон, як правило, складається з одного гена. Транскриптони бактерій, як правило, містять декілька генів. Існують транскриптони, які містять гени, що не кодують білків (гени рибосомних РНК, транспортних РНК та інші). Є і змішані транскриптони, до яких входять, наприклад, гени тРНК і білків.

Структура промоторів

Вивчення структури декількох сотень промоторів дало можливість виявити загальні закономірності їх будови. Зазначимо, що **стартову точку транскрипції** позначають як +1, всі інші нуклеотиди по ходу транскрипції — зростаючими номерними знаками (+2, +3 і т. д.), а нуклеотиди, що розташовані проти ходу транскрипції (до стартової точки) — цифровими номерами із знаком мінус (-1, -2, -3 і т. д.). Стартова точка транскрипції розташована в місці, що знаходиться в середині сегмента ДНК, який екранується РНК-полімеразою за її специфічного (міцного) приєднання до промотора. Найчастіше стартовою точкою слугує пуринова основа (А або G), що знаходиться в середині послідовності САТ. В деяких промоторах стартова точка не дуже фіксована: транскрипція може розпочинатися з двох-трьох сусідніх нуклеотидів матриці.

Основним елементом промотора є місце зв'язування РНК-полімери. Ділянка зв'язування цього ферменту в ДНК *E. coli* простягається на 70 п. н. (від -50 до +20). Як видно з рис. 6.1, а, більшість бактеріальних промоторів містить дві консервативні послідовності по 6 п. н. кожна, які дуже подібні в різних промоторах і розділяються одна від одної іншими послідовностями. Середні

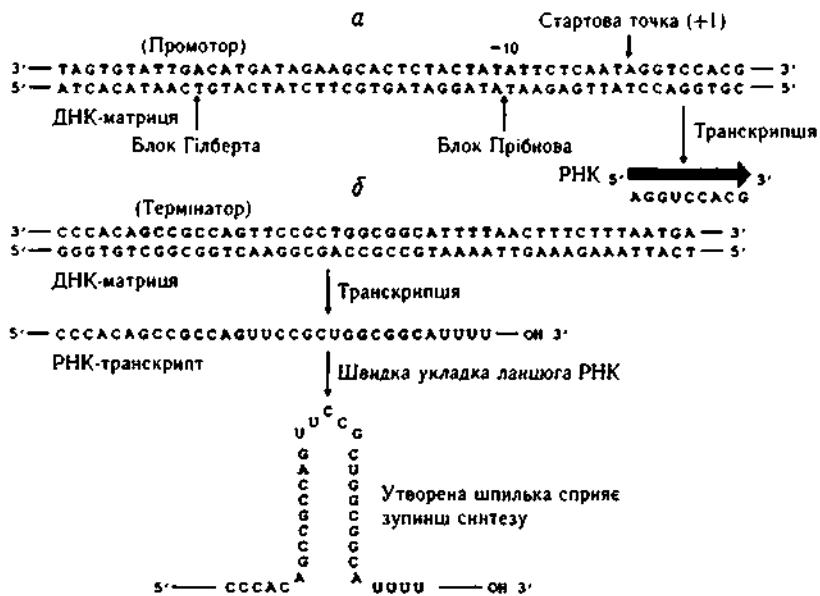


Рис 6.1 Старт- і стоп-сигнали для РНК-полімерази кишкової палички

а — старт-сигнал, б — стоп-сигнал

статистичні дані про ці консервативні послідовності, центри яких знаходяться в положеннях -10 і -35, такі:

-10 (блок Прибінова) — ТАТААТ
 -35 (блок Гілберта) — ТТГАСА

Іноколи цих послідовностей, особливо -35, може й не бути; тоді їх роль виконують інші послідовності в промоторі.

В промоторах еукаріотів виявляється послідовність із семи нуклеотидів, що віддалена від стартової точки на 19—27 п. н. і має будову ...ТАТАААА... Цю послідовність називають ТАТА або блоком Хогнеса; центр останнього найчастіше знаходиться в положенні -25. Далі проти ходу транскрипції (-70—80) у еукаріотів виявляється так званий СААТ-блок: СААТСТ.

У прокаріотів зазначені консервативні послідовності грають важливу роль у розпізнаванні промоторів РНК-полімеразами і в приєднанні цих ферментів до промоторів. У процесі розпізнавання промотора вирішальну роль грає σ -субодиниця ферменту.

У еукаріотів є певні особливості в будові промоторів, що розпізнаються різними РНК-полімеразами. Наявність описаних раніше

консервативних послідовностей характерна для промоторів РНК-полімерази II, але неістотна для РНК-полімерази III. Відомо, наприклад, що промотори генів, з якими взаємодіє РНК-полімераза III, розташовані в середині відповідного транскриптона. Так, промотор гена 5S рРНК *Xenopus laevis* — це послідовність між основами + 50 і + 83. Вона розщеплена на два елементи (блоки послідовностей А і С), між якими є значно коротший проміжний елемент. На відміну від цього в промоторах генів тРНК знайдено просторово роз'єднані послідовності — блоки А і В; елемент С і проміжна послідовність у таких промоторах відсутні. РНК-полімераза III транскрибує також гени малих РНК, включаючи ген 7SL РНК, який не містить внутрішнього промотора.

Структура термінаторів

Термінатори забезпечують закінчення синтезу РНК на кінцях транскриптонів, завдяки чому можлива незалежна регуляція експресії різних генів. У бактерій іноді зустрічаються подібні до термінаторів структури (атенуатори) посеред оперонів; з їх допомогою здійснюється плавна регуляція швидкості синтезу РНК на матриці генів, що розташовані після атенуатора.

Розрізняють *ρ*-залежні і *ρ*-незалежні термінатори. Фактор *ρ* (*ρ*) відомий як білок, наявність якого обов'язкова для закінчення транскрипції на *ρ*-залежному термінаторі.

Структура *ρ*-залежних і *ρ*-незалежних термінаторів має певні відмінності щодо послідовностей нуклеотидів, однак є разюча подібність їх вторинної структури завдяки наявності паліндрому, розташованого безпосередньо перед термінаторним сайтом. В області таких паліндромів, що мають центральну симетрію і інвертовані повтори, можуть утворюватися «шпильки» і хрестоподібні структури. У прокаріотів паліндроми виявляються в кожному термінаторі. На рис. 6.1, б наведена будова фрагмента рибонуклеїнової кислоти, що синтезується на ДНК безпосередньо перед термінаторним сайтом. Будова цього РНК-фрагмента повністю відображує структуру одного з ланцюгів термінатора ДНК. Як видно з рисунка, до складу *ρ*-незалежних термінаторів входить досить значна кількість GC-пар, які можуть бути розділені на дві частини іншими парами нуклеотидів. Безпосередньо за GC-ділянкою в термінаторному фрагменті відповідної РНК міститься ділянка із декількох залишків U. В *ρ*-залежних термінаторах GC-пар значно менше, а ділянка із залишків T (в РНК — відповідно U) не виявляється.

На ρ -незалежних термінаторах РНК-полімераза доводить реакцію до кінця, після чого відділяється від матриці ДНК одночасно з молекулою синтезованої РНК. При цьому велике значення має послідовність із залишків Т, розташованих зразу ж за шпилькою, бо гібрид РНК-ДНК в цій області дуже нестабільний. Дослідями встановлено, що після часткової делеції Т-ділянки термінація не здійснюється, хоч РНК-полімераза і робить паузу в районі шпильки.

ρ -Білок (м. м. 46 кДа) агрегує з утворенням гексамера, який і є активним фактором термінації на ρ -залежних термінаторах. Білок виявляє РНК-залежну нуклеозидтрифосфатазну (НТРазну) активність, яка необхідна для термінуючого ефекту. Фактор ρ приєднується до РНК-продукту до того, як РНК-полімераза досягне термінатора. В місцях ρ -залежної термінації РНК-полімераза у відсутність ρ -фактора зупиняється. Вважають, що ρ -фактор рухається по синтезованій РНК, в місцях пауз доганяє РНК-полімераза і витісняє РНК-продукт. Останній процес супроводжується гідролізом НТР, внаслідок чого змінюється конформація ρ -фактора і РНК витісняється із комплексу або безпосередньо самим фактором, або шляхом його впливу на конформацію РНК-полімерази. Однак ρ -фактор викликає термінацію не в усіх місцях пауз. На ρ -залежних термінаторах, які зустрічаються в середній структурних генів прокаріотів, ρ -фактор не забезпечує термінації, якщо відповідні іРНК ефективно транскрибуються.

Отже, наявність ρ -залежних термінаторів (атенуаторів) в середині генів можна розглядати як один із механізмів взаєморегулюючих впливів транскрипції і трансляції.

6.1.2. ДНК-залежні РНК-полімерази

ДНК-залежні РНК-полімерази мають різну будову у вірусів, прокаріотів і еукаріотів.

У бактерій знайдена одна РНК-полімераза, що складається із двох компонентів: мінімальної РНК-полімерази або «кор»-ферменту, який вміщує всі каталітичні центри, і σ -субодиниці, необхідної для правильного приєднання РНК-полімерази до промотора. Після початку синтезу РНК σ -субодиниця відокремлюється від РНК-полімерази. Мінімальний фермент бактерій вміщує чотири поліпептидних ланцюги: два ідентичних (α) і два неідентичних (β і β'). Отже, його структуру можна представити як $\alpha_2\beta\beta'$. Субодиниці β і β' взаємодіють з ДНК і формують активні центри ферменту. Інгібітори

бактеріальної транскрипції — антибіотики рифампіцин і стрептолідигін — специфічно взаємодіють з β -субодиницею.

Транскрипцію генів рРНК, тРНК і більшості генів, що кодують білки, здійснюють холоферменти — РНК-полімерази, що містять, крім «кор»-ферменту, дуже важливу з'ємну субодиницю σ . Отже, загальна будова РНК-полімерази — $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Крім «головної» σ -субодиниці РНК-полімерази бактерій містять «мінорні» σ -субодиниці, які розпізнають обмежену кількість промоторів, необхідних для деяких системних переключень транскрипції, наприклад, для запуску генів спороутворення та ін. Структура різних σ -факторів неоднорова, про це свідчать значення молекулярних мас субодиниць: головного σ -фактора *E. coli* — 70 кДа (σ^{70}), *B. subtilis* — 43 кДа (σ^{43} або σ^A). Мінорні σ -фактори *B. subtilis*, необхідні для спороутворення, — це σ^{29} , σ^{30} та σ^{32} (нові їх позначення — відповідно σ^E , σ^H та σ^C). У *E. coli*, крім σ^{70} , виявили й інший фактор — σ^{32} , необхідний для транскрипції групи генів теплового шоку.

В ядрах еукаріотів знайдено три різних типи РНК-полімераз: РНК-полімераза I (або А), РНК-полімераза II (або В) і РНК-полімераза III (або С). Всі ці РНК-полімерази нечутливі до інгібіторів бактеріальних РНК-полімераз — рифампіцину і стрептолідигіну, зате виявляють високу чутливість до власних специфічних інгібіторів. Специфічним інгібітором РНК-полімерази II є токсин блідої поганки α -аманітин.

Структура і функція різних типів РНК-полімераз еукаріотів істотно відрізняються. РНК-полімераза I (А) в ядрах клітин здійснює синтез попередників усіх рРНК (18S, 28S і 5,8S); РНК-полімераза II (В) — синтез попередників усіх іРНК; РНК-полімераза III (С) — синтез різноманітних низькомолекулярних РНК, а саме тРНК, 5S рРНК та інших (малих) РНК.

Молекули ферментів кожного з трьох зазначених типів взаємодіють з численними додатковими факторами транскрипції. РНК-полімераза II, яка розпізнає широке коло промоторів з різною будовою, взаємодіє з цілою групою таких факторів. Останні поділяються на дві групи. Першу групу складають фактори загальної транскрипції, які втягуються в транскрипцію більшості, а, можливо, і всіх генів, які «обслуговує» РНК-полімераза II. До цієї групи відносяться фактори TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIF і TFIIN (символ «TFII» походить від англ. «Transcription Factor for polymerase II»). Із наведених факторів краще вивчений TFIID, який складається із багатьох поліпептидних субодиниць, одна із яких відповідає за приєднання до ТАТА-блоку промотора. Останній разом з усіма факторами трансляції і РНК-полімеразою II утворює так званий преініціаторний комплекс. Слід зазначити, що РНК-полімераза II роз-

пізнає і такі промотори, у яких немає ТАТА-боксів, але для цього фермент потребує додаткових факторів транскрипції.

Крім факторів загальної транскрипції, існує група геноспецифічних факторів РНК-полімерази II, одні з яких розпізнають GC- та ССААТ-послідовності промоторів, а інші — більш специфічні елементи, наприклад енхансери. Прикладом можуть бути специфічні фактори, які взаємодіють з РНК-полімеразою II в клітинах людини, уражених вірусами. Один із факторів — фактор SpI — стимулює транскрипцію з раннього промотора вірусу SV40 і з промотора гена тимідинкінази вірусу герпеса (HSV1). З'ясовано, що фактор SpI приєднується до GC-боксів, розташованих на 5'-кінці цих промоторів, і тим стимулює транскрипцію. GC-блоки в ранньому промоторі вірусу SV40 входять у склад розташованих тут повторів із 21 п. н. (між ТАТА-блоком промотора і енхансером). Кожний такий повтор містить один GC-блок, до якого може приєднатися фактор SpI.

Щодо промотора гена тимідинкінази вірусу HSV1, то в ньому, крім GC-блоків, є і блок ССААТ. Фактор SpI приєднується до GC-блоків, а послідовність ССААТ взаємодіє з іншим специфічним фактором транскрипції — CTF (ССААТ box transcription factor), після чого ініціація транскрипції стає можливою.

Білкові фактори транскрипції необхідні для всіх РНК-полімераз еукаріотів. Для РНК-полімерази I відомі фактори SL1 і UBF, для РНК-полімерази III — фактори TFIIIA, TFIIIB і TFIIIC. Останні три фактори необхідні для транскрипції генів 5S рРНК; зчитування інформації з генів тРНК здійснюється з участю двох факторів — TFIIIB і TFIIIC. Фактори TFIIIA і TFIIIC (у випадку гена 5S рРНК) або один фактор TFIIIC (у випадку гена тРНК) зв'язують внутрішній промотор і сприяють приєднанню фактора TFIIIB поблизу старта транскрипції.

Особливі за будовою РНК-полімерази містяться в органелах клітин еукаріотів — у хлоропластах і мітохондріях. У складі хлоропластної ДНК знайдено гени, гомологічні генам α -, β - і β' -субодиниць РНК-полімерази *E. coli*. Ці та інші дані свідчать про те, що РНК-полімераза хлоропластів за будовою дуже подібна до РНК-полімерази бактерій. Що ж до РНК-полімерази мітохондрій, то виявилось, що вона складається лише з одного поліпептидного ланцюга, чим дуже нагадує вірусні РНК-полімерази.

Відомо, що РНК-полімерази у споріднених фагів T3 і T7 являють собою одноланцюгові поліпептиди (м. м. 110 кДа), які досить швидко синтезують РНК (за 37 °С швидкість синтезу — біля 200 нуклеотидів за одну секунду). Однак ці ферменти розпізнають лише декілька промоторів у фаговій ДНК і не можуть розпізнавати

інші промотори. В протилежність цьому, фермент клітини-хазяїна здатний транскрибувати будь-який з багатьох (біля 1000) транскриптонів. Деякі з них транскрибуються бактеріальною РНК-полімеразою без участі інших факторів, однак багато фагових генів транскрибуються РНК-полімеразою клітини-хазяїна лише за наявності інших білків, що кодуються вірусним геномом. Зараження деякими фагами викликає різні зміни спорідненості РНК-полімерази бактерії до власних промоторів. Вона перестає приєднуватися до них і втрачає здатність зчитувати власний геном. Замість цього така модифікована РНК-полімераза бактерії розпочинає транскрипцію на фагових промоторах.

Відносно недавно виділено зовсім нове царство прокариотних мікроорганізмів — архебактерій, багато з яких існують за екстремальних умов — при високих температурах (до 100 °С) та високих рівнях засолення середовища. Ці організми в еволюційному плані однаково далекі від еукаріотів і від звичайних бактерій. У них немає різних типів РНК-полімераз, але своєю будовою їх РНК-полімерази дуже нагадують відповідні ферменти еукаріотів: вони складаються із 8—10 субодиниць, первинна структура яких має багато спільного з субодиницями еукаріотних РНК-полімераз.

6.1.3. Цикл ДНК-залежної транскрипції

Останній можна умовно поділити на чотири основних стадії, кожна з яких складається з багатьох елементарних процесів:

- 1) зв'язування РНК-полімерази з ДНК;
- 2) ініціації транскрипції;
- 3) нарощування (елонгації) ланцюга РНК;
- 4) термінації транскрипції (рис. 6.2).

Для еукаріотів транскрипція з'ясована значно гірше, ніж для прокариотів, однак є підстави вважати, що в основних рисах цикл транскрипції у бактерій і еукаріотів дуже подібний.

У *E. coli* процес започатковується **приєднанням РНК-полімерази** до промотора, завдяки особливостям його будови та наявності у складі РНК-полімерази σ -фактора. Останній, як уже зазначалося, необхідний для правильного або, як кажуть, міцного приєднання ферменту до промотора. При цьому спочатку утворюється так званий закритий промоторний комплекс, в якому ДНК зберігає свою дволанцюгову структуру, а РНК-полімераза ще не здатна до синтезу РНК. Закритий комплекс не дуже стабільний і досить легко може перетворюватись у відкритий. При цьому розплітається приблизно один виток подвійної спіралі ДНК у місці знаходження стар-

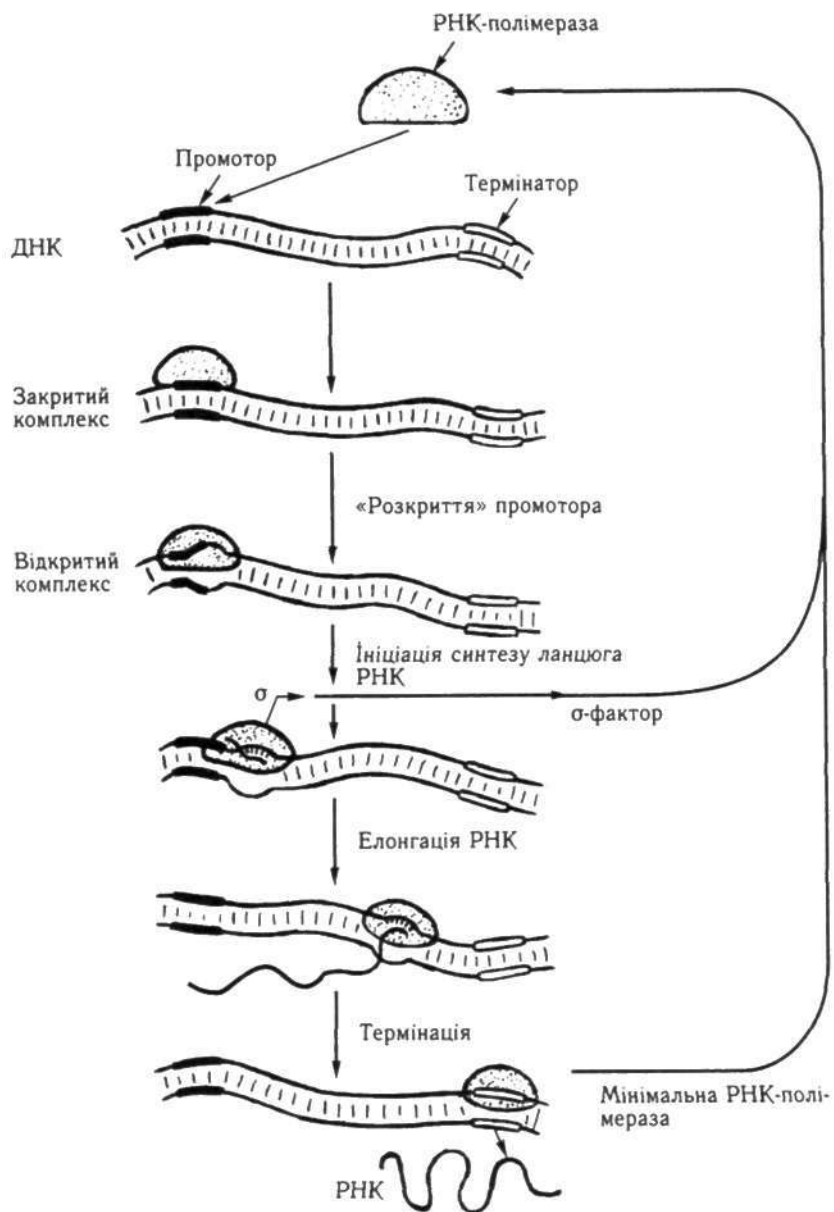


Рис. 6.2. Цикл транскрипції

тової точки (+1). У відкритому комплексі зв'язок РНК-полімерази з промотором значно міцніший, ніж у закритому.

Наступна стадія — ініціація — вимагає наявності субстратів РНК-полімерази — рибонуклеозидтрифосфатів і полягає в утворенні декількох ланок ланцюга РНК. Перший нуклеотид входить у склад ланцюга, не втрачаючи своєї трифосфатної групи, а наступні приєднуються до 3'-ОН-групи кожного попереднього з виділенням пірофосфату; отже синтез РНК йде в напрямку 5' → 3'. Спершу утворення ди-, три- і більш протяжних олігонуклеотидів є абортивним, тобто ці продукти з високою ймовірністю можуть вивільнятися із комплексу. В цьому випадку РНК-полімераза не залишає промотора, а розпочинає синтез знову. Коли ж РНК-продукт досягає критичного розміру (від 3 до 9 нуклеотидів залежно від промотора) абортивна ініціація зникає, комплекс стабілізується і синтез РНК продовжується до кінця. Приблизно в цей момент, який вважають кінцем ініціації і початком елонгації, від РНК-полімерази відокремлюється σ -субодиниця, і замість неї приєднується інший білок — продукт гена *nusA*, який сумісно з ρ -фактором пізнає термінатор. Ефективність ініціації на різних промоторах (або їх «сила») істотно відрізняється. Є «сильні» і «слабкі» промотори, що залежить головним чином від рівновісної константи утворення закритих промоторних комплексів і від константи швидкості перетворення закритого комплексу у відкритий.

На стадії елонгації в ДНК розплетено приблизно 18 п. н., із яких 12 утворюють гібридну спіраль з наростаючим кінцем ланцюга РНК (рис. 6.3). В міру того, як РНК-полімераза просувається

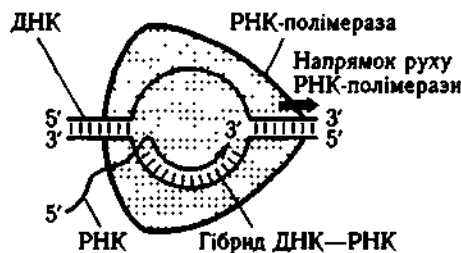


Рис 6.3. РНК-полімераза, що транскрибує ДНК

по ДНК-матриці, попереду неї ДНК розплітається, а позаду — сплітається знову. Можливо, що необхідні для цього умови забезпечують топоізомерази. В область елонгації можуть надходити всі

чотири нуклеозидтрифосфати. РНК-полімераза сама вибирає потрібні попередники шляхом спаровування новоприбулого нуклеотиду з ланцюгом ДНК-матриці за принципом комплементарності. Можливо, що фосфодієфірний зв'язок між нуклеотидами утворюється лише тоді, коли новоприбулий нуклеотид формує правильну пару з відповідною основою ДНК. Якщо ж нуклеотид нездатний утворити досконалу пару, то він вилучається і замість нього випробується інший.

Для функціонування РНК-полімерази важливе значення мають двовалентні іони. Рибонуклеотиди поступають у ділянку елонгації у формі хелатних сполук Mg^{2+} -NTP. Мінімальний фермент містить два атоми цинку.

В процесі елонгації РНК-полімераза рухається по ДНК з різною швидкістю; в деяких ділянках матриці затримки в просуванні ферменту досить значні — їх називають паузами. Завершується синтез в чітко визначених ділянках матриці — термінаторах, про які вже йшлося. Саме тут здійснюється відокремлення від ДНК-матриці готової РНК і мінімальної РНК-полімерази, яка може знову приєднувати до себе σ -субодиницю і розпочинати новий цикл транскрипції.

В утворенні фосфодієфірних зв'язків найважливішу роль виконує β -субодиниця РНК-полімерази. Про це свідчить той факт, що антибіотики, які взаємодіють з цією субодиницею, блокують як ініціацію (рифампіцини), так і елонгацію (стрептолідигіни). Гепарин, який взаємодіє з β -субодиницею, блокує транскрипцію шляхом порушення взаємодії РНК-полімерази з матрицею ДНК. Жодну з субодиниць не можна вважати відповідальною за приєднання σ -субодиниці до мінімального ферменту. Всі субодиниці останнього тим або іншим способом приймають участь у цьому процесі.

6.1.4. Процесинг первинних транскриптів

Попередники різних видів РНК (проРНК), що утворюються в процесі транскрипції, в подальшому формуються в зрілі молекули, здатні виконувати відповідні функції. Перетворення попередників у функціонально активні зрілі РНК називається дозріванням молекул або процесингом. Суть процесингу полягає в тому, що молекули проРНК підлягають розщепленню і модифікаціям або редагуванню, внаслідок чого первинна структура зрілої іРНК може істотно змінитися. Особливо складні перетворення попередників спостерігаються у еукаріотів, у яких проРНК синтезуються в хромосомах ядра, відгороджених від цитоплазми подвійною ядерною мембраною.

В цитоплазму транспортуються зрілі молекули РНК. Вважають, що процесинг РНК продовжується і під час транспорту цих молекул через пори мембран ядра. Попередники РНК значно більші за розмірами, ніж зрілі молекули, тому більша частина їх послідовностей (до 90%) руйнується нуклеазами під час процесингу.

Процесинг попередників РНК у бактерій

Процесинг проРНК у бактерій в основному зводиться до розпаду деяких поліцистронних (полігенних) транскриптів на менші за розміром продукти окремих генів. Прикладом може бути процес, який забезпечує утворення зрілих молекул бактеріальних рРНК і тРНК. Транскрипт-попередник синтезується на оперонах, що складаються з генів рРНК 16S, 23S, 5S і тРНК (рис. 6.4). В хромосомі

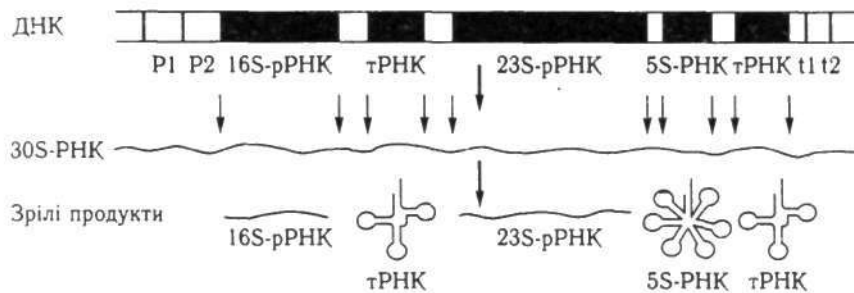


Рис. 6.4. Будова оперонів *rrn* у кишкової палички та продукти транскрипції цих оперонів

E. coli міститься сім таких *rrn*-оперонів, які відрізняються один від одного типами і кількістю генів тРНК. Спільний транскрипт цих генів, що включає приблизно 5600 нуклеотидів, по мірі свого утворення підлягає дії ендонуклеаз у місцях, показаних на рисунку стрілками. Дія всіх цих ферментів призводить до утворення значно менших за розмірами зрілих РНК з 5'-Р і 3'-ОН-кінцями.

Вирізання про-тРНК із складу первинного транскрипту у бактерій здійснюється РНКазою III. Попередник тРНК містить біля 100 нуклеотидів, а зрілі тРНК — 70—90. Процесинг 5'-кінця про-тРНК каталізує РНКаза Р, а 3'-кінця — РНКаза D, яка являє собою екзо-3'-нуклеазу. Остання руйнує 3'-кінець РНК-попередника. Нерідко при цьому руйнується і послідовність ССАон, необхідна для утворення аміноцил-тРНК. В цьому випадку 3'-кінець ССАон синтезується заново шляхом послідовних безматричних нуклеотид-трансферних реакцій.

Фермент РНКаза Р містить два компоненти: РНК і основний білок (17 кДа). Подібний фермент є також у еукаріотів. Ферментативну активність у РНКазі виявляє РНК-компонент, а білок лише підсилює цю активність. Отже, РНК у складі РНКазі Р виступає як справжній каталізатор, властивості якого визначаються нативною структурою його молекул.

Процесинг попередників іРНК не властивий бактеріальним клітинам, однак окремі випадки розпаду поліцистронної проРНК на менші фрагменти відомі. Так, наприклад, за транскрипції оперона, що кодує білки більшої субчастки рибосоми (L1, L7/12) і субодиниці РНК-полімерази (β і β'), синтезується спільний транскрипт, первинна структура якого відповідає напрямку зчитування генів в опероні, а саме $L1 \rightarrow L7/12 \rightarrow \beta \rightarrow \beta'$. Процесинг супроводжується ендонуклеазним розщепленням цього транскрипту і утворенням зрілих іРНК, окремих для рибосомних білків і субодиниць РНК-полімерази.

Відносно недавно доведено, що істотна частина бактеріальних іРНК на 3'-кінці поліаденілується, тобто на цьому кінці нарощується поліаденіловий «хвіст» (...AAAAA...). До цього така модифікація 3'-ОН-кінця вважалася характерною для іРНК еукаріотів.

Процесинг про-РНК в еукаріотних клітинах

Процесинг РНК в еукаріотних клітинах більш складний і має істотні відмінності у випадку попередників різних типів.

Процесинг попередника рРНК передбачає чимало модифікацій молекули. Як вже зазначалося (розділ 3.4), гени рРНК у еукаріотів представлені копіями, що повторюються тандемно і розділені спейсерами. Послідовності, що містяться між двома великими спейсерами, утворюють один транскриптон, на якому РНК-полімераза I (A) синтезує одну спільну молекулу попередника рРНК (рис. 6.5).

Процесинг цієї молекули полягає в метилюванні ряду рибозних залишків, а також у розщепленні проРНК на три типи рРНК: 18S, яка входить до складу малої субодиниці рибосоми, а також 28S і 5.8S, що є належністю великої субчастки. У деяких організмів у складі попередника 28S-РНК знаходиться інтрон, який вилучається (рис. 6.5). Зшивання фрагментів молекули РНК по схемі «кінець в кінець» після вилучення інтрона називається **сплайсингом**. Дослідження сплайсингу попередника рРНК у інфузорії Tetrahymena виявило дуже цікавий факт: сплайсинг попередника рРНК здійснюється без спеціальних білків-ферментів і без затрати енергії, тобто шляхом **самосплайсингу**. Висока точність вирізання інтронів із попередників забезпечується наявністю складної вторинної і тре-

тинної структури у проРНК, а також особливостями нуклеотидної послідовності інтронів. Інтрони з дуже подібною структурою і також здатні до самосплайсингу знайдені в генах рРНК різних клітинних органел: в ядрах інфузорій, мітохондріях дріжджів і хлоропластах рослин. У цих випадках молекула проРНК виступає в ролі

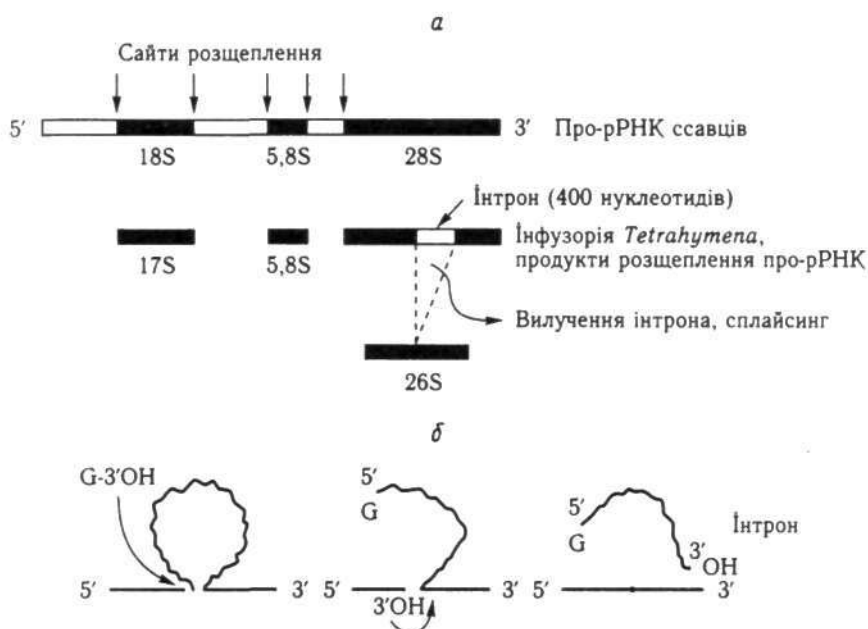


Рис. 6.5. Попередник рРНК (про-РНК) еукаріотів (а) та схема реакцій за сплайсингу (б)

автокаталізатора своєї перебудови. РНК, що здатні до біокаталізу, називаються **рибозимами**.

Особливості процесингу попередників тРНК у еукаріотів визначаються тим, що багато з цих проРНК містять інтрон. Останній локалізується в молекулі зразу за антикодоновою ділянкою (біля 5'-кінця тРНК) і складається із 14—16 нуклеотидів. Сплайсинг попередників тРНК, в протилежність сплайсингу попередників рРНК, у інфузорій повністю залежить від наявності білків-ферментів: ендонуклеази, що розрізає РНК в двох місцях сплайсингу і вирізає інтрон, і лігази, яка зшиває кінці фрагментів.

Процесинг попередників іРНК, що синтезуються РНК-полімеразою II, включає в себе процес сплайсингу та ряд інших модифі-

кацій молекули (рис. 6.6). Протяжність первинних ядерних транскриптів дуже коливається залежно від розмірів транскриптонів, на

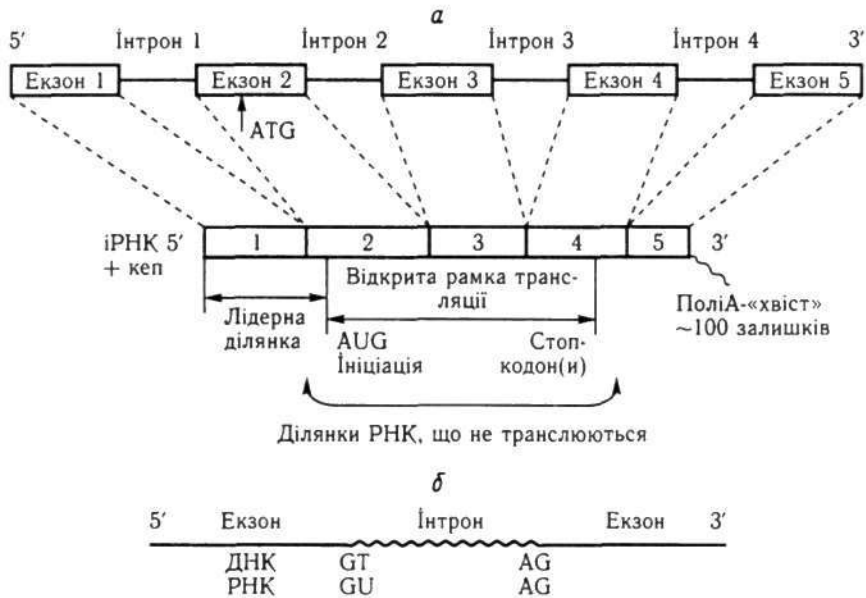


Рис. 6.6. Схема сплайсингу екзонів за утворення зрілої іРНК (а), межі екзонів та інтронів (б)

яких йде транскрипція. Іноді їх розмір може досягати десятків тисяч нуклеотидів, що відповідає протяжності ряду еукаріотних генів.

Після вилучення інтронів та сплайсингу розміри синтезованих РНК значно зменшуються. Одночасно з транскрипцією здійснюється модифікація 5'-кінця РНК-продукту. При цьому утворюється специфічна нуклеотидна структура — так званий **кеп** (див. рис. 2.12).

До 3'-кінця щойно синтезованого попередника іРНК ядерний фермент **полі(А)-полімераза** добудовує поліаденіловий «хвіст» довжиною 150—200 нуклеотидів. Зазначена добудова 5'- і 3'-кінців про-іРНК необхідна для її збереження, нормального сплайсингу і трансляції.

Механізми сплайсингу та методи їх дослідження

Транскрипція екзонів і інтронів складного еукаріотного гена здійснюється у послідовності, яка відповідає розташуванню цих

елементів у ланцюгу ДНК (колінеарна транскрипція). Після цього інтрони у складі транскриптів вирізаються, а екзони зшиваються по схемі кінець в кінець (сплайсинг). Порядок вирізання інтронів із проРНК може бути іншим, ніж їх розташування в гені. Це досить легко виявити з допомогою методу Нозерн-блотингу РНК або аналогічного йому блотингу ДНК за Саузерном (рис. 6.7). Зондом,

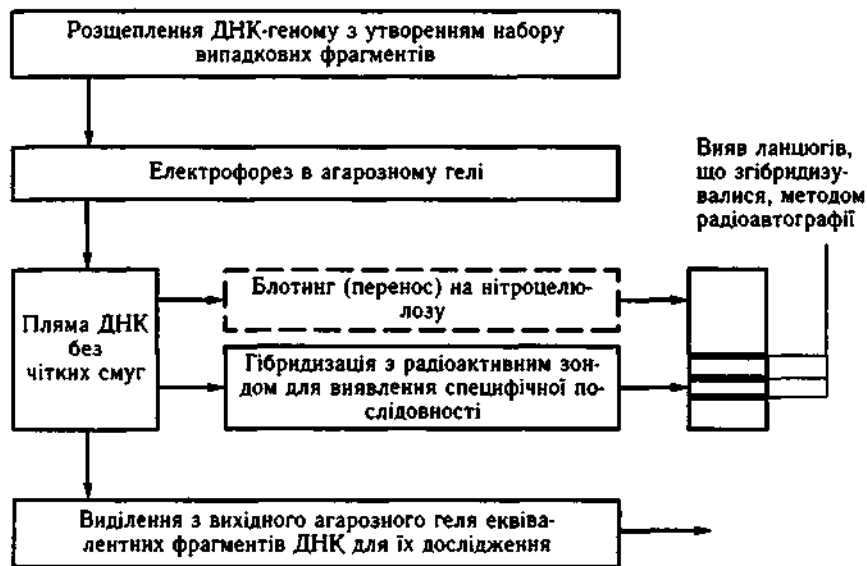


Рис. 6.7. Схема блотингу за Саузерном

який використовується для вияву даної послідовності ДНК або РНК, може бути відповідна кДНК або клонувана послідовність, комплементарна певній ділянці гена (екзону або інтрону).

За аналізу ядерної проРНК із яйцеводу курки з допомогою зонда, специфічного для іРНК овальбуміну, методом електрофорезу в гелі отримали ряд дискретних смуг (рис. 6.8). Смуга РНК, розташована ближче до лінії старту, відповідає проРНК; найбільш рухливою, а тому і найбільш віддаленою від лінії старту є смуга зрілої іРНК. Її висока рухливість пояснюється значно меншими розмірами молекул внаслідок повного сплайсингу. Проміжні продукти зберігають частину інтронів і тому займають проміжне положення на електрофореграмі.

Дуже важлива інформація про розташування інтронів у гені і про порядок сплайсингу може бути отримана з допомогою елект-

ронно-мікроскопічного аналізу молекул індивідуальних ядерних РНК. Молекули цих РНК гібридизують з ДНК інтактного гена, а

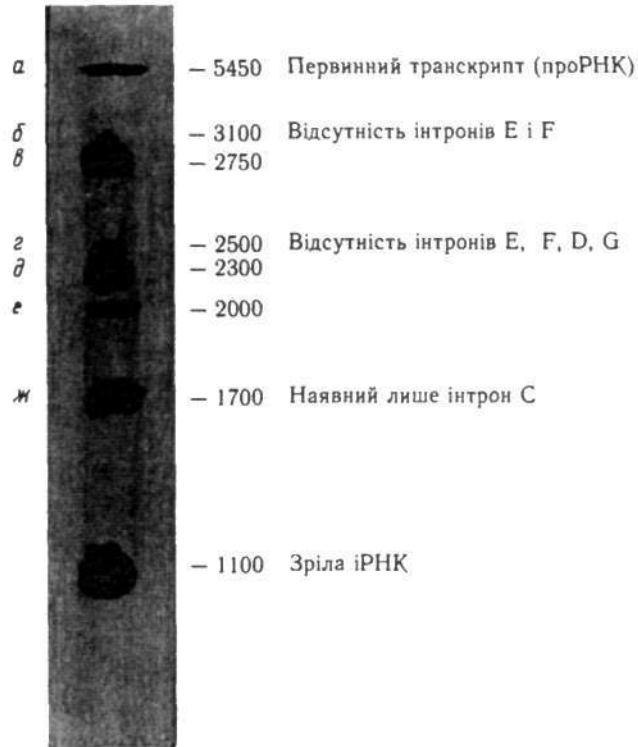


Рис. 6.8. Попередники іРНК для овомукоїду, що виявляються в ядрі блотингом по Нозерну та гібридизацією з зондом

потім визначають, які інтрони в цих РНК вилучені. Кожен вилучений у РНК інтрон призводить до утворення петлі у відповідній ділянці ДНК, яка за даних умов не може гібридизуватися з РНК-продуктом (рис. 6.9). Подібні дослідження показали, що якогось обов'язкового порядку сплайсингу не існує, бо за цього процесу виявляються проміжні продукти, у яких інтрони вилучено в різних варіантах.

З'ясувалося, що дуже часто проміжні продукти сплайсингу поліаденозовані. Це означає, що після завершення транскрипції і до початку сплайсингу по меншій мірі до значної частини молекул на

3'-кінці може бути приєднаний фрагмент полі(А). Тому на 3'-кінці більшості еукаріотних іРНК (виключення складають іРНК гістонів)

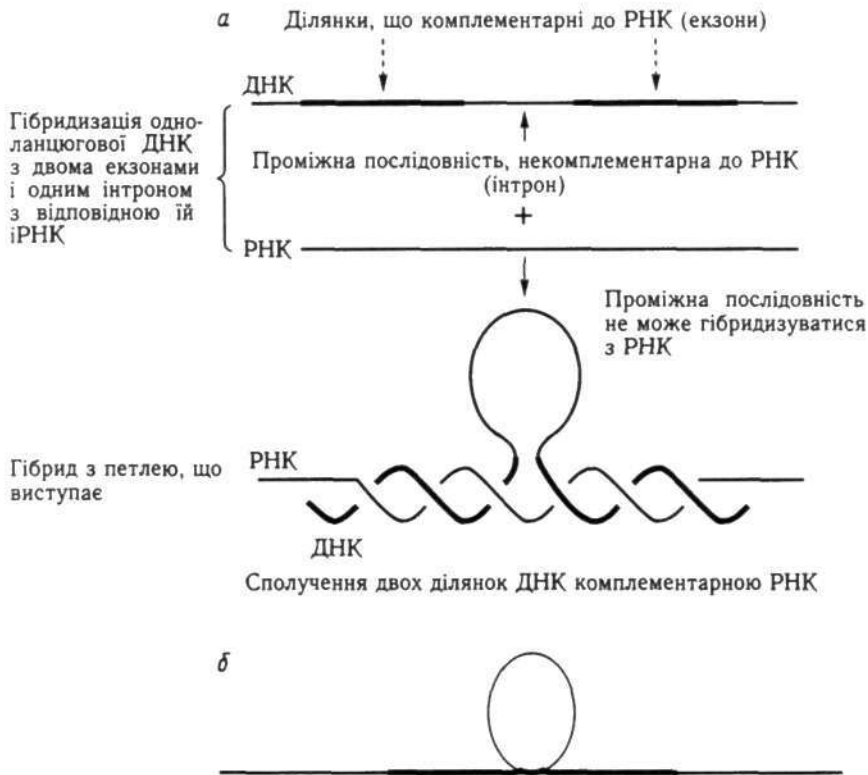


Рис. 6.9. Виявлення інтрона в одноланцюговій ДНК методом її гібридизації з відповідною РНК (а) та з допомогою електронної мікроскопії (б)

знаходиться послідовність із приблизно 150—200 залишків аденілової кислоти.

Послідовність нуклеотидів в інтроні розпочинається, як правило, з нуклеотидів GT на 5'-кінці і закінчується нуклеотидами AG в 3'-кінці інтрона (див. рис. 6.6, б). Відповідно в проРНК послідовність інтрона утримує на кінцях GU і AG. Існує думка, що крім інших умов, для правильного сплайсингу необхідна наявність згаданих канонічних динуклеотидів на межах інтрона: будь-які їх заміни призводять до істотних порушень сплайсингу, багато з яких є летальними.

У людини відома аутосомна рецесивна мутація в гені фенілаланінгідроксилази, який містить 12 інтронів. Єдина заміна на 5'-кінці 12-го інтрона, яка перетворює канонічний динуклеотид GT на AT, порушує сплайсинг і процесинг. Виникаюча аберантна РНК без кінцевого екзона кодує неповний поліпептид, який швидко розпадається в клітині. В гомозиготному стані зазначена мутація призводить до спадкової хвороби у людей — фенілкетонурії, яка проявляється у дітей порушеннями обміну фенілаланіну, затримкою розвитку і ранньою летальністю за відсутності спеціальної дієти. Мутації, що призводять до порушення сплайсингу, є причиною і деяких інших спадкових хвороб, наприклад, β^0 -таласемії, за якої завсім не утворюється β -глобін, а також деяких β^+ -таласемій, в основі яких лежить аномальна структура β -глобуліну.

Ці та інші порушення сплайсингу вказують на те, що вище зазначені канонічні динуклеотидні послідовності дуже істотні для розпізнавання меж екзон-інтрон. Вважають, що фермент сплайсингу (**матураза**) специфічно розпізнає або безпосередньо ці канонічні послідовності, або ту вторинну структуру, яка виникає після спаровування кінцевих послідовностей інтрона з принаймні шістьма типами малих ядерних РНК (мяРНК). Ці РНК збагачені уридином, тому їх називають *u*РНК: U1, U2, U3 і т. д. Вважають, що за рахунок часткової комплементарності 5'-кінця *u*РНК до лівого та правого кінців інтрона утворюється досить складна розгалужена структура, яка є необхідною для реакції сплайсингу.

Процесинг попередників іРНК в ядрі здійснюється з участю білків. Гігантські ядерні транскрипти разом з ядерними білками утворюють структури типу «бусин на нитці», які легко руйнуються рибонуклеазами. Упаковка довгих ядерних транскриптів у складі рибонуклеопротеїдних комплексів необхідна для правильного процесингу і сплайсингу. Результатом такої упаковки є **сплаймосома**, яка містить *u*РНК, білки і субстрати сплайсингу. Для утворення сплаймосоми *in vitro* необхідний АТР.

Альтернативний сплайсинг і транссплайсинг

Встановлена мінливість утворення декількох різних типів іРНК внаслідок зміни порядку сплайсингу одного і того ж первинного транскрипту. Для окремих про-РНК показані так звані **альтернативні** шляхи сплайсингу, оснований на використанні різних екзонів (а деколи і інтронів) при утворенні зрілої РНК. В ряді випадків окрема послідовність нуклеотидів у гені слугує екзоном за одного варіанту сплайсингу і інтроном — за іншого. Таким чином, різні способи експресії одного і того ж гена можуть при-

зводити до утворення різних поліпептидів (так званих ізотипів або ізоформ).

Вперше можливість використання інтрона як значущої послідовності була виявлена за альтернативного сплайсингу первинного транскрипту мітохондріального гена цитохрому *b* у пекарських дріжджів. Цей ген складається із шести екзонів (B1, B2, B3 і т. д.) і п'яти інтронів, деякі з яких містять довгі і не завжди ідентифіковані рамки зчитування. Мутації в одному з інтронів впливають на сплайсинг проРНК зазначеного гена цитохрому *b*. Виявилося, що білок матураза, який вирізає другий інтрон у гені, частково цим же інтроном і кодується. Інформаційна РНК, що кодує цей білок, включає екзони B1, B2 і рамку зчитування другого інтрона. В іншому варіанті сплайсингу зшиваються одна з одною послідовності всіх шести екзонів, а послідовності інтронів вилучаються; в цьому випадку утворюються іРНК цитохрому *b*.

Іноколи альтернативний сплайсинг істотно збільшує кількість різних іРНК, що транскрибуються з одного гена, а, отже, і кількість ізотипів білкових молекул. Прикладом може бути експресія гена тропоніну ссавців, який складається з 18 невеликих екзонів і кодує численні ізоформи цього білка м'язів. Шляхом альтернативного сплайсингу утворюються різні типи α - і β -тропонінів, які виявляються в різних тканинах на певних стадіях індивідуального розвитку. Є підстави вважати, що шляхом альтернативного сплайсингу може регулюватись експресія чималої кількості генів.

Механізми регуляції альтернативного сплайсингу з'ясовані лише в окремих випадках. Прикладом може бути дрозофіла, у якої складний процес визначення статі здійснюється з участю генів *Sex lethal (Sxl)* і *transformer (tra)*. У самців, у яких немає білка *Sxl*, і у самок, які мають цей білок, сплайсинг про іРНК гена *tra* здійснюється по-різному, і тільки у самок утворюється функціонально активний *Tra*-білок, який трансформує стать.

Принципово важливими є окремі дослідження, результати яких свідчать про наявність у еукаріотів окремих випадків транс-сплайсингу. Так називають процес об'єднання в одній молекулі іРНК екзонів, що походять від первинних транскриптів різних генів. Ці гени можуть бути належністю навіть різних хромосом. Встановлено, що ряд іРНК трипаносом, наприклад іРНК білків цитоскелету — тубулінів, утворюються шляхом сплайсингу фрагментів РНК, транскрибованих з «міні-екзонів» (35 п. н.) і значно більших за розміром екзонів «тіла». Міні-екзони і екзони «тіла» іРНК можуть міститися в різних хромосомах. Молекулярні механізми транс-сплайсингу нічим не відрізняються від тих, що діють за внутрішньо-молекулярного сплайсинг-процесу.

Існування транс-сплайсингу і альтернативного сплайсингу дуже розширює можливості утворення різноманітних іРНК в клітині на матриці обмеженої кількості генів і збільшує ступінь економічності еукаріотних геномів.

«Перетасовка» екзонів за рахунок альтернативного сплайсингу, мутації на межі інтрона і екзона, багато інших причин можуть призводити до появи принципово нових білків, що можуть мати істотне адаптивне значення. Можливе неповне порушення сплайсингу на межі інтрон-екзон; в цьому випадку ген може кодувати зразу два білки — новий і старий, які і виносяться на суд еволюції.

6.1.5. Основні шляхи регуляції транскрипції

Інтенсивність транскрипції в значній мірі визначає експресію того чи іншого гена. Не дивно, що в клітині існує чимало механізмів регуляції цього важливого молекулярногенетичного процесу. В основному регуляція здійснюється на рівні промоторів, термінаторів, атенуаторів та інших цис-активних ділянок ДНК. Деякі конкретні приклади такої регуляції у вірусів, прокаріотів та еукаріотів наводилися раніше (розділ 3).

Зараз наведемо лише деякі узагальнення із досліджень системи регуляції транскрипції на рівні промоторів, термінаторів та інших цис-активних ділянок геному. В основному це результати досліджень на *E. coli* та інших прокаріотах.

Регуляція функції промоторів

Білки, що активують промотор і здійснюють позитивну регуляцію транскрипції, називаються **активаторами**. Прикладом може бути білок-активатор катаболітних оперонів (скорочено БАК або CAP), який в комплексі з циклічним АМР (сАМР) активує транскрипцію великої кількості оперонів бактерій, відповідальних за використання різних субстратів, насамперед цукрів. БАК складається з двох ідентичних субодиниць, кожна з яких утворює два домени. За зв'язок з ДНК відповідає С-кінцевий домен. N-кінцевий домен БАК зв'язується з сАМР.

Ділянки зв'язування БАК у різних промоторах не однакові, але дуже подібні. В різних промоторах вони розташовані неоднаково по відношенню до стратових точок транскрипції (рис. 6.10).

Механізм дії БАК-білка не зовсім з'ясований, проте вважають, що істотне значення мають взаємовідносини цього білка з іншими регуляторами, а також з РНК-полімеразою. Інколи БАК може ви-

ступати як репресор транскрипції. Так, в галактозному опероні *E. coli* знайдено два промотори: P1, який стимулюється БАК-білком, зв'язаним з сАМР, і P2, який репресується БАК.

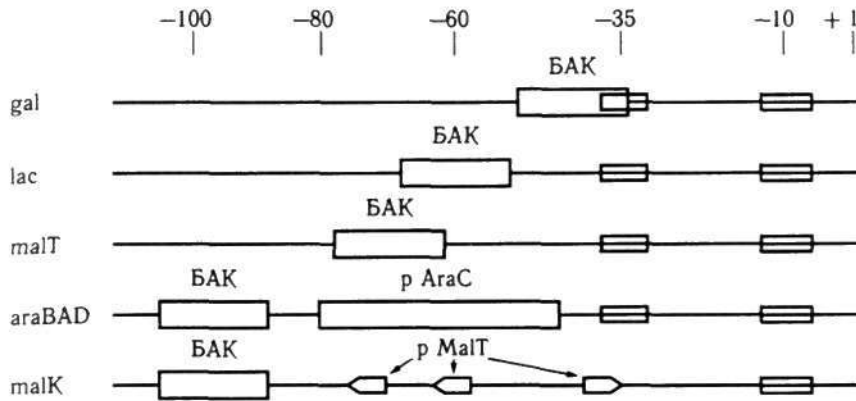


Рис. 6.10. Розташування ділянок зв'язування БАК у промоторах деяких катаболітичних оперонів *E. coli*

В деяких оперонах, крім ділянок зв'язування комплексу БАК-сАМР, є також ділянки для приєднання специфічних білків-активаторів відповідних промоторів. Ці білки кодується окремими генами (*malT*, *araC* та ін.). В протилежність загальній регуляції з допомогою БАК-сАМР, регуляція функцій промотора зазначеними специфічними білками відноситься до механізмів **індивідуальної регуляції** катаболітичних оперонів.

Білки, що здійснюють негативну регуляцію активності промотора, називаються **репресорами**. Послідовність ДНК, до якої приєднується репресор, називається **оператором**.

Оператори (їх позначають буквою *O*) спершу були ідентифіковані завдяки відкриттю так званих конститутивних мутантів (*O^c*). Особливістю мутантів *O^c* є те, що суміжні з мутантним оператором структурні гени функціонують постійно і не підлягають регулюючим впливам білка-репресора. *Послідовності нуклеотидів, функція яких полягає у приєднанні до себе регуляторних білків або РНК, внаслідок чого змінюється швидкість транскрипції в суміжних структурних генах, називаються цис-домінантними або цис-активними.* Оператори — типові цис-домінантні послідовності.

Структура оператора і його локалізація щодо промотора та структурних генів дуже відрізняється в різних оперонах. Так, наприклад, у випадку *lac*-оперона кишкової палички оператор є по-

слідовністю із 26 п. н., що розташована зразу ж за промотором і перед першим структурним геном *lac*-оперона (див. рис. 3.10).

Зовсім по-іншому локалізований оператор триптофанового оперона, який лежить повністю в межах промотора (див. рис. 3.11). Точки контакту з репресором розташовані симетрично на дволанцюговій ДНК між нуклеотидами (-23) і (-3). Оператор, як і чимало інших регуляторних ділянок, містить зону подвійної симетрії.

Хоч взаєморозташування операторної і промоторної областей в опероні *trp* і в опероні *lac* різні, загальний механізм репресії практично однаковий: приєднання РНК-полімерази і приєднання репресора до ДНК є взаємно виключаючими подіями.

Здатність багатьох репресорів зв'язуватись із специфічними цис-активними ділянками ДНК (операторами) залежить від низькомолекулярних лігандів — **ефекторів**. Якщо ефектор зменшує спорідненість репресора і оператора, то його називають **індуктором**. За відсутності індуктора репресор зв'язується з оператором і репресує промотор (транскрипція не розпочинається). В комплексі з індуктором репресор втрачає активність (не зв'язується з оператором), внаслідок чого промотор активується (індукується). Такий тип регуляції властивий лактозному оперонові (розділ 3.3). Є репресори, які в протилежність зазначеним, з'єднуються з оператором лише в комплексі з ефектором (**корепресором**). В цьому випадку наявність корепресора призводить до виключення промотора, а його відсутність активує промоторну функцію. Саме так регулюються репресибельні оперони, прикладом яких є триптофановий оперон *E. coli*.

Найімовірнішим механізмом впливу активаторів і репресорів є стеричні взаємовпливи між промотором і сусідніми цис-активними ділянками ДНК. Відомо, що в багатьох промоторах ділянка зв'язування репресора перекривається з ділянкою зв'язування РНК-полімерази. Білок-активатор може приєднуватися до промотора поряд з РНК-полімеразою і взаємодіяти з нею безпосередньо, сприяючи утворенню відкритого промоторного комплексу.

В меншій мірі з'ясовані механізми дії тих білків-регуляторів, які приєднуються до ДНК на значній відстані від РНК-полімерази. Відомо, що функціональний стан деяких промоторів активується наявністю у складі ДНК певних послідовностей, які можуть міститися за межами промотора і досить далеко (більше 1000 п. н.) від стартової точки. Ці послідовності (підсилювачі або **енхансери**) вперше були відкриті у складі геномних ДНК деяких вірусів. З'ясувалося, наприклад, що ДНК вірусу SV40 містить дві однакові послідовності з 72 п. н., розташовані тандемно на відстані 200 п. н. лівіше стартової точки одного із транскриптонів. Вилучення цих

72-членних послідовностей зменшує ефективність транскрипції. Згодом були знайдені енхансери й іншої будови. Цікаво, що штучне перенесення енхансера із одного об'єкта до іншого часто супроводжується збереженням його функції, що використовується в генній інженерії для підсилення транскрипції з тих чи інших генів.

Механізми регуляції роботи промотора за участю просторово віддалених цис-активних послідовностей ДНК можна пояснити вигинанням ДНК з утворенням петель і зближенням промоторної області оперона з іншими регулювальними ділянками. Так, наприклад, в лактозному опероні, крім оператора, є ще два псевдооператори, які розташовані на деякій відстані: один з них міститься в середині гена *lacI*, який кодує лактозний репресор, другий — в середині гена β -галактозидази.

Стабілізація комплексу репресора з оператором може бути наслідком того, що одна молекула репресора може одночасно взаємодіяти з оператором і псевдооператором. ДНК між цими двома цис-домінантними ділянками вигинається з утворенням петлі (рис. 6.11).

Утворення петель спостерігається також за репресії галактозного, арабінозного (*araBAD*) та інших оперонів. На прикладі галактозного оперона показано, що приєднання молекул репресора одночасно до двох існуючих операторів призводить до утворення петлі ДНК і повного виключення транскрипції, хоч зв'язування БАК і РНК-полімерази з промотором не порушується.



Рис. 6.11. Утворення петлі ДНК за кооперативної взаємодії репресора з операторними ділянками O_{R1} і O_{R2}

Системна регуляція ініціації транскрипції у бактерій і вірусів за допомогою σ -фактора

За звичайного поділу клітин бактеріальна РНК-полімераза залишається незмінною. Один і той же фермент транскрибує всі гени і, отже, здатний розпізнавати широке коло промоторів. Ефективність транскрипції з певного промотора регулюється шляхом численних модифікацій, що впливають на специфічність або активність РНК-полімерази. Однак у життєвому циклі бактерій іноді відбуваються і докорінні зміни, за яких спостерігається виключення транскрипції з одних промоторів і включення зовсім інших одиниць

транскрипції. В цих випадках вносяться довгострокові зміни безпосередньо в РНК-полімеразу. Вони полягають у тому, що у складі холоферменту здійснюється заміна одних σ -факторів на інші, хоч мінімальний фермент не змінюється.

Вважають, що цей механізм регуляції має системний характер і використовується в природі не дуже часто. Проте він необхідний за спорування або споруляції у бактерій, за розвитку загальної неспецифічної реакції — теплового шоку, за літичної інфекції клітин бактеріофагом та в деяких інших випадках.

Спорування властиве ряду бактерій, наприклад *B. subtilis*. Це процес, альтернативний звичайному життєвому циклу бактерії. За споруляції виявляються значні зміни в біосинтетичних реакціях; в цьому приймає участь велика кількість структурних генів. У кінці споруляції біля 40% бактеріальних іРНК — специфічні саме для цієї стадії, а 60% залишаються тими ж, що й для вегетативної фази росту.

РНК-полімеразі *B. subtilis*, яка забезпечує звичайний вегетативний розвиток, властива така ж субодинична структура, як і ферментові *E. coli*, — $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Сигма-фактор РНК-полімерази *B. subtilis* має молекулярну масу 43 кДа (σ^{43}) і виконує ті ж функції, що й σ -фактор у *E. coli*. В спорулюючих клітинах можна виявити ще три форми σ -субодиниці РНК-полімерази — σ^{32} , σ^{30} і σ^{29} . Заміна σ^{43} на σ^{32} у складі холоферменту — досить складний процес, що потребує участі інших білків, проте без цього неможлива транскрипція гена, який запускає процес споруляції.

Через чотири години після початку споруляції в клітинах з'являється σ^{29} , асоційована з мінімальним ферментом. Така РНК-полімераза може транскрибувати чимало нових генів, необхідних для утворення спор.

Таким чином, всі три форми РНК-полімерази транскрибують набори генів, функції яких взаємно перекриваються. Кожний фермент транскрибує одні гени, але не може транскрибувати інші, тому спорування — це процес, який вимагає послідовної функції зазначених РНК-полімераз.

Іншим запрограмованим у часі і незворотним процесом, який передбачає послідовне включення і виключення великих груп генів з допомогою різних σ -субодиниць, є **розвиток бактеріофагів**, наприклад, фага SP01. Це крупний вірулентний фаг, що вражає *B. subtilis*. Його літичний цикл можна розділити на три стадії залежно від того, які гени в цей час експресуються. Зразу ж після інфекції транскрибуються ранні гени, через 4—5 хв їх транскрипція припиняється і розпочинається транскрипція середніх генів, а на 8—12 хв функціонують лише пізні гени.

Ранні гени фага транскрибуються РНК-полімеразою бактерії-хазяїна ($\alpha_2\beta\beta'\sigma^{43}$). Щодо транскрипції середніх і пізніх генів, то в цьому випадку необхідна експресія геному фага і в першу чергу трьох регуляторних фагових генів 28, 33 і 34, які контролюють послідовність транскрипції. Регуляція здійснюється послідовно; при цьому спочатку бактеріальний фермент транскрибує ранній ген, продукт якого необхідний для функціонування середніх генів. В свою чергу продукти деяких середніх генів необхідні для транскрипції пізніх генів.

Мутанти, дефектні по ранньому гену 28, нездатні транскрибувати середні гени. Продукт цього гена (позначається як gr^{28}) приєднується до мінімального ферменту і замінює сигма-фактор. Новий холофермент, що при цьому утворюється, специфічно транскрибує середні гени. Отже, єдиною подією, яка необхідна для переключення транскрипції з ранніх генів на середні, є заміна бактеріального фактора σ^{43} на фаговий gr^{28} (іноді його називають $\sigma^{gr^{28}}$).

Два середніх гени — 33 і 34 — забезпечують наступне переключення транскрипції з середніх генів на пізні. Продукти цих генів (білки gr^{33} і gr^{34}) витісняють gr^{28} із молекули РНК-полімерази і приєднуються замість нього до мінімального ферменту, виконуючи при цьому функцію нового σ -фактора, здатного розпізнавати промотори пізніх генів.

Таким чином, послідовна заміна сигма-факторів обумовлює здатність РНК-полімерази розпізнавати промотори нових класів генів і розпочинати їх транскрипцію. Одночасно припиняється зчитування тих ділянок ДНК, на яких цей процес йшов до цього. Внаслідок таких переключень здійснюються системні зміни в активності РНК-полімерази і забезпечується нормальний розвиток фагової інфекції.

Регуляція транскрипції на рівні термінаторів

Роль термінаторів полягає в зупинці синтезу РНК в кінці оперонів, що забезпечує незалежну регуляцію експресії різних ділянок ДНК. Існують і такі термінатори, які містяться в середині оперонів. Вони можуть плавно змінювати ефективність транскрипції відповідних генів за допомогою специфічних білкових факторів і рибосом.

У відсутність ρ -фактора РНК-полімераза здатна закінчувати синтез РНК лише на **ρ -незалежних термінаторах**. У них по ходу транскрипції спершу йде GC-багата послідовність з центральною симетрією (див. рис. 6.1), а потім послідовність із 4—8 розташованих підряд залишків А в кодогенному ланцюгу. Транскрипція закінчується на кінці олігоА-послідовності або ж зразу за нею. Вважають, що після проходження РНК-полімеразою GC-багатої

ділянки з інвертованими повторами в РНК-продукті виникає шпилька, що й призводить до зупинки РНК-полімерази і вивільнення РНК із гібриду РНК-ДНК транскрибуючого комплексу. Цьому сприяє нестабільність ділянки гібридних послідовностей олігоА(ДНК) — олігоU(РНК), яка локалізується зразу ж за шпилькою. Виявлено білковий фактор тау (τ), який підвищує ефективність і точність термінації на ρ -незалежних термінаторах.

Численні ρ -залежні термінатори пізнаються РНК-полімеразою лише за допомогою фактора ρ (м. м. 46 кДа), який виявляє РНК-залежну нуклеозидтрифосфатазну активність за умов утворення фактором ρ комплексу з одонитковою РНК. Вважають, що фактор ρ сприяє витісненню РНК із транскрипційного комплексу завдяки гідролізу NTP, що призводить до конформаційної перебудови фактора ρ .

Внутрішні термінатори оперонів (атенуатори) здатні плавно регулювати рівень транскрипції, як це було показано на прикладі триптофанового і гістидинового оперонів *E. coli* (розділ 3.3.1). Перед атенуатором, який міститься в лідерній послідовності ДНК, є декілька послідовностей з центральною симетрією. Лідерна РНК, що на них синтезується, утримує чотири ділянки послідовностей, здатних утворювати шпильки в різних варіантах поєднання цих ділянок (див. рис. 3.12).

Утворення альтернативних шпильок у лідерному транскрипті, від яких залежить атенуація, визначається тим, в яких умовах транслюється лідерна РНК і як поводять себе рибосоми на лідерному транскрипті (розділ 3.3.1).

Іноді атенуатор може регулюватись і без трансляції лідерної РНК. Так, лідерний транскрипт триптофанового оперона *B. subtilis* не кодує лідерного пептиду, однак ефективність атенуації залежить від концентрації триптофану у середовищі. Вважають, що утворення термінаторної шпильки в лідерній РНК у цьому випадку визначається спеціальним білком, який приєднується до лідерного транскрипту і блокує формування антитермінаторної шпильки (див. рис. 3.12).

Є і інші механізми регулювання функцій термінаторів. Нагадаємо про існування антитермінаторного механізму регулювання транскрипції, який властивий геномам фагів (розділ 3.2). Як уже зазначалося, зчитування інформації з певних генів фага λ здійснюється шляхом виключення ρ -залежних і ρ -незалежних термінаторів завдяки дії білка, який кодується геном *N*. Крім фагового *N*-білка, в антитермінації приймають участь по меншій мірі три білкових продукти клітини-хазяїна, із яких краще вивчений білок, що кодується геном *nusA*. Цей білок здатний взаємодіяти з мінімальною

РНК-полімеразою, займаючи в ній місце σ -субоднинці. Приєднання білків-антитермінаторів до РНК-полімерази здійснюється в той момент, коли фермент проходить спеціальний сигнал антитермінації, так звану ділянку *nut*. Вона розташована між промотором і термінатором в нетрансльованій частині транскриптона. Після приєднання білка NusA, ρ -фактора та інших білків РНК-полімераза набуває особливу конформацію, яка дозволяє їй нехтувати будь-якими сигналами термінації, що розташовані після ділянки *nut*.

Цікаво, що ділянки, подібні до *nut*-ділянок фага λ , знайдено також у деяких оперонах хромосоми *E. coli*, а саме в оперонах рРНК. Для запобігання термінації в непотрібних місцях (наприклад, в середині гена рРНК) існує система антитермінації, яка формується на початку оперона, але ще мало вивчена.

6.1.6. Особливості реплікації/транскрипції геномів РНК-вірусів

Як вже зазначалося (розділ 3.2), крім одноланцюгових плюс- і мінус-РНК геномів, у вірусів бувають і дволанцюгові [+/-] геномні РНК; зазначені геноми вірусів можуть бути сегментованими і не-сегментованими. Ці особливості структурної організації вірусних геномів обумовлюють різноманітність стратегій як в процесах подвоєння (реплікації) РНК-геномів, так і в процесі зчитування інформації з відповідних генів.

Вірусні одноланцюгові (+)РНК-геноми звичайно кодуєть декілька білків і часто інформація міститься в одній молекулі РНК. У РНК-вміщуючих фагів кожний цистрон (ген) поліцистронної матриці може зчитуватись незалежно з утворенням окремого білка (рис. 6.12, а). У вірусів еукаріотів більш розповсюдженим явищем є реалізація однієї із таких стратегій:

а) в єдиній молекулі РНК кодується крупний поліпептид — попередник («поліпротеїн»), із якого шляхом обмеженого протеолізу утворюються «зрілі» білки вірусу (рис. 6.12, б);

б) утворення в циклі реплікації/транскрипції, крім повномірних (+) і (-) ланцюгів, також і більш коротких — субгеномних (+)РНК, локалізація ініціюючого триплета в яких може відрізнятися від локалізації такого триплета в геномній (+)РНК (рис. 6.12, в).

Фрагментованість РНК-геномів деяких вірусів не виключає можливості одночасного синтезу поліпротеїнів-попередників і субгеномних іРНК (рис. 6.12, г).

Серед вірусів, які обходяться без утворення субгеномних іРНК, слід назвати дрібні РНК-вміщуючі фаги, наприклад, фаг Q β .

а серед вірусів еукаріотів — пікорнавіруси, наприклад вірус поліомієліту.

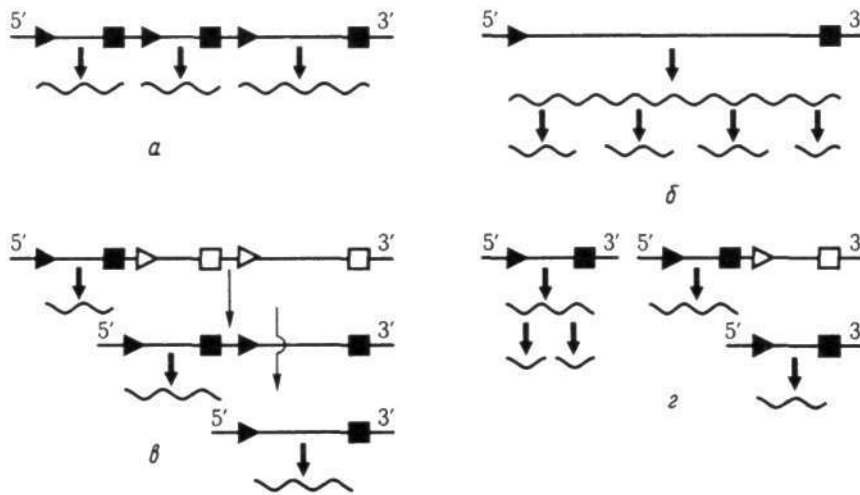


Рис. 6.12. Трансляційні «стратегії» вірусних (+)РНК геномів (за О. С. Спіріним):

а — незалежна транскрипція і трансляція окремих цистронів, б — утворення поліцистронної іРНК, синтез єдиного поліпротеїну з наступним розщепленням його на окремі білки; в — використання в ролі іРНК як геномної (+)РНК, так і субгеномних (+)РНК; г — у випадку сегментованих вірусних (+)РНК-геномів може використовуватись як механізм «б», так і механізм «в». Прямі лінії — РНК; хвилясті — поліпептидні ланцюги; трикутники — ініціюючі триплети, квадрати — термінуючі триплети; тонкі стрілки — синтез РНК; жирні — утворення поліпептидних ланцюгів

РНК фага Q β містить ген, продукт якого разом з іншими трьома білками клітини-хазяїна утворює ферментний комплекс — РНК-репліказу (РНК-залежну РНК-полімеразу). Остання є дуже специфічною: із природних РНК цей фермент використовує в ролі матриці лише РНК фага Q β та деяких споріднених вірусів. Для ефективного використання в ролі матриці РНК фага Q β потрібен ще один клітинний поліпептид — так званий «хазяйський фактор». Завдяки тому, що репліказа Q β в присутності «хазяйського фактора» розпізнає як (+), так і (–)ланцюги фагової РНК, на (+)матрицях синтезуються (–)ниті, які в свою чергу використовуються для синтезу (+)ланцюгів. Співвідношення між синтезом (+) і (–)ниток залежить від концентрації «хазяйського фактора»: за його нехватки синтезуються переважно (+)ланцюги.

РНК-реплікаційна система вірусу поліомієліту має явні відмінності від шойно описаної системи фага Q β . Так, на 5'-кінцях ново-

синтезованих (+) і (-)ланцюгів РНК вірусу поліомієліту завжди виявляється низькомолекулярний специфічний білок VPg, якому приписують роль затравки для синтезу обох ланцюгів РНК. Сам синтез здійснюється вірусоспецифічною РНК-полімеразою у складі багатокомпонентного апарату, який включає як вірусні, так і клітинні білки. Можлива схема реплікації геному вірусу поліомієліту зображена на рис. 6.13.

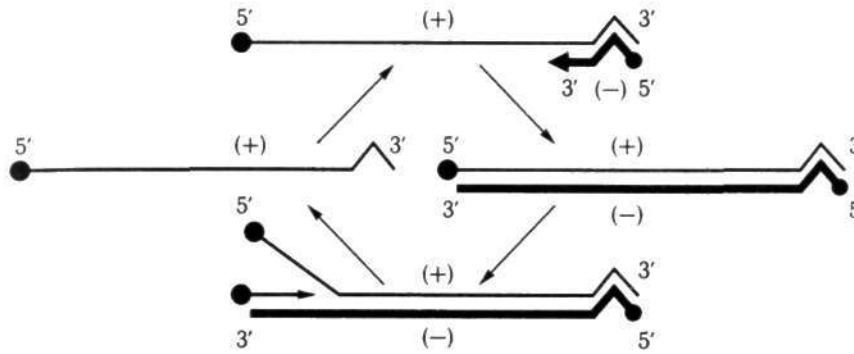


Рис. 6.13. Схема можливої реплікації геному поліомієліту:

Кружок — термінальний білок

Якщо в циклі реплікації/транскрипції утворюються не тільки повнорозмірні (+) і (-)ланцюги, але й субгеномні іРНК, то останні синтезуються на повномірних (-)нитках РНК двома можливими способами.

В одних випадках, наприклад, у альфа-вірусів або у вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ), в (-)ланцюгу РНК є ділянки, які, подібно промоторам, пізнаються РНК-полімеразою і слугують місцем ініціації транскрипції. Якщо субгеномних (+)РНК утворюється декілька, як, наприклад, у ВТМ, то ці субгеномні іРНК відрізняються як довжиною, так і будовою 5'-кінців, оскільки їх синтез розпочинається в різних місцях (-)матриці. В протилежність цьому 3'-кінці субгеномних іРНК однакові і відповідають 3'-кінцеві повномірного (+)ланцюга.

В інших випадках, наприклад, у коронавірусів, всі шість субгеномних (+)РНК мають однакову будову не тільки на 3'-кінці, але й на 5'-кінці. Пояснюється це так (рис. 6.14). Спершу, як і у інших вірусів з (+)РНК-геномами, синтезується комплементарний геному (-)ланцюг РНК. Синтез всіх (+)ланцюгів розпочинається на 3'-кінці (-)матриці, але лише іноді йде до кінця з утворенням повномір-

ного (+)ланцюга. В усіх інших варіантах, тобто за синтезу субгенних іРНК, після утворення 5'-кінцевого «лідерного» сегмента цей невеликий полінуклеотид (містить 70 нуклеотидних залишків)

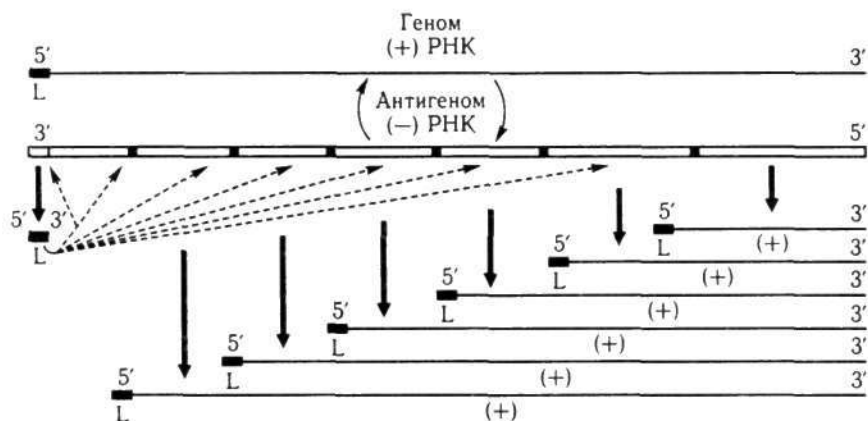


Рис. 6.14. Схема реплікації/транскрипції геному коронавірусів:

Темний прямокутник — 5'-кінцева лідерна (L) нуклеотидна послідовність (+)ниток; чорні смуги в (-)нитці (антигеномі) — ділянки, комплементарні 3'-кінцю лідерного сегмента; жирні стрілки — транскрипція, тоненькі — реплікація. Лідерний сегмент (L) може відокремитись від (-)матриці і приєднатись до однієї з комплементарних ділянок цієї матриці (показано пунктиром), слугуючи затравкою для синтезу різних субгенних іРНК

відділяється від матриці і знову приєднується в тому ж або іншому гомологічному місці (-)РНК. Після цього синтез (+)нитки продовжується і залежно від вибору місця приєднання лідерним полінуклеотидом синтезується або геномна, або одна із субгенних (+)РНК. Повномірні (+)РНК, по-перше, забезпечують синтез білків, що кодуються 5'-кінцевим районом геному, а, по-друге, самі є геномними і включаються в дочірні вірусні частки.

Одноланцюгові (-)РНК-геноми вірусів теж можуть бути як сегментованими, так і несегментованими. Загальною властивістю вірусів з (-)РНК-геномом є наявність у складі інфікуючих вірусних часток готової до роботи РНК-полімерази. Інша особливість цих вірусів полягає в тому, що матрицею для реплікації/транскрипції слугує не вільна РНК, а вірусний рибонуклеопротеїд (РНП) — молекула РНК, рівномірно покрита вірус-специфічним білком.

Несегментований (-)РНК-геном властивий вірусу везикулярно-гомотому (ВВС). Це одноланцюгова РНК довжиною 11 тисяч нуклеотидів. Після проникнення в чутливу клітину субвірусна частка, утримуюча антигеномну РНК, РНК-полімеразу та ще деякі

необхідні білки в готовому стані, звільняється від зовнішньої ліпопротеїдної оболонки і виявляється в цитоплазмі. При цьому зразу ж розпочинається синтез моноцистронних іРНК. РНК-полімераза вірусного РНП розпочинає транскрипцію на 3'-кінці (-)РНК вірусу і просувається в напрямку її 5'-кінця. На межах ділянок (-)РНК, які кодують індивідуальні іРНК, РНК-полімераза наче пробуксовує і шляхом багаторазового копіювання семи залишків уридилової кислоти матриці синтезує 3'-кінцевий полі(А)-сегмент моноцистронної іРНК. Після завершення синтезу полі(А) фермент, пропустивши два «міжгенних» нуклеотиди, розпочинає синтез наступної молекули іРНК. Цікаво, що на 5'-кінці всіх синтезованих іРНК добувається специфічний кеп, який, отже, є характерним не тільки для іРНК еукаріотів.

Після трансляції синтезованих вірусних іРНК і накопичення відповідних білків починається власне реплікація геному ВВС. Спершу синтезуються точні повнорозмірні (+)копії вірусного геному. Це забезпечується взаємодією вірусних білків-антитермінаторів з РНК-полімеразою, після чого фермент перестає «пробуксовувати» в кінці того чи іншого гена і синтезує повнорозмірні (+)РНК. Останні використовуються як матриці для синтезу (-)ланцюгів РНК, що включаються в дочірні віріони.

Прикладом сегментованого (-)РНК-геному може слугувати геном вірусу грипу, який складається із восьми різних молекул (-)РНК довжиною від 900 до 2350 нуклеотидів. Кожен із сегментів РНК покритий головним структурним білком; з цим РНП асоційовано три досить великих поліпептиди — так звані білки Р, здатні синтезувати вірусспецифічні молекули РНК.

Синтез (-)РНК вірусу грипу відбувається в ядрі клітини-хазяїна, що загалом не властиве РНК-вірусам. Крім того, в ролі затравки тут використовуються фрагменти транскриптів клітинних генів. Один із вірусних Р-білків розпізнає кеповані 5'-кінці цих транскриптів і фіксує їх в районі 3'-кінців геномних РНК. Після цього клітинний транскрипт на відстані 10—13 нуклеотидів від 5'-кінця відривається, а виникаючий 5'-кінцевий олігонуклеотид слугує затравкою для синтезу (+)ланцюга вірусної РНК. Таким чином, на 5'-кінцях різних іРНК вірусу грипу містяться гетерогенні олігонуклеотиди клітини-хазяїна, які слугували затравками в РНК-полімеразній реакції. За синтезу іРНК матриця вірусної (-)РНК використовується не повністю. На певній відстані від 5'-кінця цієї матриці (за 20 нуклеотидів) є олігоуридилова послідовність із 5—7 нуклеотидних залишків, на якій вірусна РНК-полімераза пробуксовує і синтезує полі(А)-кінець молекули. Із синтезованих таким чином восьми видів вірусних іРНК шість кодують по одному білку.

а частина молекул двох інших видів іРНК підлягає сплайсингу. В виникаючих внаслідок сплайсингу додаткових видах іРНК використовуються альтернативні відкриті рамки зчитування, що значно збільшує кількість вірусних білків. Зазначені вірусні іРНК (всього утворюється 10 класів цих моноцистронних молекул) переходять у цитоплазму, де і направляють синтез вірусоспецифічних білків. Цілком зрозуміло, що ці молекули неточно відображують первинну структуру (–)РНК вірусу, і тому не можуть бути матрицями для синтезу антигенної РНК. Лише після накопичення в клітині достатньої кількості вірусних білків транскрипція переключається з синтезу неповномірних молекул іРНК на синтез повномірних (+)РНК. Останні у складі вірусоспецифічних РНП використовуються як матриці для синтезу вірусних (–)РНК, що входять до складу вірусних часток.

Відомі і інші віруси як з неперервним, так і з фрагментованим (–)РНК-геномом. Щойно описані принципи реплікації/транскрипції геномної РНК можна простежити і у них. Лише у флебовірусів один із трьох фрагментів геному, а саме так званий S-сегмент, на 5'-кінці являє собою (+)РНК, а на 3'-кінці — (–)РНК. Таким чином, S-сегментові геному флебовірусів не можна приписати певну полярність: відкрита рамка зчитування для одного із білків знаходиться в геномній РНК, а для другого — в комплементарній їй РНК (рис. 6.15).

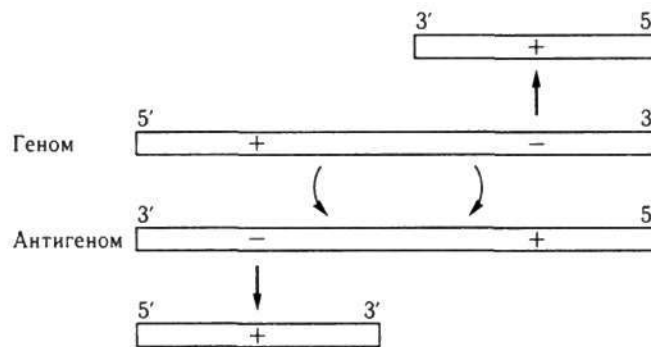


Рис. 6.15. Схема реплікації/транскрипції S-сегмента геному флебовірусів.

Жирні стрілки — транскрипція, тонкі — реплікація

Дволанцюгові РНК-геноми зустрічаються як у вірусів прокаріотів, так і у вірусів еукаріотів. Системи реплікації/транскрипції у різних груп цих вірусів можуть істотно відрізнятися.

Інфікуюча частинка реовірусу містить 10 сегментів двониткової геномної РНК і декілька білків, в тому числі РНК-полімераза. Остання в цитоплазмі ураженої клітини розпочинає асиметричний і консервативний синтез РНК на вірусному РНК-дуплексі, що використовується як матриця. Синтезуються лише (+)ланцюги, які не витісняють із дуплекса батьківські (+)ниті (рис. 6.16). 5'-Кінці новосинтезованих молекул РНК кепуються, в той час як поліаденілування 3'-кінців не відбувається.

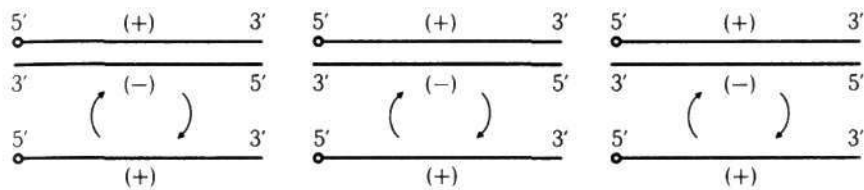


Рис. 6.16. Схема реплікації/транскрипції геному реовірусу:

Кружки — 5'-кінцеві кеп-структури. Показано три із десяти сегментів геному реовірусу

Спершу синтезовані (+)ланцюги виконують роль іРНК: вони направляють синтез вірусних білків. Після їх накопичення починається формування вірусних часток. В одну субвірусну частинку, крім деяких специфічних білків включається повний набір, тобто всі 10 різних видів молекул (+)РНК. Вірусоспецифічна РНК-полімераза є інтегральною складовою субвірусних часток і здійснює синтез дволанцюгових РНК-геномів реовірусу, використовуючи як матрицю (+) ланцюги двониткової РНК. Таким чином, в протилежність деяким раніше розглянутим вірусам у реовірусів матрицею для синтезу як білкових молекул, так і (-)РНК слугують (+)РНК-молекули.

У деяких інших вірусів з двонитковим РНК-геномом (наприклад, у фага $\phi 6$) синтез (+)ланцюгів на батьківському РНК-дуплексі здійснюється з допомогою напівконсервативного механізму. Заново синтезований (+)ланцюг завжди витісняє із матриці-дуплекса її власний (+)РНК ланцюг.

Реплікація віроїдних одноланцюгових кільцевих (+)РНК здійснюється за схемою, представленою на рис. 6.17. Спершу на кільцевій (+)матриці синтезується комплементарний (-)РНК-ланцюг згідно з моделлю рулона, який розмотується. Появляються лінійні олігомерні молекули (-)РНК, які грають роль матриці для побудови олігомерних лінійних (+)РНК. В подальшому утворюються кільцеві мономерні молекули, які і являють собою інфекційну форму віроїдної РНК. Є дані, що перетворення лінійних олігомерів

у кільцеві мономери здійснюється шляхом самосплайсингу по місцях розташування певних гомологічних послідовностей у складі олігомерної молекули.

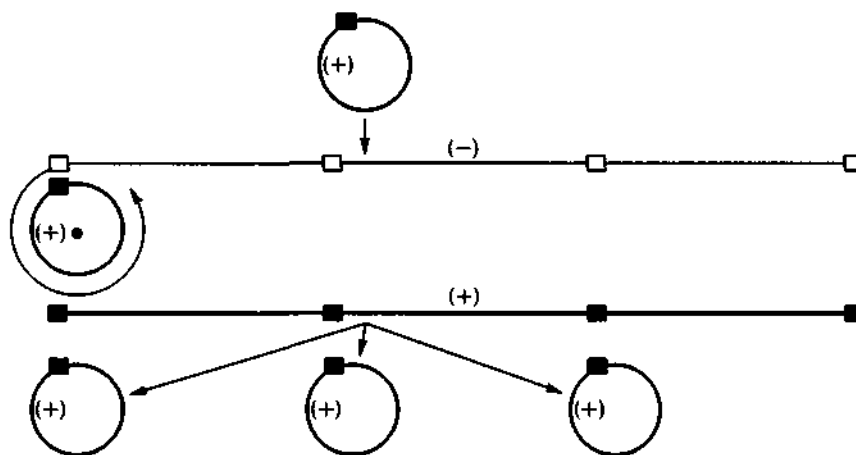


Рис. 6.17. Схема реплікації РНК віроїдів:

Жирні лінії — (+)РНК, тонкі — (-)РНК, прямокутники — ділянки, де здійснюються розриви конкатемера, які супроводжуються циркуляризуючою мономерних РНК

Таким чином, у вірусів використовуються дуже різноманітні стратегії щодо побудови геномних РНК, їх реплікації і транскрипції. Кожна така стратегія має свої переваги і недоліки, які добре збалансовані і тому забезпечують ефективне розмноження вірусних часток у клітині хазяїна.

6.1.7. Зворотна траскрипція і життєвий цикл ретровірусів

Ідея можливості синтезу ДНК на матриці РНК вперше була сформульована українським вченим С. М. Гершензоном на основі деяких теоретичних міркувань та власних спостережень. Експериментальні докази були отримані Г. Темінім і Д. Балтімором (США) в 1970 р. Вони з'ясували, що за репродукції деяких онкогенних РНК-вірусів тварин генетична інформація може передаватись у зворотному напрямку — від РНК до ДНК. Це забезпечується синтезом ДНК на матриці РНК, який отримав назву зворотної транскрипції. Ферменти, що каталізують зворотну транскрипцію, назива-

ються РНК-залежними ДНК-полімеразами або скорочено зворотними транскриптазами (ревертазами).

Зворотна транскрипція грає значну роль в ампліфікації генів, синтезі псевдогенів, транспозиції ретротранспозонів тощо. З практичною метою РНК-залежна ДНК-полімеразна (ревертазна) реакція використовується в генній інженерії для синтезу кДНК, тобто ДНК-копій продуктів генів (РНК) або їх фрагментів. Ці кДНК можуть використовуватись у різних цілях, наприклад, як зонди з метою ідентифікації генів у хромосомах і у виділених препаратах ДНК.

Дослідження, проведені на різних хребетних, показали, що у багатьох із них наявні вбудовані в їх хромосоми геноми ряду ДНК-вірусів (SV40, деяких аденовірусів, вірусу герпесу) і особливо часто — ДНК-копії геномів онкогенних РНК-вірусів, які називаються ретровірусами. Останні являють собою численну групу вірусів, представники якої значно відрізняються морфологією і біологічними властивостями. Проте будова геномів ретровірусів має багато спільного, про що свідчить приклад краще вивчених ретровірусів С-типу:

1. Молекула РНК цих вірусів одноланцюгова, довжиною біля 10 000 нуклеотидних залишків, являє собою (+)ланцюг, керований на 5'-кінці і поліаденілований на 3'-кінці. Отже, ця вірусна РНК своєю будовою дуже нагадує еукаріотну іРНК.

2. В кожному віріоні міститься дві копії РНК-геному, внаслідок чого кожна окрема вірусна частка фактично диплоїдна.

3. На кінцях молекули РНК є прямі кінцеві повтори R, довжина яких коливається в межах від 10 до 80 нуклеотидів у різних вірусів. Поруч з R-сегментом на 5'-кінці вірусного геному знаходиться область U5 із 80—100 нуклеотидів. На 3'-кінці R-сегментові передує унікальний сегмент U3 із 170—1260 нуклеотидів (рис. 6.18).

4. Типова послідовність ретровірусу містить три «гени» — кодуєчі області, кожна з яких несе інформацію про відповідний поліпротеїн. Порядок розташування генів *gag-pol-env* показано на рис. 6.18.

Зворотна транскриптаза (ревертаза), яка кодується геном *pol*, складається із двох субодиниць, одна із яких є фрагментом другої, виникаючи за рахунок альтернативного сплайсингу. Цей фермент виявляє поліфункціональність: він здатний синтезувати ДНК, використовуючи як матрицю РНК або ДНК; крім того, він поводить себе подібно РНКазі Н (руйнує РНК у складі гібриду РНК-ДНК), виявляючи ендонуклеазну активність.

Як і всі інші ДНК-полімерази, ревертаза здатна працювати лише за наявності затравки. Цікаво, що роль затравки за синтезу (-)ланцюга ДНК на матриці вірусної (+)РНК може виконувати

одна із клітинних тРНК. Справа в тому, що на певній відстані від 5'-кінця геномна РНК кожного ретровірусу містить ділянку, комплементарну 3'-кінцевій послідовності молекули тРНК, цю ділянку часто позначають як rbs (від англ. *primer binding site* — ділянка зв'язування затравки). Затравочна молекула тРНК, як і зворотна транскриптаза, знаходиться у складі інфікуючого віріона і попадає в клітину у вигляді комплексу з вірусною РНК.

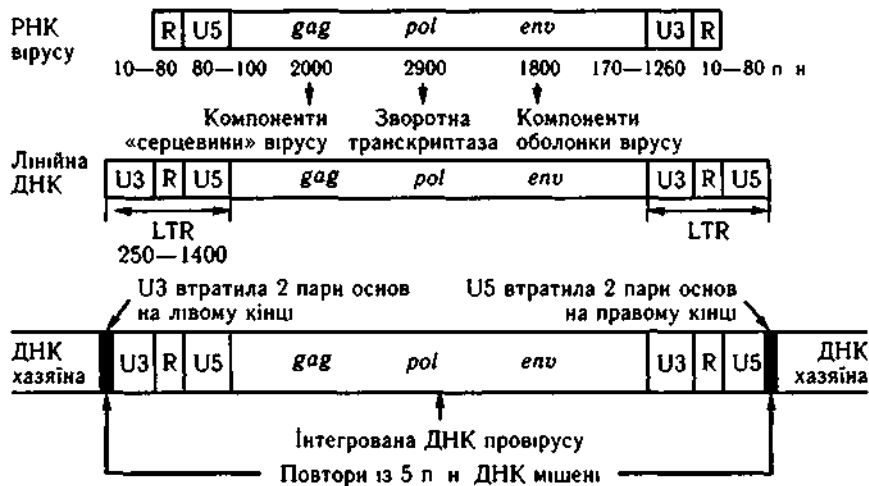


Рис. 6.18 Особливості молекулярної організації геномів ретровірусів і їх ДНК-копій

Якщо порівняти структуру РНК вірусу з ДНК-копією цієї молекули (рис. 6.18), то легко помітити, що кінці лінійної ДНК містять додаткові послідовності. Сегмент U3 додається до 5'-кінця, а сегмент U5 — до 3'-кінця. Внаслідок цього кожний кінець ДНК має пряму послідовність U3-R-U5; вона отримала назву довгого кінцевого повтору (ДКП або LTR). Утворення цієї послідовності на обох кінцях лінійної молекули пов'язане з особливостями ревертазної реакції на матриці вірусної РНК.

Перша стадія зворотної транскрипції полягає в тому, що використовуючи тРНК-затравку, ревертаза синтезує короткий сегмент (–)ланцюга ДНК, який містить послідовності, комплементарні кінцевому повтору R і U5 (рис. 6.19). Після цього 5'-кінець вірусної РНК, що утворював дуплекс з синтезованим сегментом (–)ДНК руйнується ревертазою завдяки властивій їй активності РНКазин Н. Внаслідок цього 3'-кінець новосинтезованого сегмента ДНК вияв-

ляється в одноланцюговій формі і може взаємодіяти з 3'-кінцем тієї ж або іншої молекули вірусної РНК. Така взаємодія стає можливою завдяки тому, що обидва кінці вірусної РНК мають однакову послідовність R.

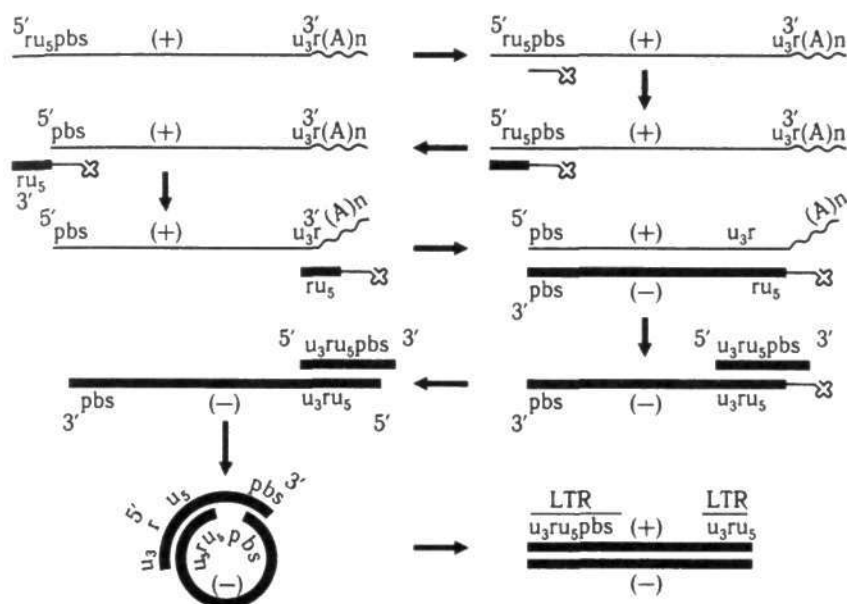


Рис. 6.19. Схема утворення дwonиткової ретровірусної ДНК:

Тонкі лінії — ланцюги РНК; хвилясті — полі(A); хрестоподібна структура — тРНК (затравка); жирні лінії — ДНК

На наступній стадії в ролі затравки вже виступає 3'-кінець синтезованого сегмента (-)ланцюга ДНК, приєднаного до R-повтору на 3'-кінці вірусної РНК. Результатом ревертазної реакції є (-)ланцюг ДНК, який у подальшому використовується як матриця для синтезу (+)ланцюга молекули. Затравкою слугує попередньо синтезований сегмент (+)ланцюга, що має будову 5'-U3RU5pbs-3'. Вихідна затравка — молекула тРНК — вилучається завдяки активності РНКазы Н; цим же ферментом, тобто ревертазою, руйнуються і залишки вірусної РНК. На заключному етапі синтезу здійснюється циркуляризація (-)ланцюга ДНК шляхом взаємодії між комплементарними послідовностями в згаданому затравочному (+)сегменті і на обох кінцях (-)ланцюга синтезованої ДНК. Виникаюча проміжна форма зручна для завершення синтезу дволанцюгової вірусної

специфічної ДНК з кінцевими ДКП-повторами. Ці лінійні молекули утворюються в цитоплазмі заражених клітин, але дуже швидко вірусна ДНК виявляється в ядрі, де лінійні молекули перетворюються в кільцеві.

Після утворення кільцевої молекули в місцях стикування двох ДКП виникає короткий недосконалий інвертований повтор. Останній виконує роль сайту *att*, тобто специфічної ділянки інтеграції. Вірусоспецифічний фермент, який попадає в клітину у складі інфікуючого вірусу, вносить в обидва ланцюги вірусної ДНК розриви на відстані 4 нуклеотидів один від одного. Цей же фермент розрізає також обидва ланцюги клітинної ДНК з уступом із 4—6 нуклеотидів. Механізм інтеграції вірусної ДНК у хромосому клітини-хазяїна, тобто розтини ланцюгів ДНК і воз'єднання гетерологічних нуклеотидних послідовностей, здійснює один і той же фермент — особлива **топоізомераза (інтеграза)**. Цей процес дуже нагадує транспозицію фага *Mu* в геномі *E. coli*, а також переміщення ретропозонів і ретротранспозонів в еукаріотних геномах (розділ 11.6.3).

Інтеграція ДНК ретровірусів і ДНК клітини-хазяїна супроводжується процесами локальної репарації, що призводить до появи коротких (4—6 п. н.) прямих повторів клітинної ДНК з обох сторін інтегрованого вірусного геному, а також до втрати двох нуклеотидів у кінці кожного ДКП. Область U3 кожного ДКП містить промотор. Промотор лівого ДКП (LTR) відповідає за ініціацію транскрипції провірусу. Приблизно за 25 п. н. до стартової точки транскрипції (до R) знаходиться властивий промоторам ТАТА-елемент, за 75 п. н. — СААТ-елемент і за 100—300 п. н. — енхансер. У різних ретровірусів ефективність дії енхансера може бути різною, а у онкогенних ретровірусів вона може корелювати із здатністю вірусу викликати злоякісне переродження клітин. Іноді (досить рідко) промотор у правому ДКП сприяє транскрипції послідовності хазяїна, яка прилягає до сайту інтеграції вірусної ДНК. Інтеграція геному ретровірусу може обумовлювати пухлинну трансформацію клітин шляхом активації певних типів клітинних генів.

Первинні транскрипти провірусу підлягають звичайним пост-транскрипційним модифікаціям: поліаденілуванню 3'-кінця (в районі R є сигнал поліаденілування), утворенню кепа на 5'-кінці та сплайсингу. Частина молекул первинного транскрипту не підлягає сплайсингу; в цитоплазмі клітини-хазяїна вони функціонують як іРНК для деяких білків і, крім того, включаються у віріон.

Таким чином, утворення ДНК-копії РНК-геному ретровірусу шляхом зворотної траскрипції, інтеграція цієї ДНК (однієї або декількох молекул) у хромосоми клітини-хазяїна, транскрипція

інтегрованої вірусної ДНК з наступною трансляцією — це обов'язкові стадії розвитку вірусної інфекції. Однак інколи (за інтеграції ретровірусу в клітину зародкової лінії) ефективної експресії його геному не спостерігається; він здатний перетворитись у спадковий ендегенний вірус організму. Такий стан вірусу найкраще досліджений у мишей і курчат, геноми яких несуть неактивні ендегенні віруси. Інколи ці провіруси активуються зовнішніми факторами; одним із таких факторів може бути інший вірус.

За виникнення пухлинних клітин можуть бути відповідальними як вірусні, так і клітинні *onc*-гени (онкогени). Гени *onc*, що належать геномам ретровірусів, отримали назву *v-onc*, і саме вони надають вірусові здатність трансформувати певний тип клітин хазяїна. Локуси з гомологічними послідовностями, знайдені в геномах еукаріотів, названі *c-onc*-генами. Їх додання до реципієнтних клітин викликає злоякісну трансформацію останніх. Такі гени можуть бути активовані в клітині внаслідок інтеграції поблизу від них ретровірусного геному, промотор якого, як вже зазначалося, сприяє транскрипції сусідніх послідовностей ДНК хазяїна.

Цікаво, що гени *c-onc*, як правило, перериваються інтронами, і їх експресія в клітині дуже слабка. Гени *v-onc* інтронів не мають і експресуються дуже ефективно як складова частина вірусного геному. Порівняння їх будови привело до припущення, що гени *v-onc* — це модифіковані гени *c-onc*, які утворилися шляхом зворотної транскрипції на матрицях зрілих РНК-продуктів онкогенів еукаріотних клітин.

Існує думка, що гени *c-onc* виникають внаслідок мутацій нормальних еукаріотних генів, які експресуються в проліферуючих клітинах на ранніх стадіях індивідуального розвитку, але не функціонують у зрілих диференційованих клітинах. У зв'язку з цим цікаво відзначити, що онкогенні віруси викликають мутації в заражених ними клітинах. Мутації індукуються в хромосомі поблизу місця інсерції вірусного геному у вигляді його ДНК-копії, а також в момент вивільнення провірусу із хромосоми. Як правило, ці мутації являють собою незначні перебудови хромосом або локальні ушкодження окремих генів.

Сучасні дослідження свідчать про те, що зворотна транскрипція є обов'язковою стадією розвитку не тільки ретровірусів, але й деяких ДНК-утримуючих вірусних часток (наприклад, гепатиту В і вірусу мозаїки цвітної капусти). Реплікація/транскрипція геномів цих вірусів йде за схемою ДНК → РНК → ДНК.

Геном вірусу гепатиту В являє собою молекулу ДНК, яка складається із двох лінійних компонентів: повнорозмірного (–)ланцюга, зв'язаного з особливим білком на 5'-кінці, а також значно меншого

за розмірами сегмента (+)нитки, який має комплементарні ділянки до обох кінців (-)ланцюга і тому утримує його в кільцевій формі (рис. 6.20). Віріон містить вірусоспецифічну ДНК-полімеразу, здатну добудувати (+)сегмент до розмірів повного геному.

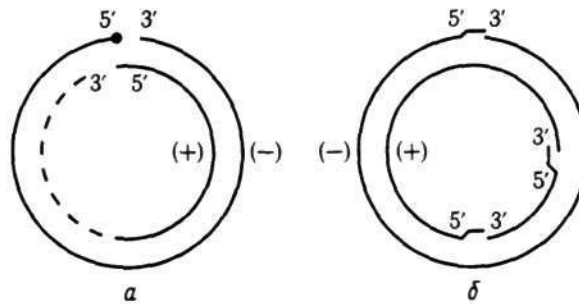


Рис. 6.20. Будова віріонної ДНК вірусів гепатиту В (а) і мозаїки цвітної капусти (б)

В зараженій клітині ДНК-геноми вірусів гепатиту В і мозаїки цвітної капусти перетворюються в ковалентно-замкнуту форму, яка, як відомо, зручна для реплікації. Однак у обох вірусів реплікація ДНК-геному здійснюється за допомогою проміжних вірусоспецифічних лінійних РНК. Більшість транскрибованих вірусних РНК — субгеномні; однак одна із форм — значно довша за геном і має кінцеві повтори. Саме ця повномірна РНК слугує матрицею для синтезу ДНК-копії з допомогою вірусної ДНК-полімерази. Остання здатна використовувати в ролі матриці як ДНК, так і РНК, тобто має властивості ревертази. Спочатку синтезується (-)нитка ДНК, при цьому як затравка у випадку вірусу гепатиту В використовується білок, а за розмноження вірусу мозаїки капусти — одна із наявних у клітині хазяїна тРНК. Після цього на синтезованому (-)ланцюгу вибудовується (+)ланцюг.

Таким чином, загальні механізми реплікації/транскрипції у зазначених двох вірусів і ретровірусів дуже подібні. Можливо, що ця подібність має еволюційну основу, бо амінокислотні послідовності зворотних транскриптаз усіх названих вірусів мають багато спільного.

Підсумовуючи сказане, слід вказати на велике загальнобіологічне значення зворотної транскрипції:

1. Цей процес є необхідною стадією життєвого циклу багатьох РНК- і ДНК-утримуючих вірусів;

2. Є істотні підстави вважати, що синтез ДНК-копій різних за структурою РНК лежить в основі ампліфікації деяких генів, виник-

нення псевдогенів, інших ретропозонів та ретротранспозонів в еукаріотних клітинах.

3 З відкриттям зворотної транскрипції більш зрозумілими стали механізми злоякісної трансформації еукаріотних клітин онкогенними ретровірусами та інші біологічні процеси.

4 Став можливим синтез *in vitro* ДНК-копій РНК-продуктів генів. Ці копії можуть використовуватися в генній інженерії, а також як зонди за вивчення структури геномів.

6.2. Трансляція

Біосинтез поліпептидів (білків), первинна структура яких кодується структурними генами, а після процесу транскрипції — також і молекулами іРНК, є необхідним етапом реалізації генетичної інформації і становлення відповідного фенотипу. Саме білки забезпечують експресію генів і регуляцію цієї експресії в онтогенезі завдяки каталітичній (ферментативній), регуляторній, транспортній та іншим функціям, що властиві білковим молекулам.

Біосинтез білка (трансляція) полягає в перекладі послідовності нуклеотидів у складі молекул іРНК у послідовність амінокислот поліпептидних ланцюгів. Цей переклад здійснюють «фабрики» збірки білка — рибосоми, які, просуваючись по нитці іРНК, будують поліпептидний ланцюг у відповідності з генетичним кодом.

Крім рибосом та іРНК, до білок-синтезуючої системи входять і інші компоненти клітин, серед яких — тРНК, необхідні амінокислоти, ферменти аміноацилсинтетази, АТР, GTP, іони (насамперед Mg^{2+} , Na^+ , K^+) і специфічні білкові фактори ініціації, елонгації та термінації транскрипції.

6.2.1. Молекулярна організація рибосом

Рибосоми еукаріотів і прокаріотів мають багато подібних рис щодо структури і функцій, проте істотно різняться як розмірами, так і відносним вмістом РНК і білків. В табл. 6.1 та на рис. 6.21 наведені основні дані про молекулярну організацію рибосом *E. coli* і рибосом цитоплазми печінки шурів.

Незалежно від походження асоційована рибосома складається з двох субчастинок — великої і малої. В кінці акту трансляції рибосома дисоціює (розпадається) на ці субчастки. В новий акт трансляції

Таблиця 6.1

Порівняльна характеристика будови рибосом *E. coli* та цитоплазми печінки щурів

Показники	Рибосоми <i>E. coli</i>			Рибосоми щурів		
	Асоційована рибосома	Мала субчастика	Велика субчастика	Асоційована рибосома	Мала субчастика	Велика субчастика
1. Коефіцієнт седиментації рибосоми і її субчастинок	70S	30S	50S	80S	40S	60S
2. РНК						
Високомолекулярні		16S	23S		18S	28S
Низькомолекулярні			5S			5,8S
3. Доля РНК, %	66	60	70	60	50	65
4. Білки (кількість поліпептидів)	52	21	31	82	33	49
5. Доля білків, %	34	40	30	40	50	35

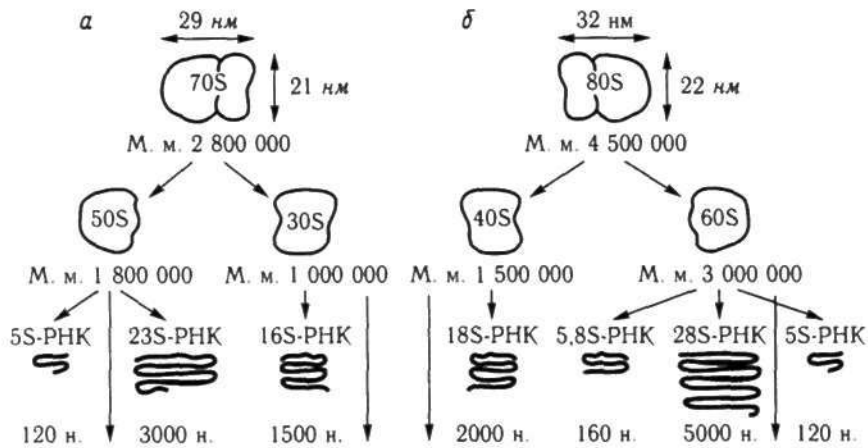


Рис. 6.21. Порівняння будови прокаріотних і еукаріотних рибосом:

а — прокаріотна рибосома; б — еукаріотна рибосома; н. — нуклеотиди

першою включається менша за розмірами субчастика, а потім до неї приєднується більша. Отже, в клітині існує певна рівновага між асоційованим (об'єднаним) і дисоційованим (роз'єднаним) станом субчастинок. Асоціацію і дисоціацію рибосом можна спостерігати

in vitro, змінюючи концентрацію Mg^{2+} та інших інгредієнтів в інкубаційному середовищі. В еукаріотних рибосомах, які в асоційованому стані мають константу седиментації біля 80S, приблизно половина їх маси приходить на рРНК. Мала 40S-субчастка містить одну молекулу рРНК з константою седиментації 18S і 33 молекули рибосомних білків. До складу великої 60S-субчастки входить три молекули рРНК з константами седиментації 28S, 5S, 5,8S і 49 різних поліпептидів (білків). У *E. coli* виявлено три типи рРНК, дві із яких — високомолекулярні (23S і 16S), а одна — низькомолекулярна (5S). Велика субчастка бактеріальної рибосоми містить 23S і 5S рРНК, а до малої субчастки входить 16S рРНК. Із 52 рибосомних білків бактерії 21 входить до складу малої субчастки рибосоми (позначаються як S1—S21), а 31 поліпептид є належністю великої субчастки (кожен з них позначається буквою L з відповідним номером — L1, L2, L3 і т. д. до L34, бо раніше помилково вважали, що велика субчастка містить 34 білкових молекули)

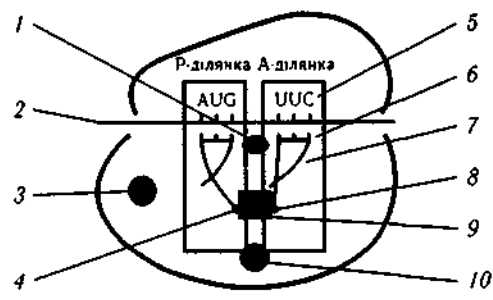
Рибосомні білки, за окремими винятками, не мають нічого спільного за будовою і відрізняються один від одного як послідовністю амінокислот, так і імунологічними властивостями. Виняток складають білки S20 і L26, які є ідентичними, а також майже однакові білки L7 і L12, які у розчині утворюють димери, чому і отримали назву білків L7/L12. У кожній рибосомі є два таких димери і дві молекули білка S6. Всі інші білки представлені однією молекулою на рибосому. Подібності між рибосомними білками бактерій і еукаріотів не виявлено, за виключенням того, що бактеріальні білки L7/L12 можуть замінити аналогічні еукаріотні білки у складі 80S-рибосом.

Розміри еукаріотних рибосом, виділених із різних органел клітини, варіюють. Рибосоми мітохондрій нищих еукаріотів, таких як гриби, мають дещо більші розміри, ніж рибосоми *E. coli*. Розміри рибосом мітохондрій рослин мало чим поступаються розмірам рибосом навколишньої цитоплазми. В протилежність цьому в мітохондріях ссавців і амфібій рибосоми значно менші і мають константу седиментації 60S. Ці рибосоми відрізняються більш низьким вмістом РНК (25—31%). Рибосоми хлоропластів мають приблизно такі ж розміри, як і рибосоми бактерій.

З'ясувалося, що реконструкція субчастинок рибосоми in vitro за оптимальних умов досліду здійснюється шляхом самозбірки, за якої рибосомні білки приєднуються до рРНК певними групами і суворо упорядковано у часі. При цьому приєднання однієї групи білків сприяє приєднанню наступної шляхом впливу на конформацію рРНК. Процес реконструкції субчастинок рибосоми дуже залежить від наявності іонів Mg^{2+} та інших умов.

мутаций (sad-мутації).
 «...».
 іРНК,
 полірибосою ; полірибосоми

(рис. 6.22). 30S-субчастка *E. coli*



6.22 :
 1 — ділянка зв'язування EF-T, 2 — зв'язу-
 EF G, 4 — фМет 5 — ; 6 — антикодон, 7 — зв'язу-
 ділян-
 10 — 5S-рРНК

ініціаторної
 IF3; 70S-рибосом 50S-суб-

утримує наростаючий поліпептидний ланцюг; її називають пептидил~тРНК-зв'язуючою або **Р-ділянкою**.

Друга ділянка зв'язує шойно прибулу молекулу аміноцил~тРНК; її називають аміноцил~тРНК-зв'язуючою або **А-ділянкою**. До обох ділянок (центрів) молекула тРНК міцно приєднується лише в тому випадку, якщо її антикодон спаровується з комплементарним йому кодоном іРНК. А- і Р-ділянки розташовані дуже близько одна до одної, так що дві зв'язані з ними молекули тРНК спаровуються з двома сусідніми кодонами молекули іРНК (рис. 6.22). Ділянка Р розташована головним чином в 30S-субчастці і здатна зв'язувати не тільки пептидил~тРНК, але й ініціаторну тРНК (формілметионін~тРНК).

З ділянками А і Р безпосередньо межує **пептидилтрансферазний центр, ділянки зв'язування білкових факторів EF-G, EF-T та інші**. Всі ці каталітично активні центри утворюються завдяки взаємодії певної групи білків рибосоми і рибосомних РНК, в першу чергу 16S і 5S.

Пептидилтрансферазний центр розташований на межі ділянок А і Р поблизу 3'-кінців тРНК, зв'язаних цими ділянками.

6.2.2. Інформаційна РНК як матриця для синтезу білка

Ще до того, як була відкрита і виділена із клітин іРНК, існувало припущення, що в еукаріотних клітинах мусить існувати посередник, здатний переносити генетичну інформацію із ядра, де знаходиться ДНК, в цитоплазму, де проходить синтез білків. Дані про те, що цей посередник слугує матрицею, на якій амінокислоти збираються в поліпептидний ланцюг, вперше були отримані в дослідях на бактеріях. Було також з'ясовано, що рибосоми є саме тими структурами, які здійснюють біосинтез білків, і що саме іРНК, приєднуючись до рибосоми, транслюється з утворенням поліпептиду.

Між прокаріотними і еукаріотними іРНК існують істотні відмінності щодо їх будови та властивостей. Найбільш очевидні відмінності полягають у тому, що іРНК еукаріотів синтезується у вигляді великого за розміром попередника, який у подальшому підлягає процесингу (рис. 6.23). Лише після цього зріла іРНК поступає в цитоплазму для трансляції. Таким чином, синтез і експресія еукаріотних іРНК здійснюється незалежно в різних частинах клітини. Що ж до бактерій, то процеси транскрипції і трансляції їх іРНК так тісно пов'язані між собою, що можуть проходити одночасно.

Інша принципова різниця в процесах трансляції у прокаріотів і еукаріотів полягає в тому, що у бактерій іРНК може кодувати

декілька білків, тоді як з еукаріотної зрілої іРНК зраховується, як правило, лише один поліпептидний ланцюг. Транскрипція і трансляція у бактерій здійснюються одночасно. Експресія гена розпочинається, коли РНК-полімераза зв'язується з ДНК і ініціює синтез

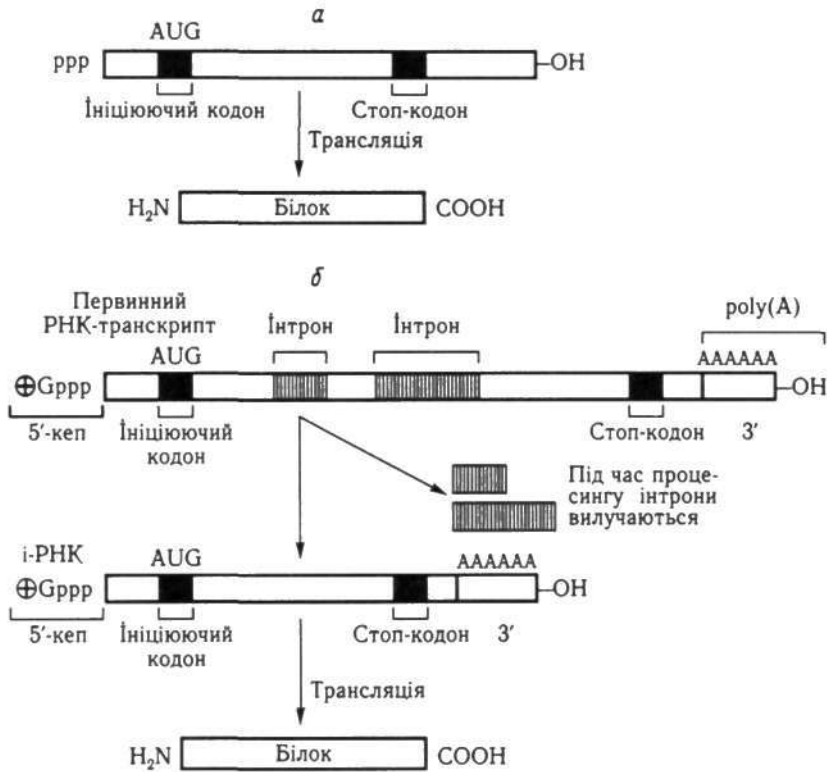


Рис. 6.23. Порівняння первинної структури РНК-транскриптів: а — прокаріотів; б — еукаріотів. Трансляції численних еукаріотних РНК передуює процесинг

іРНК. Рибосоми приєднуються до щойно синтезованого 5'-кінця іРНК і розпочинають трансляцію ще до того, як закінчується синтез іРНК. Отже, за РНК-полімеразою по нитці іРНК безпосередньо рухається низка рибосом (рис. 6.24).

Деградація іРНК бактерій здійснюється по мірі її трансляції. Більш того, деградація 5'-кінця може розпочатись раніше, ніж закінчиться синтез або трансляція 3'-кінця молекули. Деградація йде більш повільно, ніж транскрипція або трансляція, тому 3'-частина

iРНК існує більш довгий час, ніж розташована на початку молекули 5'-частина.

Інформаційні РНК еукаріотів значно стабільніші, ніж прокаріотів; період їх півбуття може складати десятки хвилин і більше.

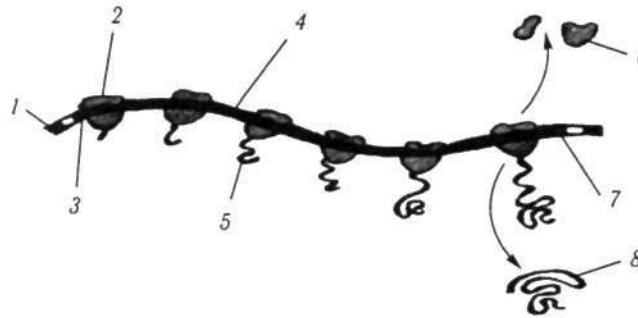


Рис. 6.24. Схема синтезу білка рибосомами:

1 — 5'-кінець; 2 — рибосома; 3 — старт; 4 — мРНК; 5 — рости-
чий поліпептид; 6 — вільні субодиниці рибосоми; 7 — стоп; 8 —
синтезований поліпептид

Звичайно біля половини iРНК в культурі клітин ссавців мають період півбуття близько шести годин, тоді як стабільність іншої частки молекул можна співставити з протяжністю клітинного циклу (до 24 год). В диференційованих клітинах, спеціалізованих на синтезі певних білків, деякі iРНК можуть бути ще більш стабільними. Стабільність iРНК еукаріотів значно зростає після приєднання до цих молекул спеціальних цитоплазматичних білків з утворенням рибонуклеопротеїдних часток, особливо так званих **інформосом** (О. С. Спін). Останні, як відомо, утворюються в яйцеклітинах у процесі їх дозрівання і слугують резервом підготовленої (транскрибованої) генетичної інформації, що використовується в онтогенезі лише після запліднення яйця. Такі ж синтезовані «про запас» молекули iРНК містять деякі ембріональні клітини, в цитоплазмі яких також виявлено рибонуклеопротеїдні частки — носії iРНК. Інформація цих молекул використовується для синтезу білків на більш пізніх стадіях онтогенезу.

Бактеріальні iРНК дуже різняться по кількості продуктів, що ними кодуються. Деякі молекули відповідають лише одному гену ДНК — це **моноцистронні iРНК**. Інші (таких більшість) містять послідовності, кодуючі декілька білків, — це **поліцистронні iРНК**. В останньому випадку єдина iРНК транскрибується з групи розташованих поряд генів, які утворюють один **оперон**.

У складі всіх іРНК можна виділити ділянки двох типів. Кодуюча ділянка представлена набором кодонів, які визначають амінокислотну послідовність поліпептиду; вона починається з **ініціюючого кодону AUG** (рідше **GUG**) і закінчується **термінуючим кодоном**. Крім кодуючої ділянки, на обох кінцях моноцистронної іРНК можуть знаходитись додаткові послідовності. Додаткова ділянка на 5'-кінці, що передує початку кодуючої послідовності, називається **лідерною**, а послідовність, що розташована за термінуючим сигналом, тобто на 3'-кінці іРНК, позначається як кінцева (**трейлер**). Незважаючи на те, що ці послідовності входять до складу транскрипційної одиниці (**транскриптона**), вони не використовуються для кодування білків.

В поліцистронній іРНК між сусідніми кодуючими ділянками розташовані **міжцистронні послідовності**, які дуже варіюють за розмірами. У фагових іРНК вони можуть бути досить протяжними (до 100 основ). У деяких бактеріальних іРНК їх протяжність не перевищує 30 нуклеотидів, а може бути й дуже малою — всього 1—2 нуклеотиди. Буває й так, що послідовності двох сусідніх генів можуть практично перекриватися, так що у складі іРНК остання основа термінуючого кодону UGA однієї кодуючої ділянки одночасно слугує першою основою ініціюючого кодону AUG для синтезу наступного білка.

У бактерій приєднання меншої субчастки рибосоми до іРНК (**ініціація трансляції**) обумовлюється наявністю фактора ініціації **IF3** і особливостями будови 5'-кінцевої частини молекули іРНК.

Бактеріальні рибосоми екранують ініціаторну послідовність іРНК розміром 35—40 основ, яка містить ініціюючий кодон AUG (або GUG). У різних бактеріальних іРНК в межах цієї послідовності виявляється дуже короткий фрагмент, комплементарний певному фрагментові 3'-кінця 16S-рРНК. Послідовність останнього є самокомплементарною і може утворювати шпильку внаслідок комплементарної взаємодії основ. Крім того, цей фрагмент містить послідовність 5'...CCUCCU...3'. В сайтах ініціації майже всіх відомих іРНК *E. coli* є ділянка, комплементарна трьом—п'яти нуклеотидам цієї послідовності рРНК. Таким чином, іРНК бактерій містить або частину або весь олігонуклеотид 5'...AGGAGG...3'. Цей поліпуриновий фрагмент називають **послідовністю Шайна—Дальгарно**. Вона розташована на відстані 4—7 основ перед кодоном AUG. Вважають, що ініціація трансляції включає в себе руйнування кінцевої шпильки на 3'-кінці 16S-рРНК і комплементарне спарування між рРНК і іРНК. Мутації, що призводять до змін послідовності GAGG на GAAG в одній із іРНК фага T7, дестабілізують зв'язування рибосом з фаговою іРНК.

Таким чином, послідовність Шайна—Дальгарно грає важливу роль у взаємодії іРНК бактерії з рибосомою і в ініціації трансляції.

У складі еукаріотної іРНК ділянка міцного зв'язування для 80S-рибосом, як і у прокариотів, являє собою послідовність із 30—40 нуклеотидів. Ініціаторний кодон AUG, як правило, розташовується в центрі цього фрагмента.

Порівняння 3'-кінцевої послідовності рРНК прокариотів і еукаріотів показує, що ця послідовність консервативна і за довгий час еволюції мало змінилася. У бактерій в певному положенні рРНК є два залишки U, тоді як у вищих еукаріотів тут знаходяться два залишки A (у нижчих еукаріотів виявляється проміжна за будовою послідовність AU). Крім того, для всіх еукаріотів характерна делеція послідовності CCUCC, яка є у бактерій і комплементарна послідовності Шайна—Дальгарно. Саме тому рибосоми еукаріотів не завжди здатні ініціювати трансляцію на бактеріальних іРНК у реконструйованих безклітинних системах білкового синтезу.

Посеред консервативного 3'-кінцевого фрагмента еукаріотної рРНК знаходиться послідовність, збагачена пуринами 3'...UAGGAAGGCGU...5', яка віддалена від 3'-кінця приблизно на ту ж відстань, що й послідовність CCUCC у бактерій, і може приймати участь в утворенні термінальної шпильки. Деякі іРНК еукаріотів містять чотири- або п'ятичленні послідовності, теоретично здатні спаруватись із зазначеною 3'-кінцевою ділянкою рРНК. Однак взаємодія еукаріотної іРНК з рибосомою визначається не тільки цим. Слід зазначити, що еукаріотні іРНК — всі моноцистронні і значно більші за розмірами, ніж це необхідно для кодування відповідного білка. Надлишкові послідовності іРНК еукаріотів включають у себе короткий (до 100 нуклеотидів) лідерний фрагмент на 5'-кінці молекули і 3'-кінцеву некодуючу ділянку, яка в багатьох випадках має значні розміри (іноді до 1000 нуклеотидів).

Рибосоми в цитоплазмі еукаріотних клітин не зв'язуються безпосередньо з сайтом ініціації перед початком кодуєчої області. Насправді першою структурою іРНК, яка розпізнається рибосомою, є метильований кеп на 5'-кінці молекули. Останній виявляється в усіх іРНК цитоплазми еукаріотних клітин, за винятком іРНК органел. Отже, кеп вкрай необхідний для початку трансляції, і лише деякі вірусні іРНК, що виявляються в цитоплазмі, можуть обходитися без цієї структури. Кеп розпізнається 40S-субчастиною рибосоми, яка приєднується до нього і утворює так званий ініціюючий комплекс. В його утворенні важливу роль відіграють особливі білки — фактори ініціації, які за своєю будовою і кількістю відрізняються від бактеріальних, але виконують аналогічні функції. Дещо пізніше до ініціюючого комплексу приєднується 60S-субчастина ри-

босоми і розпочинається трансляція; першим зраховується ініціаторний кодон AUG, а потім всі інші. Процес трансляції закінчується, коли рибосома, що просувається по іРНК в напрямку 5' → 3', досягне термінуючого кодону.

6.2.3. Механізми трансляції

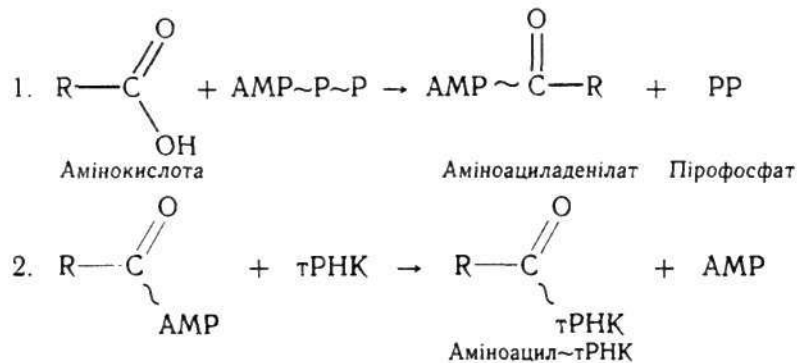
Весь процес біосинтезу білка поділяють на чотири фази:

- а) активація амінокислот;
- б) ініціація синтезу поліпептидного ланцюга;
- в) елонгація (подовження) поліпептидного ланцюга;
- г) термінація (закінчення) синтезу.

Активація амінокислот

В процесі трансляції рибосомою використовуються лише активовані (тобто зв'язані з відповідними тРНК) форми амінокислот. Приєднання аміноацильного залишка до 3'-кінця (САА-кінця) специфічної тРНК і утворення аміноацил~тРНК здійснюється ферментом **аміноацил-тРНК-синтетазою** за наявності АТР і Mg^{2+} . Для кожної амінокислоти існує принаймні одна специфічна аміноацил~тРНК-синтетаза, яка може взаємодіяти з усіма ізоацепторними (ізоадапторними) тРНК.

На першому етапі активації амінокислота взаємодіє з АТР, який втрачає пірофосфат і утворює аміноацил~аденілат; лише після цього аміноацильний залишок переноситься на тРНК:



Майже всі неправильно синтезовані комплекси аміноацил~тРНК розпадаються зразу ж після свого утворення, отже на цьому етапі трансляції можливе виправлення помилок.

Молекули тРНК виконують адапторну функцію, і добір відповідної амінокислоти тРНК здійснюється аміноацил-тРНК-синтетазою саме на етапі активації амінокислот, а не пізніше. Це було підтверджено класичним дослідом. За вилучення сульфгідрильної групи із комплексу цистеїн~тРНК^{cys} отримали комплекс аланін~тРНК^{cys}. Активованій таким чином аланін вбудовується у білок в усіх місцях, де згідно коду повинен знаходитись цистеїн.

Ініціація синтезу поліпептидного ланцюга

Для ініціації синтезу бактеріальної білкової молекули необхідні: GTP, менша субчастина рибосоми, іРНК, іMet~тРНК, фактори ініціації, йони магнію та ін. (рис. 6.25).

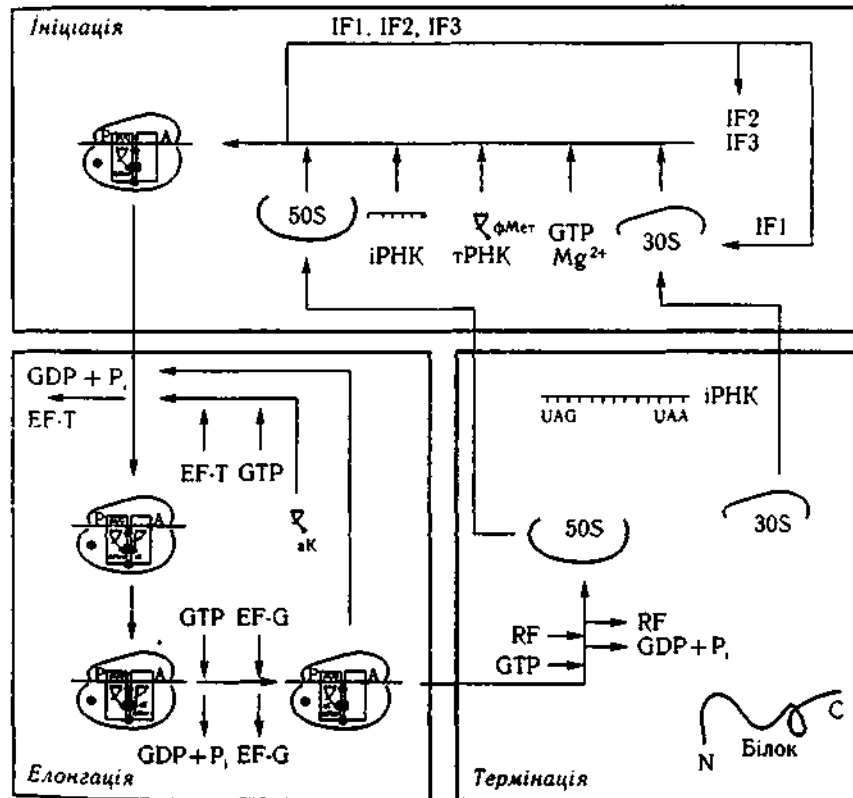


Рис. 6.25. Основні фази (стадії) синтезу білка у бактерій

Як правило, нагнужена амінокислотою тРНК зв'язується з А-ділянкою рибосоми, а потім транслокується на Р-ділянку. Виключення, можливо, складає лише ініціаторна аміноацил~тРНК, яка, як вважають дослідники, може безпосередньо приєднуватися до Р-ділянки. У прокаріотів ініціаторною слугує формілметионіл~тРНК (fMet~тРНК), а у еукаріотів — особлива ініціаторна метионіл~тРНК (Met~тРНК_i). Саме тому синтез поліпептидних ланцюгів у бактерій розпочинається з включення формілметионіну, а у еукаріотів — метионіну, які в подальшому від синтезованого поліпептиду можуть відщеплюватися відповідними ферментами.

Для ініціації у бактерій необхідні також білкові фактори IF1, IF2 і IF3 з молекулярною масою відповідно 9000, 65 000 і 21 000. Вони не є інтегральними компонентами рибосом і входять до них тимчасово. IF1 необхідний для дисоціації 70S-рибосомного комплексу, IF3 — для стабілізації зв'язування іРНК з 30S-субчастиною, IF2 зв'язує GTP і приєднується до 30S-субчастки разом з fMet~тРНК. Так утворюється **ініціаторний комплекс** з константою седиментації 40S. 50S-субчастка об'єднується з цим комплексом за умов одночасного гідролізу GTP і звільнення факторів ініціації. В результаті утворюється ініціаторний комплекс 70S. В цьому комплексі рибосома утримується на 5'-кінці іРНК, де екранує фрагмент довжиною 35—40 основ, в тому числі ініціюючий триплет AUG. З останнім взаємодіє антикодон fMet~тРНК, яка доставляється в комплексі з IF2 і GTP і після гідролізу GTP утримується в Р-ділянці рибосоми.

Елонгація поліпептидного ланцюга

Для елонгації необхідні (рис. 6.26):

- 1) ініціаторний комплекс;
- 2) нагнужені амінокислотами тРНК;
- 3) фактори елонгації (EF-T, EF-G);
- 4) GTP.

Основними етапами елонгації є такі:

- 1) зв'язування відповідної аміноацил~тРНК в А-ділянці рибосоми;
- 2) утворення пептидного зв'язку між попереднім і наступним залишками амінокислот;
- 3) транслокація (переміщення) утвореної пептидил~тРНК з А-ділянки рибосоми в Р-ділянку з одночасним зсувом іРНК на один триплет.

Зв'язування запрограмованої відповідним кодоном аміноацил~тРНК в А-ділянці рибосоми каталізується фактором елонгації

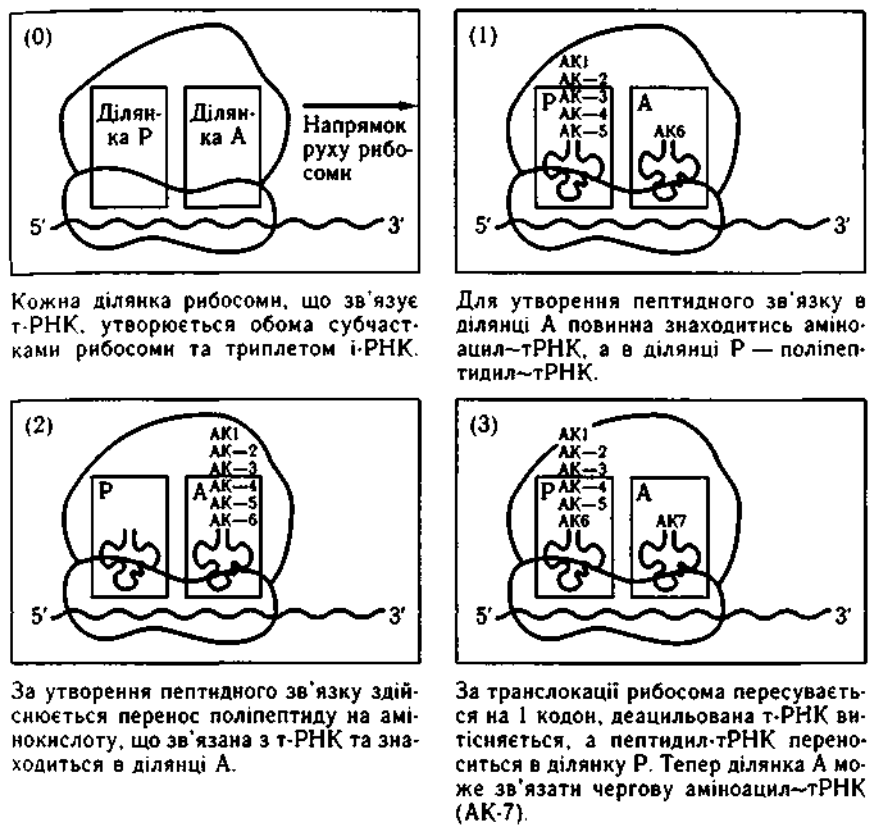


Рис. 6.26. Схема елонгації поліпептидного ланцюга:

Цифри в дужках — послідовність дій

EF-T, який складається із двох субодиниць — EF-Ts (термостабільної) і EF-Tu (термочутливої). Після зв'язування GTP з EF-Tu настає дисоціація субодиниць фактора. Комплекс GTP-EF-Tu зв'язує відповідну аміноацил-т-РНК; утворюється комплекс EF-Tu-аміноацил-т-РНК. Останній приєднується до А-ділянки 70S-рибосоми. Кожний раз специфічно нагружена т-РНК пізнається завдяки взаємодії кодону і антикодону. Зв'язування кожної аміноацил-т-РНК супроводжується гідролізом GTP і вивільненням GDP, неорганічного фосфату та фактора EF-Tu.

Взаємодія кодон-антикодон виявляється дуже слабенькою. Ф. Крік запропонував у 1966 р. гіпотезу «гойдань», яку називають

ще гіпотезою **неоднозначної відповідності** основ або wobble-гіпотезою. Згідно з нею, спаровування третього нуклеотиду кодону і антикодону — менш специфічне, ніж поєднання двох перших. Гіпотеза ґрунтується на даних про те, що одній і тій же амінокислоті нерідко відповідає декілька кодонів, які відрізняються один від одного тільки нуклеотидом у третьому положенні.

В 1975 р. Ц. Г. Курлянд та інші прийшли до висновку, що крім кодон-антикодонної взаємодії, в зв'язуванні тРНК важливу роль грає комплементарна взаємодія послідовності Т-Ψ-С у псевдоуридиловій петлі тРНК з послідовністю СGAA в 16S-рРНК. Зазначений тетра-нуклеотид у складі 16S-рРНК може розглядатись як акцептор тРНК. Зв'язування тРНК з 16S-рРНК можливе лише у тому випадку, коли йому передують правильна взаємодія кодону і антикодону.

Утворення пептидного зв'язку. Перший пептидний зв'язок утворюється між формілметионіном зв'язаної з Р-ділянкою [Met~тРНК і амінокислотою першого комплексу аміноацил~тРНК, який міститься в А-ділянці (рис. 6.25). Реакція забезпечується **пептидилтрансферазним центром** рибосоми. Роль пептидилтрансферази виконує один із білків великої субчастки рибосоми. Продуктом реакції є дипептидил~тРНК, що виникає в А-ділянці рибосоми. Цю стадію трансляції у прокариотів блокує хлорамфенікол.

Транслокація (переміщення) дипептидил~тРНК із А-ділянки в Р-ділянку рибосоми здійснюється за участю фактора елонгації EF-G і GTP. Вони утворюють комплекс, який зв'язується рибосо-мою, після чого гідролізується з вивільненням продуктів реакції — GDP і неорганічного фосфату, а також фактора EF-G. Енергія, що вивільняється за гідролізу GTP, використовується на конформаційну зміну рибосоми, яка в свою чергу є передумовою переміщення іРНК на один триплет і транслокації пептидил~тРНК в Р-ділянку. А-ділянка при цьому звільняється і зв'язує нову аміноацил~тРНК, антикодон якої здатний взаємодіяти з черговим кодоном, що потрапив в А-ділянку рибосоми. Елонгація вступає в наступний цикл, внаслідок якого поліпептидний ланцюг подовжується на одну амінокислоту. По завершенні одного циклу елонгації розпочинається новий, і так продовжується до тих пір, поки в А-ділянку рибосоми не потрапить термінуючий кодон іРНК.

Термінація трансляції

Сигналом термінації слугують кодони **UAA, UAG, UGA**. За нормальних умов у клітині тРНК з відповідними антикодонами не утворюються. Тому, якщо внаслідок пересування іРНК у місці

зв'язування аміноацил~тРНК виявляється один із зазначених термінуючих кодонів, А-ділянка залишається незайнятою. Вивільнення поліпептидил~тРНК, що знаходиться в Р-ділянці, у *E. coli* забезпечується спеціальними факторами термінації R₁, R₂, R₃. Готовий поліпептид вивільняється шляхом гідролізу з допомогою гептидилтрансферазної активності рибосоми. Після того, як відділяється тРНК, вивільняється також іРНК, а 70S-рибосоми розпадаються за участю IF1 на свої субчастки (дисоціюють). Всі ці компоненти можуть бути знову використані у новому циклі трансляції.

Описаний механізм трансляції, окремі деталі якого ще потребують уточнення, з'ясований головним чином у дослідках на прокариотах, проте в загальних рисах вважається дійсним і для еукаріотних об'єктів. Істотні відмінності еукаріоти виявляють лише в структурі та деяких властивостях окремих компонентів білок синтезуючої системи, а також у деталях взаємодії між ними. Відомо, наприклад, що трансляція в клітинах еукаріотів здійснюється з участю білкових факторів ініціації, елонгації і термінації, які відрізняються від бактеріальних за будовою і властивостями, але виконують аналогічні функції.

Так, наприклад, еукаріотний фактор ініціації eIF-2 зв'язує GTP і Met-тРНКі, після чого приєднує їх до малої (40S) субодиниці рибосоми, чим нагадує бактеріальний фактор IF-2. Комплекс білків, названий eIF-4, включає в себе eIF-4F, eIF-4B та інші компоненти. Білок eIF-4F містить eIF-4E, здатний розпізнавати кап еукаріотної іРНК і зв'язуватися з ним. Білок eIF-4B є хеліказою, яка розкриває шпильку на 5'-кінці іРНК. Останнім спрацьовує фактор ініціації eIF-5, який сприяє приєднанню великої (60S) субчастки рибосоми до ініціаторного комплексу з утворенням структури 80S.

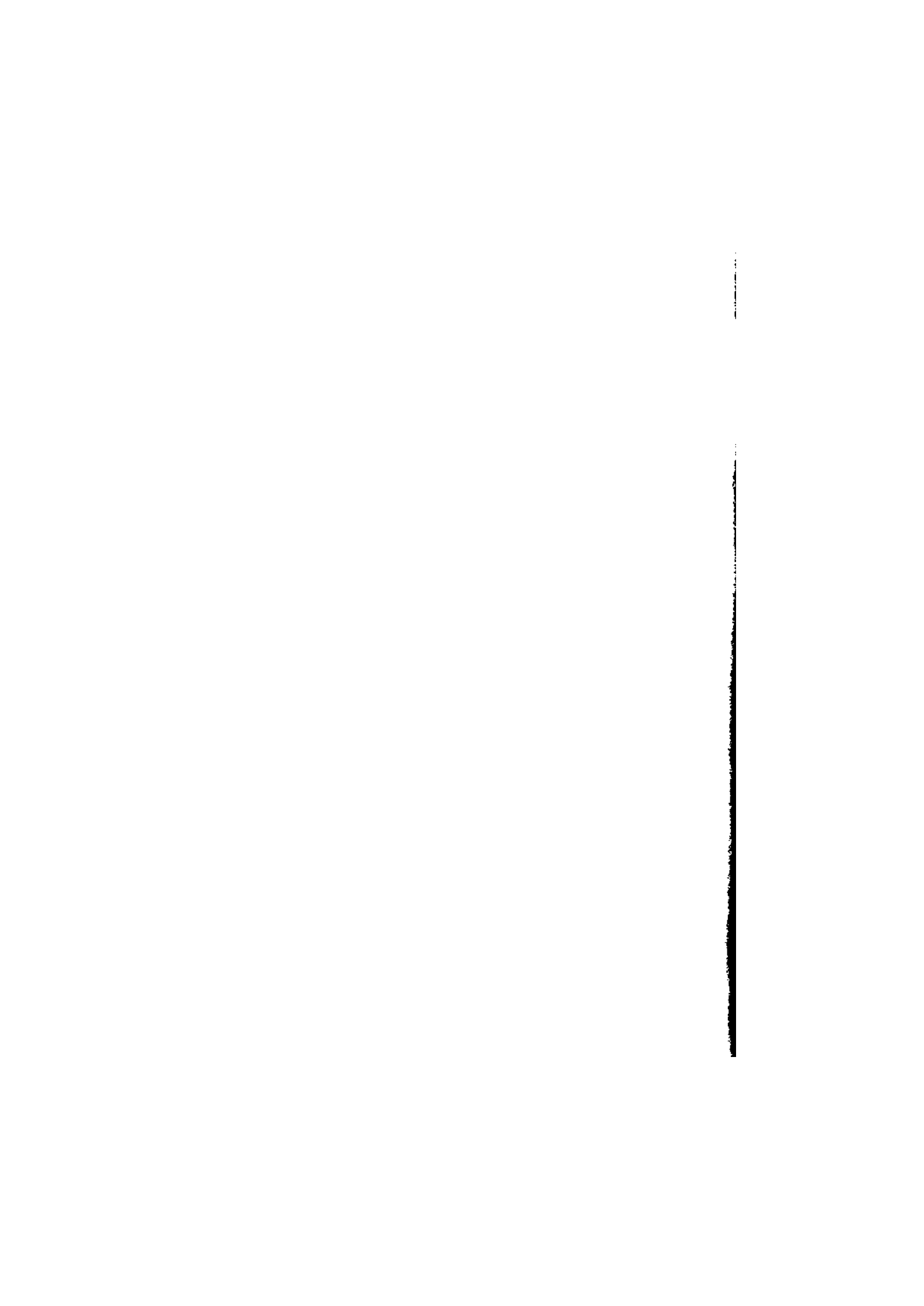
Цікаво, що як і у бактерій, регуляція трансляції у еукаріотів переважно здійснюється на стадії ініціації. Основний механізм цієї регуляції полягає у фосфорилуванні факторів ініціації. Саме так (шляхом фосфорилування фактора ініціації eIF-2 α) блокується синтез гемоглобіну в ретикулоцитах у відсутність гема, а також гальмується трансляція на матриці дволанцюгових вірусних РНК за наявності інтерферону.

В цих випадках фосфорильований eIF-2 α міцніше, ніж звичайно, приєднується до фактора eIF-2B, і останній втрачає здатність ініціювати поновлення ATP у складі фактора eIF-2. При цьому eIF-2 залишається в неактивній ADP-утримуючій формі і не може доставляти Met-тРНКі до 40S-субчастки рибосоми. За цих умов трансляція стає неможливою.

Vertical line of text or a scanning artifact on the right side of the page.

Частина III

**ЗАКОНОМІРНОСТІ УСПАДКОВУВАННЯ
ХРОМОСОМНИХ І НЕХРОМОСОМНИХ
ГЕНІВ**



Розділ 7

НЕЗАЛЕЖНЕ (менделівське) УСПАДКОВУВАННЯ

7.1. Гібридологічний аналіз та типи схрещувань

Процес передачі спадкових ознак наступному поколінню (тобто процес **успадковування**) здійснюється за певними законами, суть яких цікавить людство з давніх давен.

В епоху, що передувала роботам Г. Менделя, більшість вчених, що вивчали спадковість, старалися визначити ступінь подібності батьків і нащадків зразу за всіма ознаками. Вони виходили з того, що спадковість — неподільна властивість організму. Уявлень про **дискретність** генотипу і фенотипу тоді ще не існувало. Однак така сумарна оцінка організмів за фенотипом не могла привести до з'ясування суті спадковості.

Успіх Г. Менделя в значній мірі визначався тим, що він у кожному досліді простежував успадковування двох або дуже небагатьох ознак, якими відрізнялися батьки. В найбільш простому випадку вивчалось успадковування тільки однієї пари **альтернативних** (взаємно виключаючих) **ознак**, а всі інші розходження між батьками не приймалися до уваги. Прикладом таких альтернативних ознак можуть бути: карликовість і високий зріст рослин у гороху, крохмалистість і цукристість насіння у кукурудзи, чутливість і стійкість до ДДТ у мух і т. ін.

З'ясувати закономірності успадковування однієї, двох або й більшої кількості ознак дозволяє **гібридологічний аналіз**. Менделівський метод гібридологічного аналізу — це специфічний генетичний метод, суть якого полягає в гібридизації і врахуванні вияву досліджуваних ознак у нащадків. Основні вимоги до цього методу сформулював ще Г. Мендель:

- 1) організми, що схрещуються, мусять належати до одного виду;
- 2) батьківські форми повинні чітко відрізнятися окремими ознаками і бути гомозиготними з відповідних генів;

3) ознаки, що враховуються, мусять бути константними, тобто проявлятися в усіх поколіннях;

4) необхідна чітка характеристика і кількісне врахування фенотипових класів в усіх отриманих поколіннях.

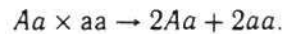
В основі гібридологічного аналізу лежить **метод схрещування**. Батьківські форми, що підлягають схрещуванню, позначають буквою *P* (*parenta* — батьки), а їх нащадків — буквою *F* (*filii* — діти). Жіноча стать у генетиці позначається символом ♀ (зеркало Венери), чоловіча стать — ♂ (спис Марса). Схрещування позначають знаком «х», а покоління — як F_1 , F_2 і т. д.

Схрещування, в якому батьки відрізняються однією парою альтернативних (контрастуючих) ознак, називається **моногібридним**. Відповідно є **дигібридні**, **тригібридні**, **полігібридні** схрещування. Слід підкреслити, що напрямок схрещування ($P_1 \times P_2$ або $P_2 \times P_1$) звичайно (але не завжди) не впливає на ознаки гібриду, що вказує на рівнозначну участь чоловічого і жіночого геномів у спадковості. Однак виключення все ж досить часті, тому напрямок схрещування прийнято зазначати. Звичайно першою у формулі схрещування вказується жіноча стать: ♀ *AA* × ♂ *aa*, тому символи статі у подібних записах не обов'язкові.

Схрещування двох форм між собою в двох протилежних напрямках називають **реципрокними**: $P_1 \times P_2$ і $P_2 \times P_1$.

Зворотні схрещування або **бекроси** — це схрещування потомків F_1 з однією із батьківських форм.

Дуже важливим у генетичному аналізі є так зване **аналізуюче схрещування**. Воно дає змогу встановити структуру генотипів батьківських або гібридних форм. У цьому випадку досліджуваній генотип схрещують з рецесивною гомозиготою (аналізатором):

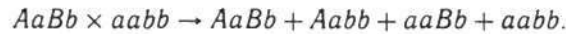


Оскільки гени аналізатора рецесивні, то фенотипи нащадків повністю визначаються генами досліджуваного генотипу, що видно із наведеної схеми схрещування.

Кількість фенотипових класів нащадків аналізуючого схрещування залежить від структури досліджуваного генотипу (гомозигота чи гетерозигота), типу успадкування, а також від типу схрещування (моногібридне, дигібридне чи полігібридне). Якщо аналізується гомозигота, то виявляється лише один клас нащадків як за генотипом, так і за фенотипом: $AA \times aa \rightarrow Aa$.

Інший результат моногібридного аналізуючого схрещування спостерігається за дослідження гетерозиготи: $Aa \times aa \rightarrow 2Aa + 2aa$. Нашадки у цьому випадку поділяються на два генотипових (і фенотипових) класи в чисельному співвідношенні 1:1. Це співвідно-

шення свідчить про незалежність успадкування алельних генів і вільне їх розходження по гаметах. У випадку дигібридного аналізуючого схрещування ($AaBb \times aabb$) у відповідності з генотипами нащадків отримуємо не два, а чотири фенотипових класи у співвідношенні 1:1:1:1:



Слід підкреслити, що вказані співвідношення генотипів та фенотипів F_2 спостерігаються лише за незалежного (менделівського) успадкування генів.

7.2. Закономірності незалежного успадкування

Однією з найважливіших особливостей методу Менделя був ретельний підрахунок результатів кожного досліду, який і дав можливість встановити кількісні закономірності розщеплення ознак серед нащадків і сформулювати закони успадкування. Перше покоління (F_1) від схрещування сортів гороху Г. Мендель отримав шляхом штучного запилення. За цього досліду в усіх гібридів F_1 виявлялася лише одна з двох альтернативних ознак, тобто був наявним **ефект домінування**. Сьогодні цей результат здається цілком очевидним, бо всі нащадки будь-якого типу схрещування (моногібридного, дигібридного чи полігібридного) в F_1 мають гетерозиготний генотип. (За моногібридного схрещування: $AA \times aa \rightarrow Aa$, за дигібридного: $AABB \times aabb \rightarrow AaBb$ і т. д.). Зрозуміло, що всі особини F_1 , у яких структура генотипів однакова, будуть ідентичними і за фенотипом (тобто за виявом досліджуваної ознаки).

В цьому і полягає суть **першого закону Менделя — закону одноманітності гібридів F_1** . Закон був встановлений Г. Менделем в дослідях на 22 сортах гороху, що мали істотні альтернативні відмінності за семи ознаками — насіння кругле або зморщене, жовте або зелене, рослини високі або карликові, квітки пазушні або верхівні і т. п.

Після отримання гібридів F_1 , у яких ген a не проявлявся, перед Г. Менделем виникло питання, що є причиною відсутності у фенотипі ознаки a — чи то повне зникнення фактора спадковості a у гібридів F_1 , чи цей фактор в якійсь прихованій формі у них все ж зберігається. Для відповіді на це запитання Мендель піддав самозаплідненню (самозапиленню) гібриди першого покоління

і переконався, що приблизно у $\frac{1}{4}$ нащадків F_2 виявляється рецесивна ознака: $Aa \times Aa \rightarrow AA + 2Aa + aa$ (рис. 7.1).

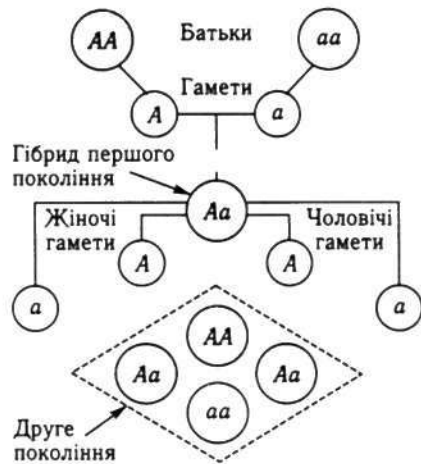


Рис. 7.1. Ілюстрація першого закону Менделя, а також закону розщеплення ознак, яка пояснює співвідношення фенотипів 3:1 у нащадків другого покоління за моногібридного схрещування:

A — домігантний ген; a — рецесивний ген

Стало зрозуміло, що інформація про ознаку a у гібриду F_1 зберігається, хоч ця ознака і не виявляється у фенотипі. Г. Мендель назвав подібні ознаки **рецесивними**, а ознаки, що проявляються в F_1 , — **домінантними**.

Таким чином, було сформульовано два найважливіших генетичних принципи — **домінантності** і **рецесивності**.

Ознаки, як і гени, прийнято позначати однією, двома або трьома буквами латинського або іншого алфавіту. Найчастіше домігантну ознаку позначають великою буквою латинського алфавіту (наприклад, ознака B), а рецесивну — малою (ознака b). В цьому випадку позначення генів і фенів співпадають, але з конкретного контексту завжди зрозуміло, про що йдеться.

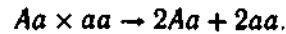
Той факт, що рецесивна ознака в прихованому стані проходить через покоління F_1 і не зникає, а знову відтворюється, або, як кажуть, **вищеплюється** в наступних поколіннях, привело Г. Менделя до думки про існування відповідальних за ці явища матеріальних спадкових факторів. Він позначив великою буквою «A» домігантний фактор, а малою буквою «a» — рецесивний.

Таким чином, Г. Мендель запропонував **факторіальну гіпотезу спадковості**, яка зіграла виключно важливу роль у розвитку генетики і лягла в основу теорії гена.

За Г. Менделем, рецесивний фактор a не зникає, не розчиняється у гібриду Aa, а зберігається в чистому стані і в подальшому проявляється у фенотипі гомозигот aa. Таким чином, центральним моментом в концепції Г. Менделя була ідея, що алелі в процесі дозрівання статевих клітин розходяться і знову сходяться в момент запліднення. Кожна гамета, утворена генотипом Aa, утримує лише один алель — A або a у чистому стані. *Те, що алельні фактори у гетерозиготи не змішуються і в чистому стані розходяться*

по гаметах, відомо як правило чистоти гамет, сформульоване У. Бетсоном на початку ХХ ст.

Г. Мендель експериментально перевіряв справедливість гіпотези розходження спадкових факторів (сьогодні ми називаємо їх генами) шляхом аналізуючого схрещування:



Результат цього схрещування (розщеплення за фенотипом у співвідношенні 1:1) повністю підтверджує гіпотезу чистоти гамет і свідчить про незалежне розходження алельних генів за утворення гамет у гетерозиготи. Отже, різні алельні гени у гетерозигот не змішуються.

Факт розходження алелей у гетерозиготи і утворення різноякісних гамет у рівних співвідношеннях у подальшому був підтверджений на численних інших об'єктах — дрозофілі, кукурудзі, рисі і т. ін.

Чіткі докази того, що у гетерозиготи Aa алелі A і a розходяться в різні гамети, були отримані з допомогою так званого тетрадного аналізу, оснований на тому, що материнська клітина утворює чотири гаплоїдні гамети або спори, на яких і проводяться спостереження. Так, у печіночного моху (*Spherotheca*) за поділу диплоїдної материнської клітини утворюється тетрада із чотирьох гаплоїдних спор. Тетрадний аналіз ґрунтується на індивідуальному дослідженні фенотипу кожної спори (або кожної рослини, що з неї розвивається). Аналіз гетерозиготних рослин моху показав, що їх тетради завжди містять половину спор, з яких розвиваються рослини з ознакою A , і половину спор, що містять інформацію лише про ознаку a .

Розробивши гіпотезу про розходження факторів (алелів) при утворенні гамет, Г. Мендель вважав, що гамети з різними алелями зливаються в момент запліднення за законом випадковості.

На початку ХХ ст. Р. Пеннет запропонував зручну форму (решітку) для зображення випадкового поєднання різних класів гамет у момент запліднення. Для моногібридного розщеплення решітка Р. Пеннета виглядає так:

Гамети гетерозиготних батьків	A	a
	Генотипи	
A	AA	Aa
a	Aa	aa
Сума генотипів	$AA + 2Aa + aa$	

Те ж саме можна отримати алгебраїчним шляхом:

$$(A + a)(A + a) \rightarrow AA + 2Aa + aa.$$

Таким чином, за моногібридного схрещування виявляється і друга закономірність успадковування, а саме щодо кількісного співвідношення різних класів фенотипів і генотипів в F_2 . Як видно із результатів випадкового поєднання (злиття) гамет, в умовах моногібридного схрещування в поколінні F_2 розщеплення за генотипом складає: $1AA + 2Aa + 1aa$, тобто $1:2:1$, а за фенотипом (із-за домінування фактора A) — $3:1$.

Це є проявом **другого закону Менделя**, згідно з яким у *друго-му і наступних поколіннях досліджувані ознаки розщеплюються у суворо визначених кількісних співвідношеннях*. Характер цих кількісних співвідношень, отже, кількість генотипових і фенотипових класів нащадків у F_2 , залежить від типу схрещування (моногібридного, полігібридного) та інших причин.

Досі мова йшла про алельні форми одного і того ж гена, що займають, як з'ясувалося потім, один і той же **локус** (місце) в гомологічних хромосомах. Г. Менделя, однак, цікавило, як успадковуються фактори або гени, що відповідають за різні ознаки, наприклад, за забарвлення насіння, висоту рослин, форму насіння, положення квіток тощо. Гени таких ознак містяться в різних локусах однієї або різних хромосом.

Схрещування, в якому батьківські форми відрізняються алелями двох різних генів, називаються **дигібридними**. Гібриди, гетерозиготні по двох локусах, називаються **дигетерозиготами**. Відповідно є **три-, тетра-** та **полігетерозиготи**.

Класичний приклад дигібридного схрещування знаходимо в роботах Г. Менделя, який схрещував рослини гороху з круглим жовтим насінням (домінантні ознаки) з рослинами, що мали зелене зморщене насіння (рецесивні ознаки). Генотипи батьківських форм цих рослин відповідно можна позначити так: $AABB$ і $aabb$. Схрещування цих рослин дало нащадків F_1 з фенотипом AB , тобто з домінантними ознаками, що підтверджує справедливість першого закону Менделя про одноманітність гібридів першого покоління:

$$AABB \times aabb \rightarrow AaBb.$$

Подальше самозапилення рослин F_1 дало можливість з'ясувати кількісні співвідношення різних фенотипів і генотипів в F_2 , тобто визначити характер розщеплення після схрещування $AaBb \times AaBb$ (рис. 7.2). Для того, щоб скористатися решіткою Пеннета або алгебраїчним розрахунком для визначення генотипів нащадків в F_2 , необхідно знати, які саме класи гамет утворюються у батьків.

Оскільки мова йде про дигібридне схрещування, то кожна гамета мусить утримувати два алельні гени — один із локуса *A*, другий — із локуса *B*. В локусі *A* у гетерозиготи є два алелі — *A* і *a*, в локусі *B* — алелі *B* і *b*. Комбінація цих алелів у складі гамет згідно з законом випадковості їх поєднання в гаметах буде такою:

$$(A + a)(B + b) = AB + Ab + aB + ab.$$

Таким чином, дигетерозигота утворює не два класи гамет, як це було у моногетерозиготи, а чотири. Варіанти генотипів нащадків F_2 у цьому випадку можна знайти з допомогою решітки Р. Пеннета (див. рис. 7.2), або алгебраїчно:

$$\begin{aligned} & (AB + Ab + aB + ab)(AB + Ab + aB + ab) = \\ & = AABV + AABb + AaBV + AaBb + AABb + AAbb + AaBb + Aabb + \\ & + AaBV + AaBb + aaBV + aaBb + AaBb + Aabb + aaBb + aabb. \end{aligned}$$

















Гамети ♂ \ Гамети ♀	AB	Ab	aB	ab
AB	 AABB	 AABb	 AaBB	 AaBb
Ab	 AABb	 AAbb	 AaBb	 Aabb
aB	 AaBB	 AaBb	 aaBB	 aaBb
ab	 AaBb	 Aabb	 aaBb	 aabb

Рис 7.2 Ілюстрація розщеплення за фенотипом у співвідношенні 9:3:3:1 за самоzapилення дигетерозиготних рослин гороху:

A — ген жовтого забарвлення насіння; *a* — ген зеленого забарвлення насіння; *B* — горошини гладенькі, *b* — горошини зморщені

Загальна формула розщеплення за генотипом в F_2 дигібридного схрещування виглядає так:

$$1AABV + 2AABb + 1AAbb + 2AaBV + 4AaBb + 2Aabb + \\ + 1aaBV + 2aaBb + 1aabb.$$

З урахуванням домінантності генів A і B можна записати формулу розщеплення за фенотипом, користуючись так званим **фенотиповим індексом**:

$$9A-B- + 3A-bb + 3aaB- + 1aabb.$$

Саме таких співвідношень генотипових і фенотипових класів слід очікувати, якщо розщеплення за дигібридного схрещування являє собою результат накладання двох моногібридних розщеплень:

а) за фенотипом: $(3A- + 1aa)(3B- + 1bb)$;

б) за генотипом: $(1AA + 2Aa + 1aa)(1BB + 2Bb + 1bb)$.

Таким чином, *алельні гени локусів A і B у мейозі незалежно розходяться в різні гамети, а потім незалежно комбінуються в зиготах* (запліднених яйцеклітинах). Це і є **третій закон Менделя** або **закон незалежного успадкування генів**.

Цей закон підтверджується не тільки результатами дигібридного, але й тригібридного і полігібридного схрещувань. За тригібридного схрещування матимемо накладання трьох моногібридних розщеплень:

а) за фенотипом: $(3A- + 1aa)(3B- + 1bb)(3C- + 1cc)$;

б) за генотипом: $(1AA + 2Aa + 1aa)(1BB + 2Bb + 1bb)(1CC + 2Cc + 1cc)$.

На заключення ще раз розглянемо формули розщеплення по генотипу і фенотипу за різних схрещувань і наведемо загальні формули розщеплення (табл. 7.1).

Зазначені закономірності розщеплення за генотипом і фенотипом спостерігаються не завжди. Найважливішою умовою такого розщеплення є локалізація досліджуваних генів у різних хромосомах, або ж в одній хромосомі, але на досить значній відстані (розділ 8.4). Саме за цих умов можливе незалежне розходження генів у різні гамети під час мейозу. У. Сеттон (1903) дав пояснення правилу чистоти гамет і закону незалежного успадкування генів з позицій поведінки хромосом у мейозі. Він пояснив розщеплення контрастуючих ознак розходженням гомологічних — батьківських і материнських — хромосом у метафазі I, оскільки кожна гомологічна хромосома містить лише один алель даного гена, а всього їх в даній ділянці (локусі) хромосом диплоїдного організму може бути не більше двох. *Цитологічною основою незалежного успадкування алельних і неалельних генів є незалежне розходження по*

Таблиця 71

Менделівське розщеплення в F_2 по генотипу та фенотипу за різних типів схрещувань

Типи схрещувань і генотипи гетерозигот	Кількість пар алелей у гетерозигот, їх позначення	Кількість класів і генотипи гамет у гетерозигот	Кількість фенотипових класів і формули розщеплення	Кількість генотипових класів і формули розщеплення
Моногібридне. Aa	1. A, a	2. $(A + a)$	2, 3 1, а саме $3A + 1a$	3, 1 2 1, тобто $1AA + 2Aa + 1aa$
Дигібридне. $AaBb$	2. A, a B, b	4. $(AB + Ab + aB + ab)$	4, 9 3 3 1, а саме $9AB + 3Ab + 3aB + 1ab$, тобто $(3A + 1a)(3B + 1b)$ або $(3 + 1)^2$	9, 1 2 1 2 4 2 1 2 1, тобто $(1AA + 2Aa + 1aa) \times$ $\times (1BB + 2Bb + 1bb)$, або $(1 + 2 + 1)^2$
Тригібридне. $AaBbCc$	3. A, a B, b C, c	8. ABC, ABc 1 T 1H	8, 27 9 9 9 3 3 3 1 або $(3 + 1)^3$	27. $(1 + 2 + 1)^3$
Полігібридне (загальні формули)	n, A, a B, b C, c N, n	2^n	$2^n, (3 + 1)^n$	$3^n, (1 + 2 + 1)^n$

гаметах гомологічних і гетерологічних материнських і батьківських хромосом. Кількість можливих комбінацій материнських і батьківських хромосом в ядрах гамет складає 2^n , де n — гаплоїдне число хромосом. Для людини, в клітинах якої 23 пари хромосом, число згаданих комбінацій дорівнює 2^{23} . Незалежне розходження хромосом у мейозі є одним із механізмів виникнення комбінаційної мінливості (розділ 11.1), яка має істотне значення для еволюції.

Таким чином, результати досліджень Г. Менделя і його послідовників зводяться до трьох основних законів успадкування, які визначаються принципами домінантності та рецесивності генів, а також правилом чистоти гамет.

Із досліджень Г. Менделя витікають дуже важливі принципи спадковості, про які автор прямо не говорив, але які сьогодні цілком очевидні.

- 1) принцип матеріальності явища спадковості;
- 2) принцип дискретної (генної) організації геномів та генотипів;
- 3) принцип відносної постійності (консервативності) гена;
- 4) принцип алельного стану гена.

Менделівські закони успадковування і принципи спадковості являють собою основний зміст генетики. Їх відкриття створило умови для поєднання всіх природничих наук — біології, хімії, фізики, математики — у вивченні біологічних процесів на основі всебічного дослідження природної одиниці виміру життєвих процесів — гена.

7.3. Відхилення від менделівських формул розщеплення за незалежного успадковування генів

Успадковування здійснюється у відповідності з менделівськими формулами розщеплення, якщо:

- 1) гени локалізуються в різних хромосомах або на досить значній відстані в одній хромосомі;
- 2) різні типи гамет утворюються в мейозі в однакових співвідношеннях (рівноймовірно);
- 3) генетично різні типи зигот і відповідні генотипи виникають і виживають з однаковою вірогідністю;
- 4) функція генів проявляється повністю, отже спостерігається повна експресивність і повна пенетрантність ознак;
- 5) спостерігається повна домінантність;
- 6) досліди провадяться на великій вибірці.

7.3.1. Причини відхилень від формул менделівського розщеплення

Всі відхилення у співвідношенні фенотипових класів серед нащадків F_2 , можна поділити на дві групи:

- відхилення, що спостерігаються за незалежного (менделівського) успадковування (розщеплення за генотипом не змінюється);
- відхилення, що пояснюються особливостями успадковування окремих генів (зчеплене успадковування, зчепне зі статтю, нехромосомне успадковування тощо).

Розглянемо більш детально ці дві групи відхилень.

Відхилення від менделівських формул розщеплення за незалежного успадковування

Незалежне успадковування генів може супроводжуватись відхиленнями в розщепленні ознак у F_2 в порівнянні з класичними фор-

мулами 3:1, 9:3:3:1 і т. ін. При цьому розщеплення за генотипом, як правило, не змінюється. В основі відхилень у розщепленні за фенотипом найчастіше лежать:

- 1) статистичні причини;
- 2) диференційна смертність різних генотипів;
- 3) особливості прояву генів за даних умов;
- 4) особливості взаємодії окремих генів.

Відхилення, що пояснюються статистичними причинами, найчастіше пов'язані з малою вибіркою. Об'єктивно визначитися, наскільки отриманий у досліді результат відповідає формулі менделівського розщеплення, допомагає статистичний метод обробки цифрових даних χ^2 (хі-квадрат). χ^2 визначають за формулою:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

де O — фактична кількість особин у кожному фенотиповому класі; E — теоретично розрахована кількість особин у цьому класі за формулою менделівського розщеплення; \sum — сума показників усіх класів.

За значенням χ^2 у відповідній таблиці знаходять показник вірогідності p . Якщо $p < 0,05$, то відхилення від класичних менделівських формул вважають вірогідними.

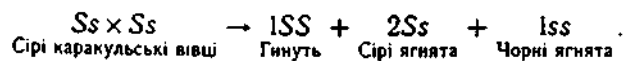
Відхилення, що пов'язані з диференційною смертністю генотипів, можна простежити на таких прикладах.

За схрещування жовтих лабораторних мишей (генотип $A^y a$) спостерігається розщеплення фенотипів у співвідношенні 2:1, а не 3:1, як це передбачено формулою моногібридного розщеплення:



У цьому прикладі домінуючий ген A^y обумовлює жовте забарвлення шерсті і, крім того, рецесивний летальний ефект. У гомозиготному стані ($A^y A^y$) він несумісний з життям і відповідний клас особин в F_2 не спостерігається.

Аналогічне розщеплення за фенотипом матимемо, схрещуючи між собою каракульських овець, які утримують у гетерозиготному стані домінуючий ген S , що одночасно є рецесивним летальним геном:



Ягнята з генотипом SS гинуть з причини недорозвитку рубця шлунку, тому розщеплення серед дорослих овець складає 2:1.

Альбінізм у рослин обумовлюється рецесивним летальним геном *a*. Цей ген у гомозиготному стані обумовлює безхлорофільність рослини і нездатність до фотосинтезу, чим і пояснюється не-сумісність явища альбінізму з життям у більшості рослин.

У наведених прикладах розщеплення за фенотипом змінювалось завдяки наявності в генотипах батьків рецесивних летальних генів. Слід зазначити, що мутаційний процес може призводити і до утворення домінантних летальних генів, які спричиняють смертність 90—100% генотипів. Розрізняють також гени напівлетальні (смертність складає від 50 до 90% генотипів) і гени, що зменшують життєздатність (смертність особин — від 10 до 50%).

Прикладом гена, що зменшує життєздатність, може бути рецесивний мутантний ген *vg* у дрозофіли. Гомозиготний стан цього гена (генотип *vg vg*) супроводжується летальністю 15% особин.

Зрозуміло, що в усіх цих випадках розщеплення за фенотипом в тій чи іншій мірі відхиляється від менделівських формул розщеплення, хоча процес успадковування генів не порушується і розщеплення за генотипом не змінюється.

Відхилення, визвані неповним проявом функцій генів за даних умов, зустрічаються дуже часто.

Неповний вияв функції гена може обумовлюватися неповною пенетрантністю і неповною експресивністю відповідної ознаки. Оба поняття — пенетрантність та експресивність — були введені у 1925 р. М. В. Тимофеевим-Ресовським для опису варіюючого прояву генів.

Пенетрантність — це частка особин з даною ознакою серед усіх особин, що утримують відповідний ген. Зрозуміло, що в умовах нестабільної пенетрантності, тобто коли якась ознака то виявляється, то не виявляється в залежності від конкретних умов, розщеплення за фенотипом може істотно змінюватися. Варіабельне співвідношення фенотипових класів залежно від умов навколишнього або генотипового середовища носить назву **варіабельності пенетрантності**. Прикладом може бути забарвлення пелюсток у первоцвіту китайського (*Primula chinensis*), у якого домінантне рожеве забарвлення *P* (ген *p*⁺) проявляється в інтервалі температур 15—25 °С. Якщо ж температура перевищує 30 °С, то всі квіти білі (виявляється лише рецесивна ознака *p*). Таким чином, моногібридне розщеплення 3:1 у цьому випадку спостерігається лише за певних умов (15—25 °С), а в умовах температури, що коливається біля 30 °С, можна отримати різні співвідношення фенотипів від 3Р:1р до 100% рослин з білими квітками.

Варіабельну пенетрантність виявляє також напівдомінантний ген *e* (*ebony*), який у гомозиготному стані (*ee*) обумовлює чорне

(рецесивне) забарвлення тіла дрозофіли, в той час як у гетерозигот (e^+e) спостерігається проміжне успадковування. Таке неповне домінування гена e у гетерозиготи можливе лише в умовах невисокої температури навколишнього середовища (14—20 °C). При цьому гомозиготні доміанти e^+e^+ мають дике (сіре) забарвлення тіла, гетерозиготи e^+e — темно-сіре, а гомозиготні рецесиви ee — чорне. Таким чином, розщеплення за фенотипом (із-за неповного прояву гена e у гетерозигот) складатиме 1:2:1, що співпадає з розщепленням за генотипом ($1e^+e^+ + 2e^+e + 1ee$). В умовах більш високих температур (27—29 °C) ген e із напівдомінантного переходить у рецесивний і гетерозиготи уподібнюються жовто-сірим гомозиготам e^-e^- . За цих умов пенетрантність гена e у гетерозигот дорівнює нулю і розщеплення за фенотипом складає 3:1, що відповідає формулі менделівського моногібридного розщеплення.

Експресивність — це інтенсивність (ступінь) прояву досліджуваної ознаки в залежності від генотипу та зовнішніх умов. Якщо інтенсивність прояву ознаки неоднакова у різних особин вибірки, то це призводить до збільшення кількості фенотипових класів F_2 . Тому неповна експресивність ознаки, як і неповна пенетрантність, може істотно змінити формулу розщеплення за фенотипом.

Експресивність і пенетрантність ознаки залежать не тільки від зовнішніх умов, але й від генотипу і його особливостей. Істотне значення має так звана доза гена, тобто кількість його копій у геномі, а також положення гена, тобто місце розташування останнього у хромосомі.

Із збільшенням дози гена деякі кількісні ознаки краще експресуються, тобто дія гена сумується або кумулюється. Так, у кукурудзи від дози гена залежить ступінь забарвлення зерна, вага і розміри рослини, рівень окремих фізіологічних і біохімічних процесів тощо.

В інших випадках збільшення або зменшення дози гена може призвести до ослаблення експресивності певних ознак, зниження життєздатності особин та інших небажаних наслідків. Зміна дози гена супроводжується певними відхиленнями від класичного розщеплення як за фенотипом, так і за генотипом (розділ 11.7).

Класичним прикладом залежності пенетрантності від положення гена у хромосомі є дослід на дрозофілі з переміщенням у геномі нормального алеля w^+ , який обумовлює темно-червоний колір очей. У гомозигот по рецесивному алелю цього гена (ww) очі білі, бо фасетки незабарвлені. Якщо домінантний ген w^+ перенести із X-хромосоми в іншу хромосому, в ділянку, багату гетерохроматином, то у гетерозигот w^+/w в частині фасеток ока алель w^+ не проявляється, і очі стають мозаїчними (мозаїка темно-червоних і білих плям).

Якщо ж алель w^+ віддалити від гетерохроматину, то він працює нормально, і очі у гетерозигот w^+w виявляються темно-червоними. Цей дослід свідчить про те, що генне середовище істотно впливає на функцію гена.

Отже, положення гена у хромосомі може визначати як експресивність, так і пенетрантність відповідних ознак, що істотно впливає на співвідношення фенотипів F_2 .

Пенетрантність та експресивність ознак залежать також від генів-модифікаторів, роль яких у варіюванні генотипу особливо відзначав С. С. Четвериков. Ці гени не визначають будь-якої конкретної ознаки, але вони здатні підсилювати або послаблювати функцію інших генів.

7.3.2. Взаємодія генів як одна із причин відхилень у розщепленні за фенотипом

Відхилення, визвані взаємодією генів, заслуговують особливої уваги. Жоден ген не функціонує сам по собі, тобто незалежно від інших генів. Як з'ясувалося, ця елементарна одиниця спадкової інформації функціонально тісно пов'язана з іншими генами, найкраща сукупність яких у генотипі складає так званий **генний баланс**.

І. І. Шмальгаузен висловив точку зору, що між генами як елементами спадкової інформації існують системні зв'язки і що хромосома — це блок зв'язаної інформації. Отже, взаємодія генів є проявом нормального функціонування геному. Механізми цих взаємодій ще недостатньо вивчені, але відомо багато типів взаємодій алельних і неалельних генів, що спричиняють певні відхилення у співвідношенні фенотипових класів F_2 .

Типи взаємодії алельних генів такі:

- 1) повне домінування;
- 2) неповне домінування (або проміжне успадкування);
- 3) кодомінування;
- 4) міжалельна комплементація.

Слід зазначити, що тільки за **повного домінування** (тобто коли у гетерозигот Aa виявляється лише одна домінуюча ознака A) успадкування ознак здійснюється у повній відповідності з формулами розщеплення за фенотипом.

При неповному домінуванні гібрид F_1 має свій власний фенотип, відмінний від фенотипів батьків. Вияв ознак у гетерозигот Aa є проміжним, з більшим або меншим відхиленням від домінуючого та рецесивного стану. За проміжного успадкування всі особини

F_1 (Aa) фенотипово однаманітні, як і передбачає перший закон Г. Менделя, а в F_2 розщеплення за фенотипом співпадає з розщепленням за генотипом.

Прикладом неповного домінування слугує проміжне рожеве забарвлення пелюсток у гібридів нічної красуні (*Mirabilis jalapa*), отриманих схрещуванням червоноквіткових і білокріткових форм. У зв'язку з тим, що гетерозигота Aa за неповного домінування гена A має власний фенотиповий вияв, формули розщеплення за фенотипом і генотипом в F_2 співпадають (1:2:1) (рис. 7.3):



Аналогічний тип розщеплення в F_2 виявляється у випадку кодомінування генів (наприклад, за успадковування груп крові системи АВО та ін.).

Кодомінування генів призводить до їх одночасного прояву у гетерозигот, завдяки чому останні відрізняються за фенотипом від гомозиготних форм і складають окремий фенотиповий клас.

Міжалельна комплементация спостерігається у **компаундів** (a_1a_2 , a_2a_3 і т. ін.), якщо продуктом мутантного гена a слугує поліпептид, який є субодиницею білка-гомомультимера (значно рідше — гетеромультимера). Поєднання у компаунда двох рецесивних алельних генів, кожен з яких кодує мутантний поліпептидний ланцюг, іноді призводить до відтворення ознаки дикого типу, бо із двох типів частково ушкоджених субодиниць збирається четвертинний білок з майже нормальною функцією. В цих випадках рецесивні алелі одного і того ж гена кодують поліпептиди з ушкодженням різних доменів (певних функціональних ділянок) у молекулах. Якщо збірка четвертинного білка у компаунда здійснюється із таких субодиниць, здатних компенсувати функціональну активність одна одної, то ферментативна активність цього білка принаймні

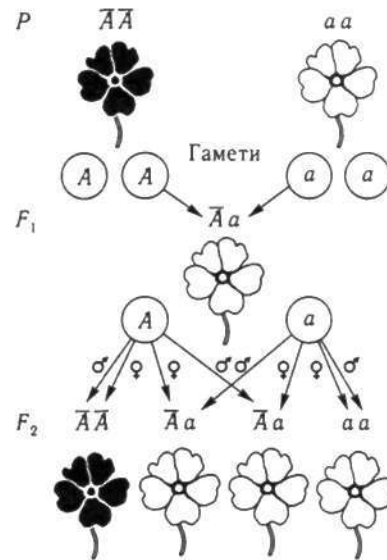
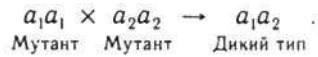


Рис. 7.3. Розщеплення в моногібридному схрещуванні за неповного домінування у нічної красуні *Mirabilis jalapa*

частково буде відновлена. Тому схрещування двох фенотипово однакових мутантів призводить до утворення гібридів F_1 з диким фенотипом:



Міжалельна комплементация дуже нагадує результат комплементарної взаємодії генів, однак в останньому випадку взаємодіють продукти неалельних генів.

Типи взаємодії неалельних генів визначають як такі:

- 1) модифікація функцій генів під впливом генів-модифікаторів;
- 2) комплементарність генів;
- 3) полімерність їх дії;
- 4) плейотропність.

Будь-який з цих типів взаємодії генів може призвести до відхилення від менделівських формул розщеплення за фенотипом при ди-, три- та полігібридних схрещуваннях. Властиве дигібридному схрещуванню розщеплення за фенотипом 9:3:3:1 може змінитися на 9:7; 9:3:4; 12:3:1; 13:3; 15:1 тощо.

Модифікація функцій генів під впливом генів-модифікаторів може бути дуже різноманітною. До модифікаторів відносять гени, що можуть не мати власного фенотипового вияву, але модифікують (змінюють) експресивність та пенетрантність досліджуваної ознаки. Всі гени-модифікатори можна поділити на **гени-інтенсифікатори** та **гени-супресори**. Перші з них стимулюють функцію інших генів, а другі — пригнічують.

У *Drosophila* рецесивний ген *vti* у гомозиготному стані (*vti vti*) визначає редукцію поперечних жилок крила. Виявилось, що у різних ліній дрозофіли за однакових температурних умов гомозиготи *vti vti* утримують різну кількість поперечних жилок крила (від 45 до 100%). За схрещування нормальних мух *vti⁺vti⁺* з мухами *vti vti* числові співвідношення фенотипових класів в F_2 ускладнюються тим, що одночасно з розщепленням основних генів йде розщеплення і генів-модифікаторів, чому типове розщеплення 3:1 спостерігається дуже рідко.

Одним із проявів модифікуючого впливу одних генів на інші є так звана **супресія**. Супресійні гени подавляють експресію інших генів. Якщо при цьому ген-супресор не має власного фенотипового прояву, то його позначають символом *su⁺* або *I*. Рецесивний алель цього гена має позначення *su* або *i*.

Розглянемо супресію гена *C*, який обумовлює чорне оперення у курей. Білі легорни (генотип *CCII*), хоч і утримують домі-

нантний ген чорного оперення *C*, є білими, про що свідчить назва породи. Це пояснюється наявністю в їх генотипі супресорного гена *I*, який подавляє функцію гена *C*. Птахи інших порід — плімутроки і віандоти — теж білі, але з інших причин: вони гомозиготні по рецесивному алелю *c* і не здатні синтезувати відповідний пігмент (генотип цих курей — *ccii*). Після схрещування *CCII* × *ccii* в F_2 спостерігається розщеплення фенотипів птахів на білих і чорних у співвідношенні 13:3. В цьому легко переконатися, скориставшись решіткою Пеннета або, що значно зручніше, фенотиповим індексом:

Значення фенотипового індекса за дигібридного схрещування	Оперення у птахів
$9C-I-$ $3C-ii$ $3ccI-$ $1ccii$	біле чорне біле біле
В сумі:	13 білих і 3 чорних

У наведених прикладах гени-супресори, крім пригнічуючого впливу на інші гени, не мали власного фенотипового вияву. Однак нерідко буває й так, що ген, який контролює ту чи іншу ознаку, в той же час подавляє інший неалельний ген. Це явище називають епістазом, а гени — відповідно епістатичними та гіпостатичними. На відміну від домінування у цьому випадку мова йде про взаємодію неалельних генів.

Прикладом епістазу може бути взаємодія генів, що обумовлюють масть (забарвлення шерсті) у коней. Ворона масть залежить від домінантного гена *B*, а руда — від рецесивного гена *b*. Ген *C*, що належить до іншої пари алелів, призводить до раннього посивіння волосу, внаслідок чого масть тварини виявляється сивою, незалежно від того, чи є в генотипі гени *B* або *b*. Іншими словами, ці гени гіпостатичні щодо гена *C*. Після схрещування *BbCc* × *BbCc* отримуємо розщеплення в F_2 за фенотипом:

$9B-C-$ — сіра масть
 $3B-cc$ — ворона масть
 $3bbC-$ — сіра масть
 $1bbcc$ — руда масть,

тобто 12 сірих, 3 вороних і 1 рудий кінь.

В деяких випадках гомозиготний стан рецесивного алеля однієї пари повністю пригнічує прояв алелів іншої пари. Так, наприклад,

у домашньої миші дике рудовато-сіре забарвлення шерсті (його називають агуті) залежить від двох домінуючих генів — A і C . Ген C визначає синтез пігменту, а ген A — розподіл його вздовж волосу (основа і кінчик волосу — чорні, а в центрі — жовте кільце). Ген a в гомозиготному стані за наявності гена C обумовлює чорне забарвлення, а рецесивний ген c в гомозиготі — біле, незалежно від наявності генів A або a (не утворюється пігмент).

Враховуючи сказане, можна визначити співвідношення фенотипових класів особин в F_2 :

$9A-C-$ — агуті (дикий тип)
 $3A-cc$ — альбінос
 $3aaC-$ — чорні
 $1aacc$ — альбінос

Отже, розщеплення мишей за фенотипом складає: 9 агуті, 3 чорних, 4 білих.

Явище, коли $cc > A$ і $cc > a$, називають **криптомерією** або рецесивним епістазом. Буває **подвійний** рецесивний епістаз, коли $aa > C$, а $cc > A$.

Комплементарність генів. Явище комплементарності — взаємно доповнюючий вплив двох неалельних генів, внаслідок чого домінуючі алелі цих генів обумовлюють нормальний (дикий) фенотип. Якщо ж до нового фенотипового прояву в F_2 призводить сумісна взаємодія двох рецесивних алелів цих генів, то таке явище називають **новоутворенням**.

Те і інше можна простежити, спостерігаючи взаємодію домінуючих і рецесивних неалельних генів, що визначають колір фасеток у дрозофіли (забарвлення ока). Є чимало форм дрозофіли, що відрізняються за цією ознакою. Від дикого темно-червоного забарвлення очей існує багато перехідних форм, закінчуючи білими очима. Дике темно-червоне забарвлення залежить від сумісної наявності двох пігментів — червоного і бурого, які утворюються шляхом послідовних ферментативних процесів (рис. 7.4).

Мутанти v , cn та інші мають не такі темно-червоні очі, як мухи дикого типу, із-за відсутності бурого пігменту, а мутанти bw мають коричневе забарвлення очей із-за відсутності червоного пігменту. Дж. Бідл та Б. Ефрусі були першими, хто вивчав механізми утворення пігменту та залежність цього синтезу від мутацій v і cn . Саме вони висловили припущення, що кожна з цих мутацій порушує функцію одного із ферментів, необхідних для утворення певних попередників бурого пігменту. На цій підставі ними була сформульована гіпотеза «**один ген — один фермент**», яка потім була

блискуче підтверджена в дослідах на більш простих об'єктах — грибках та бактеріях.

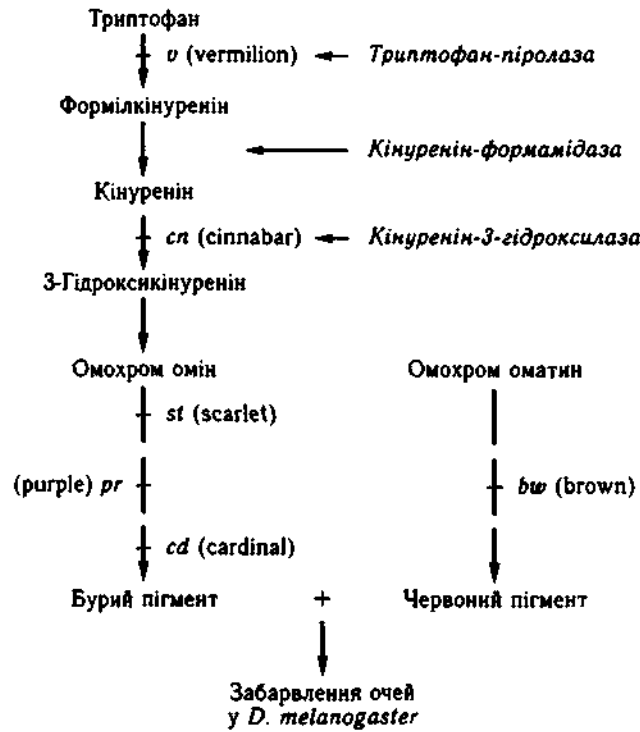


Рис. 7.4. Схема біосинтезу пігментів ока у *D. melanogaster*:

Блок біохімічних перетворень за тих чи інших мутацій позначено горизонтальною рисою

Схрещуючи мух з яскраво-червоними очима і мух з коричневими очима (рис. 7.5), в F_1 отримують мух, які мають темно-червоні очі (дикий фенотип). Це пояснюється комплементарною взаємодією у гетерозигот доміnantних неалельних генів. Як приклад можна розглянути результати схрещування мутантів дрозофіли *st* і *bw*.

Мутанти *st* (scarlet) — мухи з яскраво-червоними очима — за схрещування з мутантами *bw* (brown) з коричневими очима в F_1 дають нащадків з нормальним темно-червоним забарвленням фасе-

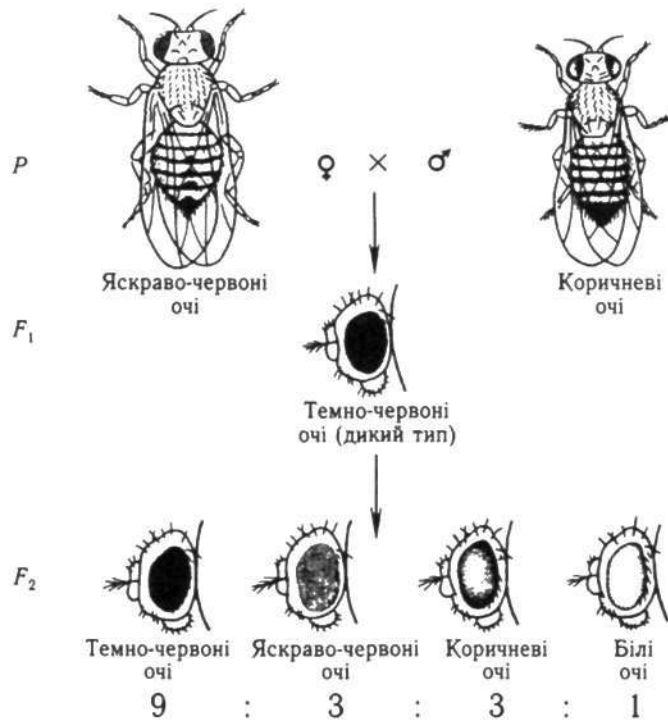


Рис. 7.5. Результати схрещування *D. melanogaster* з яскраво-червоними (*st st*) і коричневими (*bw bw*) очима

ток. Спостерігається комплементарна дія доміnantних алелів *st⁺* і *bw⁺* у дигетерозигот:

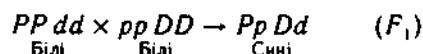


В F_2 цього схрещування утворюється 4 фенотипових класи:

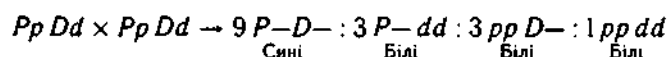
- 9 *st⁺-bw⁺-* — темно-червоні очі
- 3 *st⁺-bw bw* — коричневі очі
- 3 *st st bw⁺-* — яскраво-червоні очі
- 1 *st st bw bw* — білі очі

Подвійний гомозиготний рецесив (*st st bw bw*), якому властивий фенотип, відсутній у батьківських форм, являє собою **новоутворення**.

З іншими прикладами комплементарності можна познайомитись, вивчаючи забарвлення баклажанів, у яких сине забарвлення залежить від сумісної дії двох пар неалельних генів P і D :



У другому поколінні (F_2):



(розщеплення 9:7).

Прикладом комплементарних генів можуть бути не тільки ті, продукти яких приймають участь у ланцюгах послідовних реакцій, але й ті, що кодують різні за будовою поліпептидні ланцюги четвертинних білків. Так, молекула гемоглобіну (HbA) складається із двох типів поліпептидних ланцюгів ($\alpha\beta\beta$), що кодуються неалельними комплементарними генами.

Полімерність генів. Полімерія — це явище, коли одна і та ж ознака залежить від двох і більшої кількості пар неалельних генів. Характерна для визначення кількісних ознак.

Розрізняють некумулятивну і кумулятивну полімерію.

Прикладом некумулятивної може бути взаємодія генів, що кодують трикутну форму плодів (стручків) у грициків звичайних (*Capsella bursa pastoris*). У цьому випадку є дві неалельні пари генів, що діють однозначно — обумовлюють трикутну форму плода. Такі однозначні гени позначають однією і тією ж буквою з цифровим індексом — A_1 і A_2 . Схрещування гомозиготної трикутної форми ($A_1A_1A_2A_2$) з гомозиготною овальною ($a_1a_1a_2a_2$) в F_2 дає розщеплення 15:1.

Прикладом кумулятивної полімерії є взаємодія генів, що обумовлюють забарвлення ендосперму зерен пшениці. Інтенсивність забарвлення зерен (від інтенсивно-червоного до зовсім білого) залежить від кількості в генотипі домінантних алелів трьох різних генів — A_1 , A_2 і A_3 . Найінтенсивніше забарвлені зерна генотипу $A_1A_1A_2A_2A_3A_3$, а зерна $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$ — не пігментовані. Ці особливості взаємодії генів, що визначають барву зерен пшениці, були з'ясовані шведським вченим З. Нільсоном-Еле, якого вважають основоположником генетики кількісних ознак. За схрещування крайніх за забарвленням зерен форм пшениці в F_2 спостерігається розщеплення у такому співвідношенні:

$$1 : 6 : 15 : 20 : 15 : 6 : 1.$$

Фенотип кожного із зазначених класів (інтенсивність забарвлення зерен) залежить від кількості домінантних алелів гена

у генотипі, яка відповідно складає:

6:5:4:3:2:1:0.

За типом кумулятивної полімерії успадковується чимало кількісних ознак, наприклад: пігментація шкіри (людини), удійність (корів), несучість (курей), врожайність (рослин) та інші ознаки.

Плейотропія. Досі розглядалися взаємовідносини між локусами хромосом, які визначають одну і ту ж ознаку. Зворотна ситуація, коли один ген впливає на декілька ознак, називається **плейотропією**. Ще Г. Мендель відзначав, що один із досліджуваних ним факторів одночасно впливав на колір квіток (білі або червоні), забарвлення насіння (сіре або коричневе) і забарвлення пазух листків (наявність або відсутність червонуватих плям).

У дрозофіли рецесивний ген *ug* визначає редуковані (зачаткові) крила. Крім того, у цих мух змінені дзизкальця, дещо змінені репродуктивні органи, знижена плодючість тощо.

Прикладом плейотропного гена у людини слугує рецесивний ген, який визначає фенілкетонурію — хворобу з порушенням обміну ароматичних амінокислот, що призводить до серйозних розумових та інших порушень. Люди, гомозиготні по цьому гену, відрізняються від здорових рівнем вмісту фенілаланіну в крові, коефіцієнтом розумового розвитку (IQ), розміром голови, кольором волосся. Світлий колір волосся у таких хворих обумовлений тим, що їх організм неспроможний синтезувати тирозин із фенілаланіну.

7.3.3. Біохімічні механізми взаємодії генів

Взаємодія генів, як алельних, так і неалельних, здійснюється, як правило, на рівні генних продуктів — негенетичних молекул РНК (іРНК, рРНК, тРНК) або відповідних поліпептидів, що кодуються генами. Суть взаємовідносин між продуктами алельних та неалельних генів може бути дуже різною в кожному конкретному випадку. Найбільш типові із можливих взаємодій можуть бути такими:

1. Білковий продукт **домінантного** гена більш активний, ніж рецесивного, або ж **рецесивний** ген кодує взагалі неактивний продукт. Це пояснює явища домінантності та рецесивності. У випадку кодомінантності продукти обох алельних генів є функціонально активними одночасно.

2. Взаємодія продуктів мутантних алельних генів, що кодують субодиниці гомомультимера, деколи призводить до **міжалельної**

комплементарності. У цьому випадку взаємодія мутантних субодиниць білка сприяє поліпшенню його конформації, а, отже, і функції.

3. Причиною комплементарності генів може бути взаємодія продуктів різних (неалельних) генів на рівні четвертинної структури білка (формування молекул гемоглобіну із поліпептидних ланцюгів типу α і β , збірка ізозимів лактатдегідрогенази із субодиниць А і В тощо). Комплементарною є також взаємодія продуктів неалельних генів, що каталізують різні стадії синтезу або розщеплення однієї і тієї ж сполуки. Так, наприклад, синтез триптофану із хоризмової кислоти у *E. coli* кодується принаймні п'ятьма генами — *trpA*, *B*, *C*, *D*, *E*, продукти яких (ферменти) забезпечують різні стадії цього процесу. Синтез гістидину у *E. coli* потребує 10 ферментів. Гени всіх цих білків — комплементарні.

4. Щодо генів-модифікаторів, то біохімічний механізм їх взаємодії з іншими генами полягає у регулюванні ними синтезу продуктів структурних генів, а також у біохімічній модифікації цих продуктів після їх синтезу (наприклад, фосфорилування фосфорилази печінки, ацетилювання гістонів тощо).

Механізм міжгенних супресорних взаємодій добре простежується на прикладі супресій, що захищають від передчасної термінації біосинтезу білка. Триплет UGG, що у складі іРНК кодує триптофан, може за певних умов перетворитися в один із термінуючих кодонів:

UGG $\left\{ \begin{array}{l} \text{UAG (амбер, янтар)} \\ \text{UAA (охра)} \\ \text{UGA (опал)} \end{array} \right.$

Фаги, що несуть подібні мутації, не можуть розмножуватися в *E. coli* дикого типу. В інших штаммах бактерій, що мають в геномі ген *su^t*, подібні мутанти можуть розмножуватись. Причиною цього є супресорна мутація в антикодоні тРНК. Відомо декілька типів генів *su^t*, які кодують тРНК із зміненими антикодонами і тому забезпечують трансляцію іРНК за мутацій амбер, опал та охра.

До генів-модифікаторів можна віднести також гени, що кодують репресори та активатори інших генів (репресор *lac*-оперону *E. coli* і т. ін.).

5. Плейотропний вплив гена виявляється завдяки тому, що продукт цього гена приймає участь у численних реакціях і процесах. Оскільки функція окремого гена є складовою генного балансу, є підстави вважати, що плейотропність певною мірою властива майже всім генам.

ЗЧЕПНЕ УСПАДКОВУВАННЯ І КРОСИНГОВЕР

8.1. Закономірності успадкування за повного і неповного зчеплення генів

Зчепне успадкування є однією з причин відхилень від формул менделівського розщеплення. Суть у тому, що незалежне розходження неалельних генів у різні гамети за мейотичного поділу клітин не завжди можливе і чимало генів успадковуються сумісно, або, як кажуть, зчепно.

Якщо гени містяться в різних хромосомах, то вони розподіляються по гаметах незалежно і випадково у повній відповідності з розходженням хромосом у мейозі. Однак генів значно більше, ніж хромосом. У людини нараховують біля 30 тис. генів на 23 пари хромосом, отже в одній хромосомі можуть знаходитися сотні генів. Цим пояснюється той факт, що чимало ознак можуть успадковуватися сумісно, тобто зчепно.

Гени, що належать одній хромосомі, складають одну групу зчеплення. Кількість груп зчеплення у диплоїда мусить дорівнювати кількості пар хромосом або (що одне і те ж) кількості хромосом гаплоїдного набору. Сказане повністю підтвердилося в дослідях з усіма вивченими у цьому відношенні організмами.

Явище зчепного успадкування вперше спостерігали в 1906 р. В. Бетсон і Р. Пеннет у дослідях на духмяному горошку *Lathyrus odoratus*. Автори вивчали успадкування ознак забарвлення квітки — пурпурна (P) або червона (p) і форми пилкових зерен — продовгувата (L) або кругла (l). За схрещування $PPLL \times ppll \rightarrow PpLl$ всі рослини в F_1 мали пурпурні квітки і подовжену форму пилку, тобто домінантні ознаки. Після самозапилення цих рослин у F_2 було виявлено 4 фенотипових класи, але в іншому, ніж 9:3:3:1, співвідношенні. Рослин з батьківськими комбінаціями ознак (PL і pl) було набагато більше, ніж комбінацій Pl і pL. Отже, батьківські комбінації алелей PL і pl переважно попадали в гамети, в той час як їх рекомбінантні сполучення (pL і Pl) у гамети потрапляли

значно рідше. Це був один із перших прикладів успадковування, яке в подальшому було назване неповним зчепленням.

Розуміння суті цього явища стало можливим лише після досліджень Т. Моргана і його співробітників А. Стертеванта, Г. Меллера, К. Бріджеса та ін. Т. Моргану належить сам термін «зчеплення генів» і пояснення цього явища. Хромосома, за Морганом, являє собою окрему матеріальну і функціональну одиницю в процесі мейозу. Всі гени, що знаходяться в одній хромосомі, зв'язані один з одним субстратом хромосоми і їх успадковування визначається поведінкою цієї хромосоми в мейозі.

Успадковування зчеплених генів має свої особливості, які відрізняють його від незалежного успадковування. За зчеплення генів у складі статевих хромосом наслідки реципрокних схрещувань будуть різними. Успадковування генів, зчеплених в аутосомах, від напрямку схрещувань не залежить.

Крайнім проявом зчепного успадковування є так зване повне зчеплення, за якого будь-які переміщення генів між хромосоми виключаються. Якщо припустити, що два гени повністю зчеплені, то дигібрид $AaBb$ утримує два неалельні гени в одній гомологічній хромосомі, що схематично можна позначити як $\frac{AB}{ab}$ або $\frac{Ab}{aB}$. Горизонтальна риса в цьому випадку означає пару гомологічних хромосом, а її безперервність вказує на належність відповідних неалельних генів (наприклад, AB або ab) до однієї з них.

За відсутності зчеплення генів зазначена дигетерозигота ($AaBb$) може бути позначена як $\frac{A B}{a b}$, $\frac{a b}{A B}$, $\frac{a B}{A b}$ або $\frac{A b}{a B}$.

За повного зчеплення гени успадковуються однією групою, тобто як один ген. В цьому легко переконатися на прикладі схрещування організмів, що відрізняються двома парами ознак, залежних від зчеплених генів: $\frac{AB}{AB} \times \frac{ab}{ab}$. Гібрид F_1 від такого схрещування матиме генотип $\frac{AB}{ab}$. Схрещуючи гібридів F_1 між собою: $\frac{AB}{ab} \times \frac{AB}{ab}$, отримаємо розщеплення за генотипом $1 \frac{AB}{AB} + 2 \frac{AB}{ab} + 1 \frac{ab}{ab}$.

Якщо генам A і B властиве повне домінування, то розщеплення за фенотипом буде 3:1, а не 9:3:3:1, як слід було б очікувати від дигібридного схрещування за вільного комбінування генів.

Аналізуюче схрещування $\frac{AB}{ab} \times \frac{ab}{ab}$ дає розщеплення $2 \frac{AB}{ab} + 2 \frac{ab}{ab}$, тобто 1:1, а не 1:1:1:1. Таким чином, замість чотирьох фенотипових класів, які могли б виявитися за незалежного комбінування генів, виявляється два.

З наведеного прикладу видно, що повністю зчеплені гени успадковуються разом, і тому розщеплення за генотипом і фенотипом здійснюється за зразком моногібридного схрещування. Слід зазначити, що, крім істинного зчеплення генів, бувають явища, що дуже подібні до зчеплення за своїми проявами, але відмінні за своєю природою. Прикладом може бути міжхромосомне зчеплення, яке виникає іноді з причини порушення вільного комбінування негомологічних хромосом у мейозі. Розрізнити справжнє і несправжнє зчеплення можна з допомогою методів генетичного аналізу.

Важливо підкреслити, що повне зчеплення генів у природі зустрічається дуже рідко. Переважній більшості генів властива **неповна зчепність**. Це пояснюється тим, що алельні гени гомологічної пари хромосом можуть обмінюватися місцями, тобто гени батьківської хромосоми можуть переміщуватись у материнську і навпаки. *Реципрокний обмін генетичним матеріалом між двома гомологічними хромосомами називають генетичною рекомбінацією*. Процес обміну генами або гомологічними ділянками гомологічних хромосом називають ще **кросинговером** або перехрестям хромосом (від англ. *crossingover* — перехрестя).

Регулярність обмінів генами між гомологічними хромосомами була доведена дослідженнями Т. Моргана і його школи.

За неповного зчеплення схрещування гетерозиготних особин генотипу $\frac{AB}{ab}$ з гомозиготним рецесивом $\frac{ab}{ab}$ приводить до появи не двох, як при повному зчепленні, а чотирьох класів фенотипів і генотипів: $\frac{AB}{ab}$, $\frac{ab}{ab}$, $\frac{Ab}{ab}$, $\frac{aB}{ab}$.

Отже, кількість класів і їх фенотипові особливості в цьому випадку нагадують розщеплення, яке буває за аналізуючого схрещування дигібриду при незалежному комбінуванні генів. Проте кількісні співвідношення особин різних класів за неповного зчеплення не відповідають співвідношенню 1:1:1:1. Це пояснюється тим, що рекомбінантні гамети типу Ab і aB у дигетерозиготної самки утворюються в меншій кількості, ніж батьківські гамети типу AB і ab , яких завжди більше 50%.

За схрещування дигетерозигот $\frac{AB}{ab} \times \frac{AB}{ab}$ при умові неповного зчеплення генів виявляється не три класи фенотипів, як це буває за повного зчеплення, а чотири: $(AB + Ab + aB + ab)$. Однак, в протилежність незалежному менделівському успадкуванню, ці класи ніколи не виявляють співвідношення 9:3:3:1 (табл. 8.1).

Утворення нових класів зигот в F_2 за зчеплення генів вказує на те, що у дигібриду $\frac{AB}{ab}$ утворюються не тільки гамети AB і ab , але

Таблиця 8.1

Співвідношення класів гамет та розщеплення ознак у нащадків дигібридів за незалежного та зчепного успадкування

Тип успадкування генів	Генотипи дигетерозигот	Гамети дигетерозиготи і їх співвідношення	Фенотипи F_2 і їх співвідношення	Фенотипи F_4 і їх співвідношення
Незалежне комбінування	$\frac{A B}{a b}$	$AB, Ab, aB, ab;$ 1:1:1:1	$AB, Ab, aB, ab;$ 9:3:3:1	$AB, Ab, aB, ab;$ 1:1:1:1
Повне зчеплення	$\frac{AB}{ab}$	$AB, ab;$ 1:1	$AB, ab;$ 3:1	$AB, ab;$ 1:1
Неповне зчеплення	$\frac{AB}{ab}$	$AB, Ab, aB, ab;$ $\neq 1:1:1:1$	$AB, Ab, aB, ab;$ $\neq 9:3:3:1$	$AB, Ab, aB, ab;$ $\neq 1:1:1:1$

Співвідношення класів гамет за неповного зчеплення:

Батьківські форми: $AB + ab > 50\%$
 Рекомбінантні: $Ab + aB < 50\%$
 $AB = ab$
 $Ab = aB$

також Ab і aB , тобто рекомбінантні гамети. Зрозуміло, що останні могли утворитися лише одним способом — шляхом кросинговеру гомологічних хромосом і реципрокного обміну ділянками ДНК між ними (рис. 8.1). Кросинговер забезпечує виникнення нових комбінацій генів, тобто збільшує комбінаційну мінливість усіх без винятку організмів, що дуже важливо для еволюції.

Перехрестя хромосом, як правило, здійснюється в профазі I мейозу. Тому його називають мейотичним кросинговером. Іноді перехрестя трапляється під час мітозу в соматичних клітинах, — це так званий мітотичний або соматичний кросинговер.

Мейотичне перехрестя здійснюється після утворення бівалентів у зиготенну стадію профазі I, коли кожна хромосома представлена двома сестринськими хроматидами. Перехрестя і реципрокний обмін генетичним матеріалом фактично здійснюється не хромосомами, а хроматидами. В обмін можуть втягуватись як сестринські, так і несестринські хроматида. Цілком зрозуміло, що вклад у збільшення комбінаційної мінливості організмів вносять обміни між несестринськими хроматидами; кросовери (кросинговери) між сестринськими хроматидами не вносять ніяких змін у генетичну структуру останніх і тому не проявляються у фенотипі.

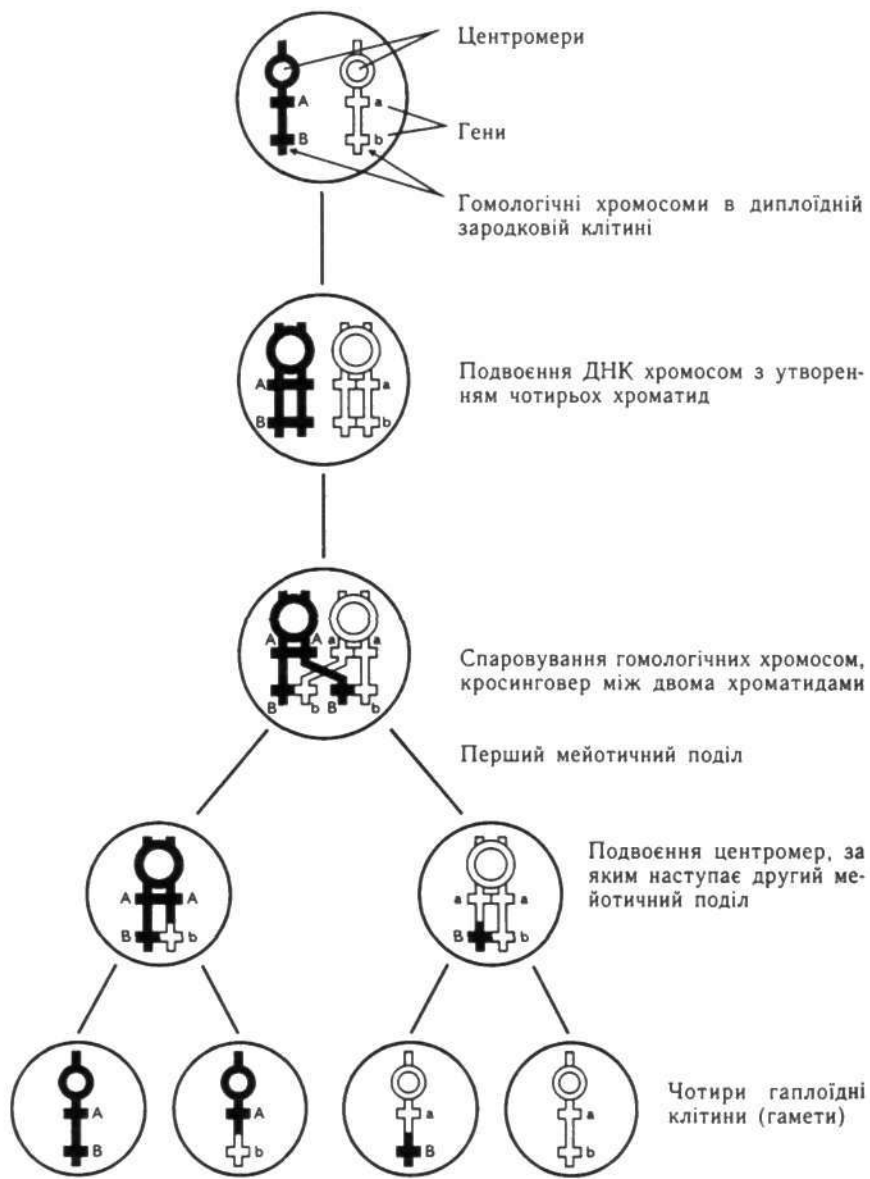


Рис. 8.1. Кросингвер між несестринськими хроматидами в процесі мейозу та типи виникаючих гамет

Хроматиди і хромосоми, які утворюються в процесі кросинговеру внаслідок реципрокних обмінів генетичним матеріалом, називаються **кросоверними** або **рекомбінантними**. Так само називають гамети, а також зиготи і організми, що виникають у поколінні аналізуючого схрещування за поєднання кросоверних гамет з гаметами аналізатора.

В кросинговер можуть втягуватись дві, три або й усі чотири хроматиди. Отже, бувають **дво-, три- і чотирохроматидні обміни** генетичним матеріалом. Одна і та ж хроматида може приймати участь в **одиначних, подвійних і множинних обмінах**. Ці реципрокні обміни бувають **рівними і нерівними**. В останньому випадку хроматиди обмінюються нерівними за розмірами фрагментами. Найчастіше це трапляється тоді, коли в кросинговер втягуються хромосоми з повторами певних послідовностей у ДНК.

8.2. Цитологічні докази кросинговеру

Перші цитологічні докази кросинговеру були представлені в 1909 р. Ф. Янсеном, який описав χ - (хі)-подібні структури, що виникають між двома гомологічними хромосомами в профазі мейозу. Ці структури були названі **хіазмами**, а саме явище утворення хіазм — **хіазмотипією**. Ф. Янсен висловив припущення, що хіазми певним чином пов'язані з фактом обміну ділянками між гомологічними хромосомами. В подальшому було показано, що утворення хіазм є не передумовою, а наслідком міжхромосомних обмінів генами.

8.2.1. Тетрадний аналіз як метод дослідження кросинговеру

Прямі докази відповідності рекомбінантних зигот кросоверним гаметам можна отримати, якщо визначати наслідки кросинговеру безпосередньо на гаплоїдних продуктах мейозу. Безумовно, для цього гамети або спори мусять бути марковані генами, які проявляються в гаплофазі.

Об'єктом, дуже зручним для такої роботи, виявився пліснявий хлібний грибок (*Neurospora crassa*). У цього грибка диплофаза представлена лише зиготою, яка дуже швидко після свого утворення вступає у мейотичний поділ. Продукти мейозу — спори — із-за особливостей розташування мейотичного веретена відносно

осі аска (сумки) розташовуються в аску лінійно (рис. 8.2). В мейозі у *N. crassa* проходять два звичайних мейотичних поділи і ще один мітотичний поділ. За першого мейотичного поділу на стадії пахіте-



Рис. 8.2. Розташування спор в асках нейроспори як результат кросинговеру на стадії чотирьох хроматид

ни здійснюється рекомбінація генів, а в мітозі кожна із чотирьох спор подвоюється. Тому в кожній сумці в лінійному порядку розташовується вісім спор. Якщо спори генетично неоднакові і відрізняються за фенотипом (наприклад, швидкістю дозрівання або ступенем пігментованості), то це дає змогу визначити наслідки розщеплення і кросинговеру на рівні продуктів мейозу. Як уже зазначалося, подібний аналіз, що проводиться на гаметах або спорах, називається **тетрадним аналізом**.

За допомогою тетрадного аналізу на нейроспорі або іншому грибку — *Sordaria fimicola* — можна не тільки підтвердити факт наявності кросинговеру у грибків, але й переконатись у тому, що кросинговер здійснюється на стадії не двох, а чотирьох хроматид. На рис. 8.3 показано можливе розташування темних (пігментованих) і сірих (слабопігментованих) спор у гетерозиготи *Aa*,



Рис. 8.3. Теоретично можливе розщеплення у нейроспори за умови кросинговеру:

I — на стадії двох хроматид; II — на стадії чотирьох хроматид. *A*, *a* — алельні гени

у якої алелі A і a визначають різне забарвлення аскоспор. Представлено теоретично можливе розташування темних і сірих спор у аску за кросинговеру на стадії двох і чотирьох хроматид.

Слід зазначити (рис. 8.4), що у відсутність кросинговеру розщеплення алельних генів здійснюється за першого мейотичного поділу (хромосомне розщеплення), а у випадку кросинговеру — за другого (хроматидне розщеплення).

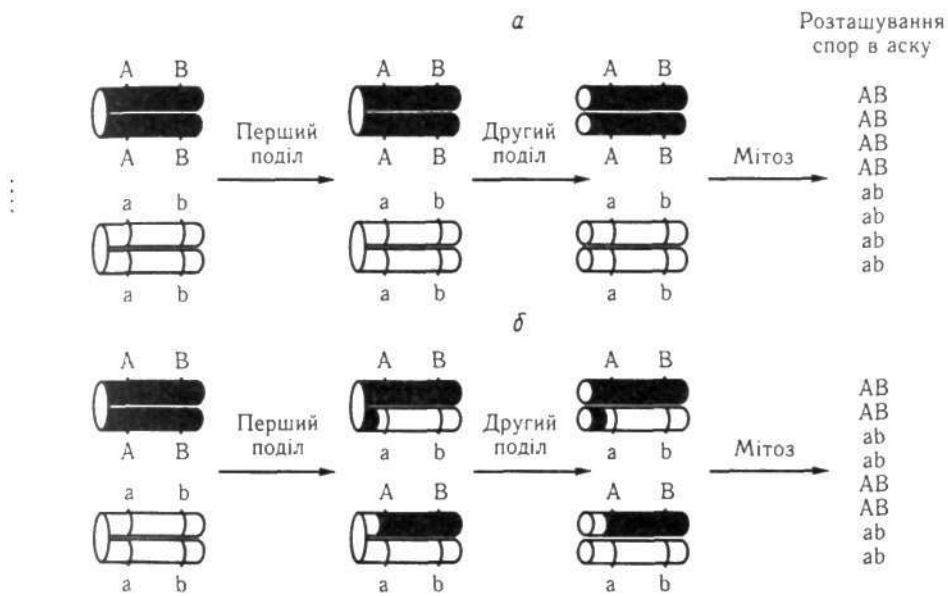


Рис. 8.4. Розходження алелей за першого і другого мейотичного поділу і розташування аскоспор у нейроспори:

a — відсутність кросинговеру (AB і ab розщеплюються за першого поділу); *b* — кросинговер між локусом A і центромерою (AB і ab розщеплюються за другого поділу)

Чітко впорядковане розташування спор в асках дає можливість виявити кросовери, що проходять як між центромерою і певним геном, так і між окремими мутантними генами. Якщо між двома генами здійснюється лише один кросовер, то половина спор в аску відноситься до батьківських типів, а половина — до рекомбінантних, причому на протилежних кінцях аску виявляються спори з батьківськими генотипами, а всередині — з рекомбінантними (рис. 8.5). Однак можливі не тільки одиночні, але й подвійні і навіть множинні кросинговери, тому розташування спор з батьківськими і рекомбінантними генотипами в асках нейроспори може бути різ-

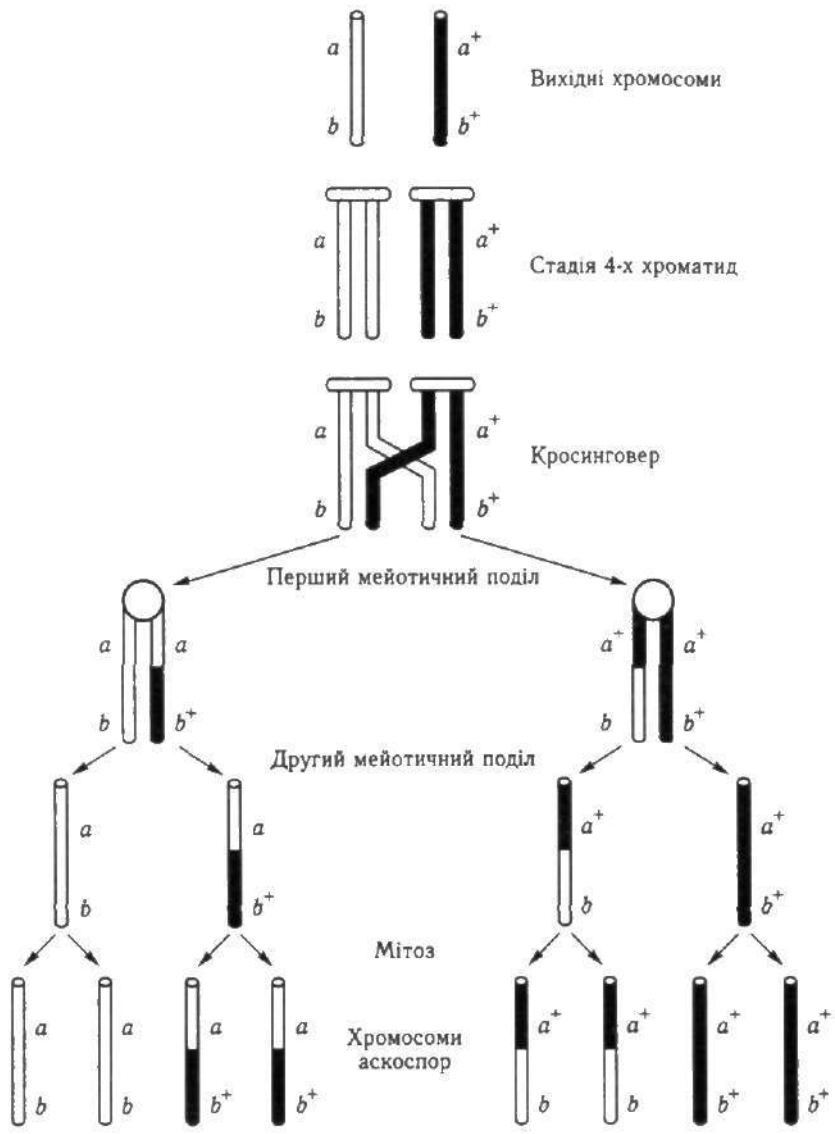


Рис. 8.5. Схема утворення хромосом аскоспор у нейроспори.

Показано результат одиночного кросинговеру між генами a і b , поведінка однієї пари хромосом за першого та другого поділу мейозу і мітотичний поділ кожного з чотирьох продуктів мейозу. a^+ , b^+ — доміантні алелі, a , b — рецесивні.

ним. Інколи співвідношення рекомбінантних і нерекомбінантних спор у аску не дорівнює 1:1. Це свідчить про те, що одночасно з рекомбінацією в мейозі здійснюється й інший процес — конверсія генів, з яким ми ще познайомимось.

8.2.2. Інші цитологічні докази кросинговеру

Безпосередні докази того, що в основі рекомбінації лежить реципрокний фізичний обмін ділянками між двома розірваними хроматидами, вперше були отримані в 1931 р. Х. Крейтоном і Б. Мак-Клінток у дослідженнях на кукурудзі і К. Штерном на дрозофілі.

У кукурудзи генетично і цитологічно досліджували нащадків рослин, у яких дев'ята пара хромосом була гетероморфною: одна хромосома була подовжена на одному кінці і мала гетерохроматинове потовщення на іншому. Друга хромосома цієї пари була нормальною. Окрім морфологічних відмінностей, зазначені хромосоми відрізнялися двома генетичними маркерами. Одна з хромосом мстила алель безбарвності зерен (c) і алель їх крохмальності (wx^+). Гомолог цієї хромосоми був маркований диким алелем c^+ (забарвлені зерна) і рецесивним wx (віскоподібний ендосперм). Схрещування цих гетерозиготних рослин з подвійними рецесивами, які мали нормальну дев'яту пару хромосом, показало, що рекомбінація досліджуваних зчеплених генів здійснюється шляхом обміну морфологічно відмінними фрагментами гомологічних хромосом, тобто завдяки кросинговеру (рис. 8.6). Як видно з рисунка, ознака c^+ (забарвлений ендосперм) належить тим нащадкам аналізуючого схрещування, у яких цитологічно визначається наявність дев'ятої хромосоми з гетерохроматиновим вздуттям на одному із кінців. Рецесивна ознака wx (віскоподібний ендосперм) може бути спрогнозована цитологічно завдяки наявності в клітинах таких рослин дев'ятої хромосоми з подовженим кінцем.

Виникнення кросоверних гамет і кросоверних особин в F_2 супроводжується утворенням у мейозі хромосом з новим поєднанням як алельних генів, так і морфологічних маркерів, що є переконливим доказом кросинговеру.

Аналогічним способом реальність кросинговеру була доведена в досліді на самках дрозофіли, що мали гетероморфну пару X-хромосом (рис. 8.7). У цих самиць одна із X-хромосом була сильно вкорочена (її відірваний фрагмент пересаджували на одну із аутосом), а друга X-хромосома мала вигляд букви «Г» (замість звичайної паличкової), тому що на одному із своїх кінців несла доважку шматочка Y-хромосоми.

Підослідні самки, гетерозиготні з цих морфологічно відмінних хромосом, були також гетерозиготними з двох генів, локалізованих

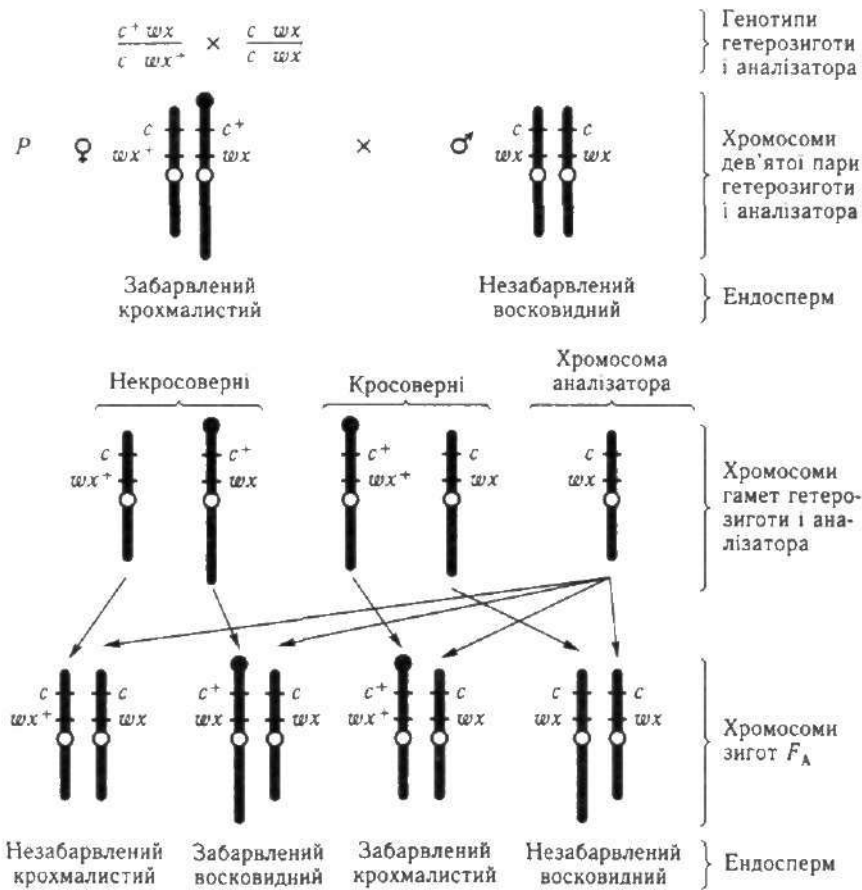


Рис 86 Цитологічний доказ кросинговеру у кукурудзи

в X-хромосомі: *Bar* (*B*) і *carnation* (*cr*). Перший з них — напівдомінантний мутантний ген, що спричиняє зменшення кількості фасеток ока і обумовлює у гетерозигот шілевидні (смугоподібні) очі. Рецесивний мутантний ген *cr* у гомозиготному стані (*cr cr*) обумовлює забарвлення очей дрозофіли типу червоної гвоздики; у гетерозигот (*cr+cr*) очі темно-червоні. Г-подібна хромосома несла алелі дикого типу B^+ і cr^+ , вкорочена хромосома — мутантні алелі *B* і *cr*.

Самок зазначеного генотипу схрещували з самцями, що мали нормальну X-хромосому з алельними генами B^+ і cr . Серед нащадків мухи було виявлено два некросоверних класи і два кросоверних (рис. 87). Цитологічне дослідження показало, що у кросоверних особин спостерігається обмін ділянками X-хромосом і відповідно змінюється їх форма, що легко простежується завдяки вище вказаним морфологічним маркерам.

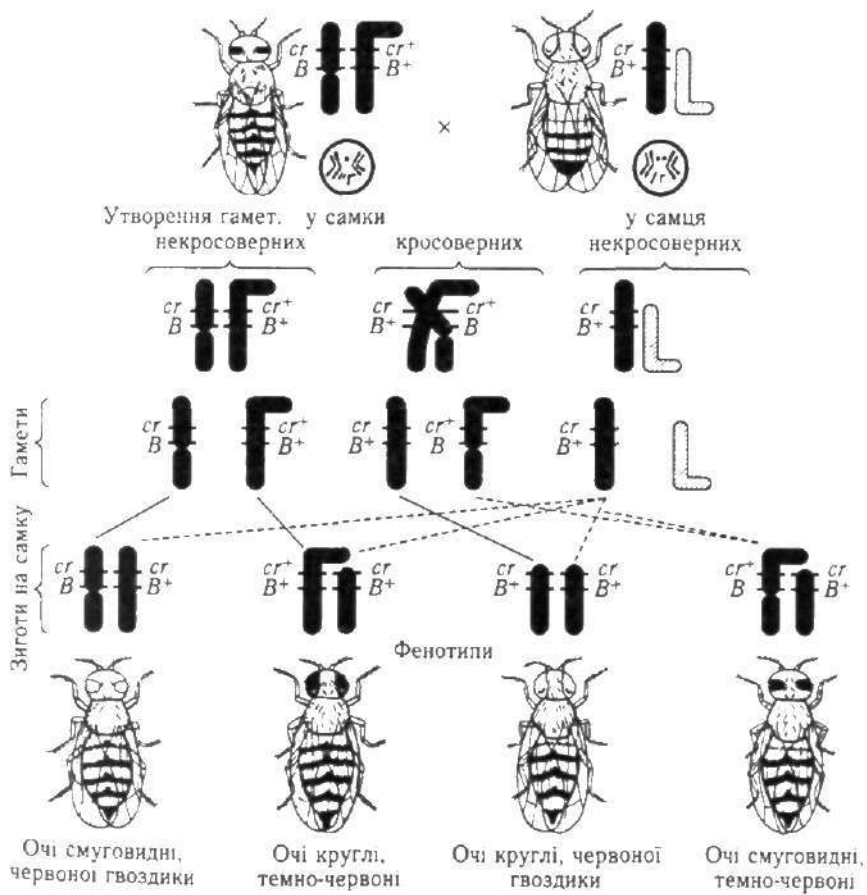


Рис. 87 Цитологічний доказ кросинговеру у дрозофіли

Зазначені досліді підтвердили гіпотезу Т. Моргана, згідно з якою кросинговер являє собою обмін фрагментами між гомологіч-

ними хромосомами. Одночасно це були прямі докази того, що гени дійсно локалізуються в хромосомах.

8.3. Генетичні докази кросинговеру

Т Морган і його співробітники в дослідах на *D. melanogaster* знайшли чимало прикладів зчепного успадкування і показали, що зчеплення генів, як правило, неповне. Один із цих прикладів — успадкування рецесивного гена *black* (*b*), який обумовлює чорне тіло, і *vistigial* (*vg*), який спричиняє недорозвиток крил. Домінантні алелі цих генів обумовлюють дикий фенотип мухи. b^+ — сіре тіло, vg^+ — нормальний розвиток крила.

За схрещування $bb\,vg\,vg \times b^+b^+\,vg^+\,vg^+$ в F_1 отримували дигетерозигот ($b^+b\,vg^+\,vg$), які мали дикий фенотип з обох ознак.

В аналізуючому схрещуванні дигетерозиготних самок з самцями-аналізаторами $b^+b\,vg^+\,vg \times bb\,vg\,vg$ отримали чотири фенотипових класи мух у таких співвідношеннях:

- 1) чорні з зародковими крилами (генотип $bb\,vg\,vg$) — 41,5%;
- 2) сірі з нормальними крилами ($b^+b\,vg^+\,vg$) — 41,5%;
- 3) сірі з зародковими крилами ($b^+b\,vg\,vg$) — 8,5%;
- 4) чорні з нормальними крилами ($bb\,vg^+\,vg$) — 8,5%.

Таким чином, переважна більшість нащадків (83%) успадкувала батьківські фенотипи і лише у 17% особин поєднувались ознаки дикого і мутантного фенотипів. Результати цього схрещування Т Морган пояснив тим, що гени *b* і *vg* знаходяться в одній хромосомі, тобто є зчепленими. Проте ця зчепленість неповна, бо в мейозі у дигетерозиготних самок F_1 можливий обмін гомологічними фрагментами гомологічних хромосом між локусами, в яких знаходяться гени *b* і *vg*. Внаслідок цього кросинговеру у самки-дигетерозиготи утворюється два класи рекомбінантних гамет з вірогідністю 8,5% кожний.

Цікаво, що в реципрокному аналізуючому схрещуванні $\text{♀ } bb\,vg\,vg \times \text{♂ } b^+b\,vg^+\,vg$ рекомбінантних нащадків не виникає, бо у самців дрозофіли кросинговер не відбувається, і гени, що належать одній хромосомі, виявляють **повне зчеплення**.

Спираючись на результати цього та інших дослідів на дрозофілі, а також на спостереження Ф Янсенса, який виявив у мейозі хіазми, Т Морган дав вірне пояснення фактам **повного і неповного зчеплення генів**, що стало переконливим доказом хромосомної теорії спадковості.

8.4. Величина кросинговеру і побудова генетичних карт

Досліджуючи зчепне успадкування, звернули увагу на те, що процент рекомбінантних нащадків (а, отже, і рекомбінантних гамет) в різних дослідах неоднаковий. Якщо в шойно наведеному досліді Т. Моргана кросоверні нащадки F_A склали 17%, то за схрещування рослин кукурудзи



виявляється лише 3,6% кросоверних особин. Отже, частота або величина кросинговеру коливається залежно від досліджуваних маркерних генів, об'єктів дослідження та інших причин.

Величина кросинговеру вимірюється відношенням кількості кросоверних (рекомбінантних) особин до загальної кількості нащадків аналізуючого схрещування, вираженим у відсотках.

Співробітник Т. Моргана А. Стертевант припустив, що частота кросинговеру між генами, локалізованими в одній хромосомі, пропорційна відстані між цими генами. Отже, показник частоти кросинговеру можна використати для визначення відстані між генами і їх взаємного розташування в хромосомі, тобто для побудови генетичних карт. Генетична відстань, на якій кросинговер здійснюється з частотою 1%, в честь Т. Моргана названа сантиметром (*cM*), який слугує одиницею виміру кросинговеру. **Генетична карта** — це схема відносного розташування генів, що знаходяться в одній групі зчеплення. Вона будується шляхом визначення частоти кросинговеру між двома маркерними генами у дигетерозигот (**двофакторний аналіз**), або, що краще, між трьома маркерними генами у тригетерозигот (**трифакторний аналіз**). *Величину кросинговеру в переважній більшості випадків з'ясовують методом аналізуючих схрещувань, хоч є і інші методи.*

Як приклад побудови генетичної карти розглянемо наслідки трифакторного схрещування, в якому батьківські форми дрозофіли відрізняються двома вже відомими нам генами (*b* та *vg*), а також третім маркерним геном *pr* (пурпурні очі). Всі ці три гени зчеплені, бо належать одній хромосомі.

Відповідних тригетерозиготних самок отримали схрещуванням батьківських форм — гомозиготних домінантів (дикий тип) та рецесивів (потрійних мутантів з чорним тілом, пурпурними очима та

зародковими крилами):

$$\text{♀ } \frac{b\ pr\ vg}{b\ pr\ vg} \times \text{♂ } \frac{b^-pr^-vg^-}{b^-pr^-vg^-} \rightarrow \frac{b\ pr\ vg}{b^-pr^-vg^-}$$

Отриманих гетерозиготних самок схрещували з самцем-аналізатором:

$$\text{♀ } \frac{b\ pr\ vg}{b^-pr^-vg^-} \times \text{♂ } \frac{b\ pr\ vg}{b\ pr\ vg}$$

і серед нащадків F_2 виявляли вісім фенотипових класів, серед яких два класи мали батьківські (нерекомбінантні) і шість класів — рекомбінантні фенотипи.

Результати цього аналізуючого схрещування наведено у табл. 8.2, в якій знаком «+» позначено домінуючі гени та дикі фенотипи нащадків.

Таблиця 8.2

Результати аналізуючого схрещування тригетерозиготи $b\ pr\ vg/+++$ у *D. melanogaster*

Наявність кросинговеру і його суть	Класи F_2	Гамети самки та фенотипи нащадків F_2	Відсоток особин від загальної кількості нащадків
Відсутність кросинговеру (некросоверні класи)	1	$b\ pr\ vg$	81,5
	2	$+++$	
Одиночний кросинговер на ділянці $b-pr$	3	$+pr\ vg$	6,0
	4	$b++$	
Одиночний кросинговер на ділянці $pr-vg$	5	$bpr+$	12,0
	6	$++vg$	
Подвійний обмін (одночасно на ділянках $b-pr$ і $pr-vg$)	7	$+pr+$	0,5
	8	$b+vg$	

Як видно з таблиці, загальна кількість одиночних кросинговерів між генами b і pr складає 6%, а між генами pr і vg — 12%. Це загалом відповідає відстані між цими генами в хромосомі. Залишається визначити, в якому порядку ці гени розташовані в групі зчеплення. Відповісти на це запитання, а заодно й уточнити відстань між генами допомагає аналіз з урахуванням подвійних обмінів.

Слід зазначити, що парна кількість перехрещень між двома генами не призводить до їх переміщення з однієї гомологічної хромосоми в іншу. Тому відстань між цими генами, визначена за кількістю кросинговерів, що проявляються у фенотипі, завжди менша дійсної. Урахування частоти подвійних кросоверів за трифакторного аналізу дозволяє зменшити цю помилку.

З другого боку, слід врахувати, що теоретична частота подвійного кросинговеру дорівнює добутку вірогідностей (дробних чисел) двох одиночних обмінів, які відбуваються одночасно. Тому величина подвійного кросинговеру значно менша, ніж кожного з одиночних. Це дає можливість легко визначити, який з генів локалізується між двома іншими, бо лише він може бути втягнутим у подвійний обмін.

З наведеної таблиці видно, що найменша частота (0,5%) випадає на міжхромосомний обмін геном pr . Це означає, що саме він займає серединне положення серед досліджуваних трьох генів. З урахуванням цієї обставини, а також вже відомих відстаней між генами b і pr (6%) і генами pr і vg (12%) можна збудувати генетичну карту (рис. 8.8):



Рис. 8.8 Генетична карта

Відстань між крайніми генами (b і vg) дорівнює сумі відстаней між генами b і pr та pr і vg , тобто $6\% + 12\% = 18\%$.

Згадаємо, що відстань між генами b і vg , визначена з допомогою двофакторного аналізу, складала лише 17%. Отже, чим більше генів досліджується, тим точніші результати картування, бо більша кількість кросоверів враховується. В тих випадках, коли визначена частота фенотипів, що відповідають подвійним кросоверам (AbC і aBc), до відстані між генами A і C , визначеної за величиною одиночних кросоверів, необхідно додати частоту подвійних кросоверів, помножену на два. В нашому прикладі (табл. 8.2) уточнена відстань між генами b і vg складатиме $6\% + 12\% + (0,5\% \times 2) = 19\%$. Кількість подвійних кросоверів подвоюється тому, що вони є наслідком двох одночасних одиночних кросинговерів.

Найбільш точні дані про відстань між генами отримують у тому випадку, коли частота кросинговеру не перевищує 10%. Якщо ж вона досягає 50%, то це свідчить про незалежне комбінування генів. В узагальненому вигляді залежність частоти кросинговеру від реальної відстані з урахуванням множинних обмінів виражається функцією Дж. Холдейна:

$$rf(d) = \frac{1}{2}(1 - e^{-2d}),$$

де rf — картуюча функція (частота кросоверів, що враховуються), d — реальна відстань, на якій здійснюються обміни, e — основа натурального логарифму.

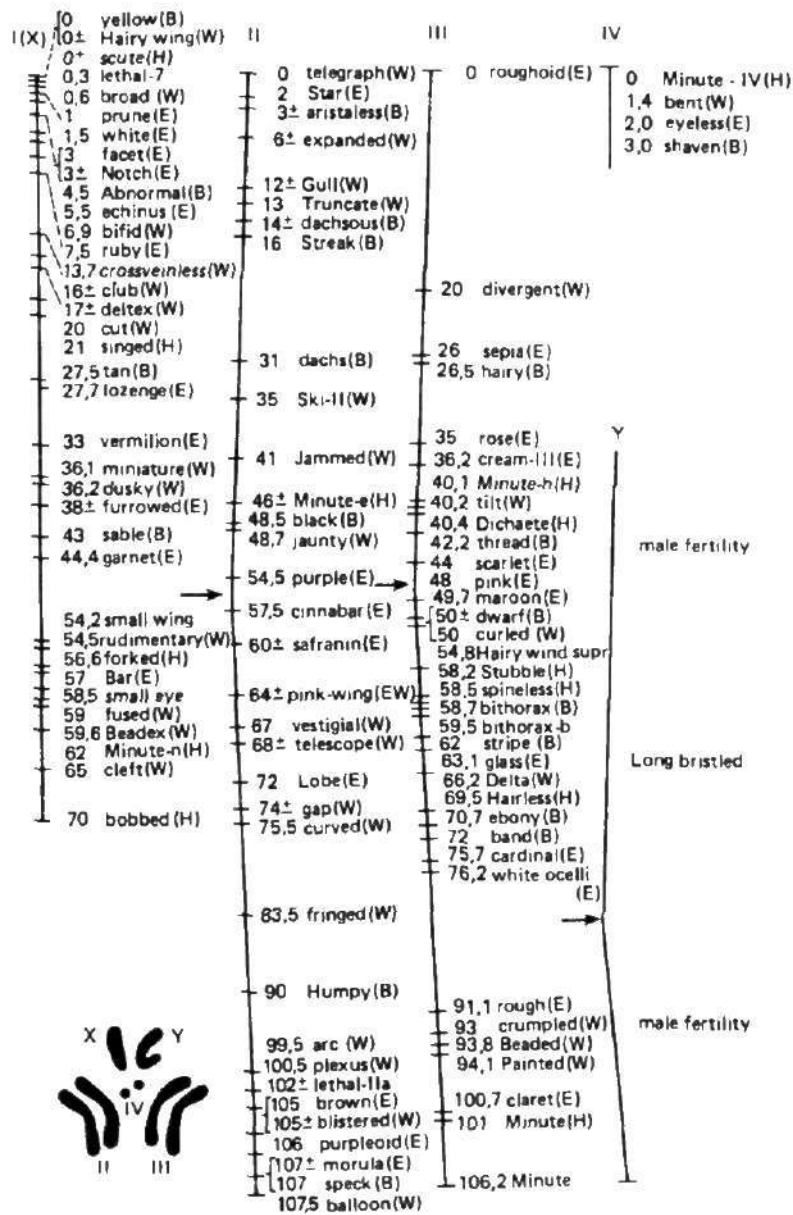


Рис 8.9 Карты груп зчеплення *D. melanogaster*

Фунція Дж. Холдейна показує, що із збільшенням відстані між генами величина кросинговеру наближається до 0,5. Це означає, що обміни між такими просторово віддаленими в хромосомі генами здійснюються з такою ж частотою, як і між генами різних хромосом. Ці гени, хоч і фізично зчеплені, успадковуються незалежно. Встановлено, що деякі гени, успадковування яких досліджував Г. Мендель, є зчепленими, але вони розташовані в хромосомах на великій відстані один від одного, що й не завадило відкриттю основних законів успадковування хромосомних генів.

Для картування мутації, що заново виникає в певній групі зчеплення, необхідно мати набір маркерних мутацій кожної хромосоми досліджуваного об'єкту. Картування нової мутації ґрунтується на аналізі її зчеплення з відомими маркерами досліджуваних хромосом.

Відстань між далеко розміщеними генами визначають не шляхом розрахунку кількості кросоверних гамет у дигетерозиготи на підставі наслідків аналізуючого схрещування, а шляхом додавання відстаней між багатьма близько розташованими генами. Тому дуже часто відстань між окремими взаємно віддаленими генами може перевищувати теоретично максимальну відстань 50 сМ. Так, у дрозофіли генетична відстань між генами, що знаходяться на різних кінцях другої хромосоми, становить 107,5 сМ (рис. 8.9).

8.5. Інтерференція і коінциденція

Експериментальне визначення відстаней між генами показало, що частота подвійних кросинговерів у досліді завжди менша, ніж теоретично розрахована. Остання, як уже зазначалося, дорівнює добутку частот одиночних кросинговерів між відповідними генами. Пригнічення кросинговеру в ділянках хромосом, що безпосередньо прилягають до точки обміну, який вже відбувся, називають **інтерференцією**. Останню можна виражати кількісно. Для цього співставляють частоту подвійних кросоверів, що реально спостерігаються, з математично розрахованою їх частотою на підставі припущення, що обміни в сусідніх ділянках хромосом здійснюються незалежно один від одного. Цей показник називається **коефіцієнтом коінциденції** (C), тобто збіжності. В нашому прикладі частота одиночних обмінів між генами b і pr складає 6,5%, а між генами pr і vg — 12,5%. Теоретична величина подвійного кросинговеру дорівнює $0,125 \times 0,065 \approx 0,008$, а експериментально знайдена — 0,005. Коефіцієнт коінциденції $C = 0,005/0,008 = 0,62$.

Величина інтерференції (I) визначається за формулою $I = 1 - C$. Якщо $C < 1$, тоді I має значення із знаком «+», і така інтерференція називається позитивною. В цьому випадку кожний одиночний обмін

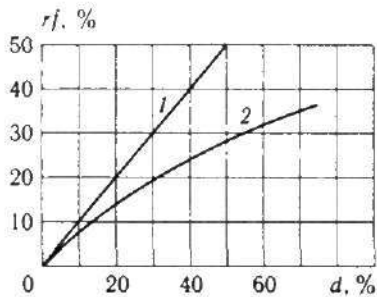


Рис. 8.10 Картуючі функції

1 — лінія, що визначається функцією А. Стертеванта ($rf = d$), 2 — крива, що визначається функцією Дж. Холдейна

гальмує кросинговер на сусідній ділянці хромосоми. На відстані, більшій за 35 сМ, інтерференція зникає. Все це і призводить до того, що залежність між частотою кросинговеру і відстанню між генами описується функцією Дж. Холдейна, а не є прямопропорційною, як вважав у свій час А. Стертевант (рис. 8.10).

В деяких випадках $C > 1$. В цьому випадку інтерференція негативна, тобто один обмін ніби стимулює сусідні обміни. В дійсності існує лише позитивна інтерференція, що ж до негативної, то як з'ясувалося, вона не має безпосереднього відношення до явища кросинговеру, а

є зовнішнім проявом іншого генетичного процесу — так званої **коконверсії** генів, яка часто супроводжує генетичну рекомбінацію (розділ 12.1.3).

8.6. Розрахунок частоти кросинговеру по розщепленню в F_2

В тих випадках, коли аналізуюче схрещування із-за відсутності аналізатора неможливе, величину кросинговеру можна визначити по співвідношенню кросоверних і некросоверних класів серед нащадків F_2 . При цьому виходять із того, що гомозиготи $aabb$ — це результат злиття двох батьківських гамет ab за запліднення ($ab \times ab$). Тому частоту гамет з комбінацією батьківських рецесивних генів у дигетерозиготи можна розрахувати за формулою

$$C_{ab} = \sqrt{\text{Доля особин з фенотипом } ab \text{ в } F_2}$$

Якщо, наприклад, доля особин з фенотипом ab в F_2 складає 16% всіх нащадків дигетерозиготи, тобто 0,16, то концентрація гамет ab в F_1 дорівнює $C_{ab} = \sqrt{0,16} = 0,4$ або 40%. Оскільки класи гамет

з батьківськими генотипами утворюються в рівних долях, то гамети AB теж складають 40% або 0,4 від загальної кількості гамет. На долю кросоверних гамет ($Ab + aB$) приходиться $100\% - 80\% = 20\%$ або 0,2.

Наведемо конкретний приклад. Хай гетерозиготи $\frac{AB}{ab}$ в F_2 дали 4 фенотипових класи нащадків у таких співвідношеннях: $AB - 0,650$; $Ab - 0,075$; $aB - 0,075$; $ab - 0,200$ (останніх за неповного зчеплення завжди менше 25%).

Виходячи з вищенаведених міркувань, знаходимо, що доля гамет ab складає $C_{ab} = \sqrt{0,20} = 0,44$. Отже, сума батьківських (нерекомбінантних) гамет AB і ab складає $C_{AB} + C_{ab} = 0,44 + 0,44 = 0,88$, а доля рекомбінантних ($Ab + aB$) — 0,12 або 12%. Таким чином, відстань між локусами A і B дорівнює 12% або 12 сМ.

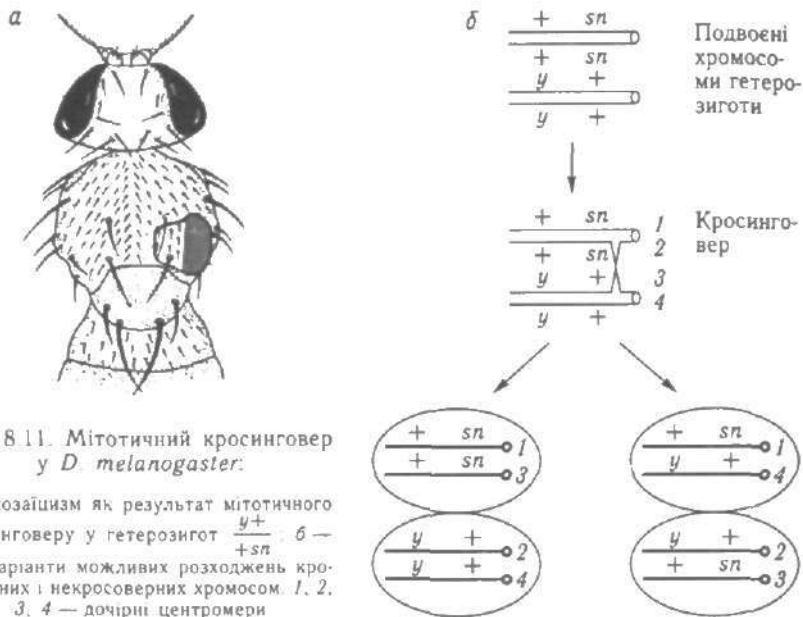
8.7. Мітотичний кросинговер і картування генів

Кросинговер здійснюється не тільки у мейозі, але й у мітозі. **Мітотичний кросинговер** іноді називають ще **соматичним**, бо він здійснюється в основному в соматичних клітинах. Щоправда, цей процес може відбутися і в клітинах генеративних тканин на стадії їх розмноження, тобто мітотичних поділів. Такий кросинговер називають **гоніальним**. Частота мітотичного кросинговеру в 10 000 разів менша, ніж мейотичного.

Фенотиповим проявом соматичного кросинговеру у гетерозиготи є **мозаїцизм** — поява клонів гомозиготних клітин з досліджуваних алельних генів. У цьому випадку два клони клітин, відмінних за фенотипом, розміщуються поруч, що і призводить до мозаїцизму — плямистості забарвлення тіла, очей і т. п. У випадку гоніального кросинговеру явища мозаїцизму не спостерігається.

Докази мітотичного кросинговеру були отримані на дрозофілі за спостереження мозаїчних плям у гетерозиготних мух з генотипом $y\ sn^-/y^+sn$. Обидва гени належать X-хромосомі. Рецесивний ген *yellow* (y) обумовлює жовте забарвлення тіла і щетинок мух; за наявності його домінантного алеля (y^+) тіло мухи сіре, а щетинки чорні. Другий рецесивний ген — *singed* (sn) — викликає деформацію щетинок і волосків, що покривають тіло мухи, — вони стають скрученими, наче опаленими. Дикий ген sn^- визначає розвиток прямих щетинок і волосків. Самка, гетерозиготна з обох цих генів, має

нормальне сіре тіло і прямі щетинки, тобто дикий фенотип. Однак ноді на тілі таких самиць виникають «близнюкові» мозаїчні плями — ділянки тіла жовтого кольору з прямими щетинками, які знаходяться поруч з плямами сірого кольору і скрученими («опаленими») щетинками. Подібні вияви мозаїцизму можливі лише за кросинговеру між локусом *sn* і центромерою на стадії чотирьох хроматид за умови, що в анафазі мітозу обидві дочірні хромосоми y^+sn попадуть в одну дочірню клітину, а обидві хромосоми $y sn^+$ — з іншу (рис. 8.11).



Використання мітотичного кросинговеру для побудови генетичних карт базується на тому, що чим далі досліджуваний ген знаходиться від центромери, тим більша вірогідність його переходу в гомозиготний стан за рахунок мітотичного кросинговеру.

Незважаючи на низьку частоту мітотичного кросинговеру, іноді дані про нього є дуже корисними для генетичного аналізу, особливо у випадку об'єктів, для яких статеве розмноження є нехарактерним і неосновним (гриби *Aspergillus*, *Penicillium* та інші). З метою генетичного картування мітотичний кросинговер найчастіше використовують у дослідях на грибах — сумчатих, базидіальних та ін. Надійність цього методу показана шляхом порівняння карт хромо-

сом, побудованих паралельно за результатами дослідження частоти мейотичного (класичний метод) і митотичного кросинговеру. Це порівняння вдалося провести на одному із видів грибка аспергіла, який може розмножуватись як статевим, так і безстатевим способом. З'ясувалося, що генетичні карти, побудовані за частотами мейотичного і митотичного кросинговерів, повністю співпадають.

У деяких грибів (аспергіли) є ще так званий **парасексуальний цикл**, який також забезпечує рекомбінацію спадкових факторів. Як правило, гіфи міцелія багатоядерні, більшість ядер знаходиться у гаплоїдному стані. За сумісного вирощування двох різних мутантних міцеліїв між їх гіфами виникають цитоплазматичні анастомози, через які проходить обмін ядрами. Виникає **гетерокаріон**, тобто міцелій з гаплоїдними ядрами різних генотипів (рис. 8.12). Інколи

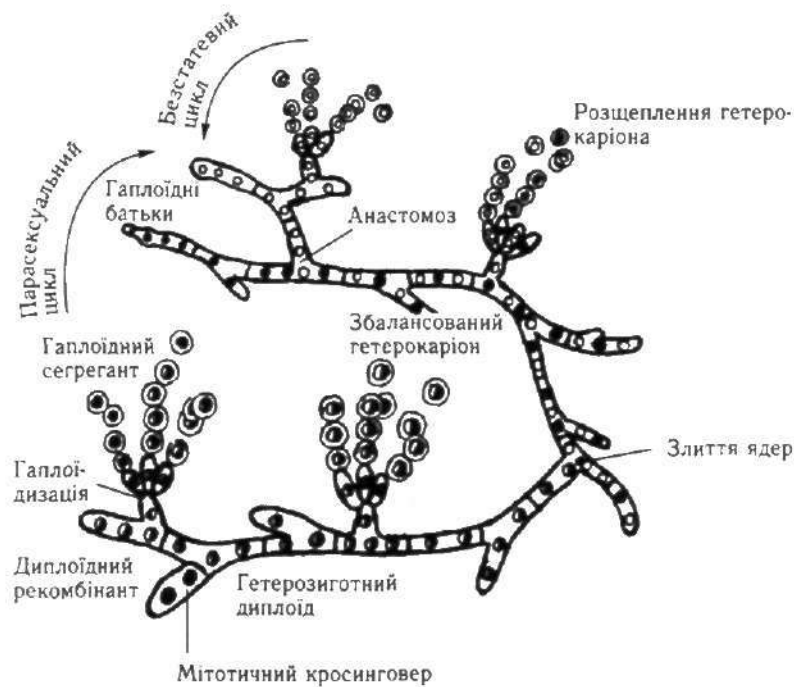


Рис. 8.12. Життєвий цикл грибів пенцилів

за вегетативного росту гетерокаріона здійснюється вище згаданий **парасексуальний цикл**, тобто злиття двох гаплоїдних ядер з утворенням диплоїдних ділянок міцелію (диплоїдизація). За подальших

поділів цих диплоїдних ядер незалежно один від одного може здійснюватися два процеси:

- 1) дуже нечастий **мітотичний кросинговер**;
- 2) випадкова, не пов'язана з мейозом, **гаплоїдизація ядер**.

Обидва процеси призводять до розщеплення ознак у нащадків гетерозиготного диплоїда і утворення певної долі гомозиготних рецесивів.

Основні принципи картування генів на підставі парасексуального циклу запропонував у 1954 р. Г. Понтекорво, і з того часу цей метод успішно використовується в генетичному аналізі видів, у яких парасексуальний процес є чи не єдиним шляхом обміну генетичною інформацією. З допомогою цього методу у грибка *Asp. niger*, який не має статевого циклу розмноження, було виявлено шість груп зчеплення і картовано декілька десятків генів.

Слід пам'ятати, що кросинговер на ділянці ген-центромера призводить до гомозиготизації всіх генів, розташованих дистальніше точки обміну. Гени, найбільш віддалені від центромери, переходять у гомозиготний стан частіше, ніж інші гени того ж плеча хромосоми. Тому відстань від центромери максимально гомозиготизованого маркера приймають за 100%, а розташування інших генів визначають за формулою, виходячи із чисельності відповідних гомозиготних сегрегантів.

8.8. Деякі загальні дані про генетичну рекомбінацію

*Генетичною рекомбінацією називається процес, за якого різні молекули ДНК обмінюються фрагментами, або ж чужий генетичний матеріал реципрокно залучається до складу певної молекули ДНК. Обмін фрагментами між хроматидами гомологічних хромосом закономірно здійснюється в мейозі (**мейотичний кросинговер**), значно рідше — в мітозі (**мітотичний кросинговер**). При цьому відбувається реципрокний (взаємний) обмін генетичним матеріалом; цей обмін може бути рівнозначним, коли хроматиди обмінюються однаковими за розміром гомологічними фрагментами, і нерівнозначним (фрагменти, що втягнуті в обмін, іноді можуть мати різні розміри). Відповідно до цього розрізняють **рівний** і **нерівний кросинговер**. Внаслідок нерівного кросинговеру локус гена в одній із гомологічних хромосом може подвоїтися (**дуплікація**) або навіть помножитися (**мультиплікація**), в той час як у проти-*

лежній хромосомі виникає його нестача. За рівного кросинговеру розриви в хроматидах гомологічних хромосом здійснюються в ідентичних, тотожних місцях; за нерівного кросинговеру ця закономірність порушується.

Однак у будь-якому з цих випадків рекомбінація здійснюється за умови повної або досить значної гомології ділянок двох різних молекул ДНК і може відбуватися в численних місцях уздовж гомологічних хроматид. Тому мейотичну (і мітотичну) рекомбінацію називають **гомологічною, загальною або генералізованою** рекомбінацією. Загальна гомологічна рекомбінація є закономірним процесом для еукаріотів, а також для вірусів і бактерій (розділ 12).

Рекомбінаційному процесові між гомологічними ДНК властива висока точність, обумовлена спаровуванням комплементарних основ та участю в рекомбінації специфічних білків — продуктів генів *recA*, *recB*, *recC* та ін.

Слід зазначити, що гомологія молекул ДНК не є обов'язковою умовою рекомбінаційного процесу. Щоправда, рекомбінація між молекулами ДНК з низьким рівнем гомології або навіть з повною її відсутністю здійснюється за допомогою зовсім інших механізмів. Мова йде про так звану сайтспецифічну та її різновид — незаконну рекомбінацію.

За **сайтспецифічної рекомбінації** чужий генетичний матеріал може бути вбудований в дану молекулу ДНК лише в певному конкретному місці (сайті). Саме за таким механізмом здійснюється інтеграція геномів деяких фагів (наприклад, фага λ) у хромосому бактерії. В цьому випадку в рекомбінаційний процес втягуються специфічні послідовності фагової і бактеріальної ДНК. В межах цих послідовностей є дуже коротка ділянка гомології, необхідна для рекомбінації за участю спеціалізованих білків. У випадку помірних бактеріофагів типу λ сайтспецифічну рекомбінацію направляють білки фагових генів *int* і *xis* та деякі бактеріальні білки.

Незаконна рекомбінація, що здійснюється за повної або майже повної відсутності гомології у двох взаємодіючих молекул ДНК, лежить в основі переміщення в геномі так званих **мобільних генетичних елементів (МГЕ)**, що розглядаються у розділі 11.6.3.

Розрізняють також рекомбінаційні процеси, що пов'язані або не пов'язані з реплікацією (подвоєнням) ДНК. Так, наприклад, інтеграція профага λ — це консервативний процес, який не вимагає подвоєння молекул ДНК. В той же час переміщення (**транспозиція**) МГЕ в більшості випадків супроводжується подвоєнням ДНК мігруючих елементів. Відповідно рекомбінацію поділяють на **консервативну та реплікаційну**.

8.9. Регуляція кросинговеру

На кросинговер впливають численні генетичні та негенетичні чинники.

Відомі гени, що контролюють частоту кросинговеру як безпосередньо, так і через фізіологічний стан клітин. У абсолютної більшості вищих еукаріотів частота кросинговеру у особин різної статі приблизно однакова. Однак у деяких видів статева належність особин істотно впливає на кросинговер. Так, наприклад, у самців дрозофіли і самок шовкопряда (гетерогаметна стать) мейотичний кросинговер відсутній, а у представників протилежної (гомогаметної) статі він відбувається нормально. Щодо мітотичного кросинговеру, то він здійснюється з однаковою частотою як у самців, так і у самок.

Є докази того, що частота кросинговеру залежить від розподілу в хромосомі гетерохроматину та еухроматину. В певній мірі цим пояснюється той факт, що вздовж хромосоми частота кросинговерів дуже змінюється. В місцях розташування конституційного гетерохроматину (в прицентромernih і теломерних ділянках хромосом) частота кросинговеру мінімальна.

Крім спеціальних генів, що виконують роль «замикачів» кросинговеру, на частоту цього процесу істотно впливають структурні перебудови хромосом, особливо інверсії, які можуть повністю «замикати» кросинговер (розділ 11.6.3). Відомі мутації, що можуть як зменшувати, так і збільшувати частоту рекомбінацій в певних ділянках хромосом дрозофіли, кукурудзи та інших об'єктів. Залежність кросинговеру від особливостей генотипу підтверджується ефективністю добору ліній на високу і низьку частоту перехрестя між окремими генами. Генотип впливає на кросинговер і посередньо, через цитоплазму. В реципрокних схрещуваннях дрозофіли виявлено цитоплазматичний ефект на частоту генетичної рекомбінації.

Істотний вплив на процес кросинговеру виявляють функціональний стан організму та фактори зовнішнього середовища. Так, частота рекомбінацій у дрозофіли залежить від віку мух, хімічного складу корму, вологості, температурних умов і т. ін. Зміну частоти перехрестя хромосом під впливом факторів зовнішнього середовища називають **індукованим кросинговером**. Останній можна спровокувати різними типами опроміненнь — як ультрафіолетовим, так і іонізуючим. Рентгенівські, гама- і космічні промені, високоенергетичні альфа-, бета- та інші іонізуючі випромінювання підвищують частоту рекомбінацій, викликаючи одно- і двониткові розри-

ви в ДНК хромосом. Така ж дія на процес кросинговеру властива великій кількості хімічних агентів, здатних порушувати структуру ДНК або її реплікацію. Одночасно з підвищенням частоти кросинговеру зазначені чинники виявляють мутагенний ефект.

Отже, частота кросинговеру між двома генами може бути постійною лише за константних генотипових і екологічних умов. Оскільки така ідеальна ситуація недосяжна, то відстані між генами на генетичних картах, отриманих у різних дослідах, можуть істотно варіювати і майже ніколи не відповідають фізичним відстаням між цими генами. Про це свідчать наслідки порівняння генетичних і цитологічних карт хромосом.

8.10. Порівняння генетичних і цитологічних карт

Генетична карта хромосоми — це схема взаємного розташування зчеплених генів з позначенням відносних відстаней між цими генами. Побудова генетичних карт хромосом здійснюється різними методами залежно від об'єкту дослідження, мети останнього та інших конкретних умов. Для еукаріотних організмів найбільш розповсюдженим методом побудови генетичних карт є з'ясування частоти рекомбінації за дво- або трифакторних аналізуючих схрещувань. У випадку бактерій застосовують і інші методи, що основані на використанні явищ **кон'югації**, **трансформації** та **трансдукції** (розділ 12.3). Якщо є можливість, то картування здійснюють паралельно двома або більшою кількістю методів, результати яких співставляють.

Чіткі дані про відповідність кросинговерних карт дійсному розташуванню генів у хромосомі дає порівняння генетичних і цитологічних карт хромосом.

Перші **цитологічні карти** хромосом дрозофіли були збудовані Ф. Г. Добржанським. Метою такого картування є *визначення місць розташування окремих генів у фізичній хромосомі і вимір фізичних відстаней між цими генами.* Зручними об'єктами для подібних досліджень слугують політенні хромосоми, а також хромосоми типу лампових щіток. Перевага гігантських хромосом у тому, що їх значно легше вимірювати, ніж в багато разів менші метафазні хромосоми. Крім того, своєрідність топографії дисків у кожній ділянці політенної хромосоми дає можливість дуже точно локалізувати окремі **пуфи** — вздуття хромосоми в місцях розташування активно

функціонуючих генів. З цієї ж причини в політенній хромосомі можна точно визначити місця окремих розривів, делецій, дуплікацій, транслокацій та інших хромосомних перебудов, які використовуються як генетичні маркери за побудови цитологічних карт.

Наведемо конкретний приклад використання делецій (випадіння окремих ділянок хромосом) з метою побудови цитологічної карти.

Якщо гетерозигота типу $\frac{ABCDE}{abcde}$ буде послідовно втрачати ділянки певної хромосоми з домінантними генами, то у неї будуть виявлятися відповідні рецесивні ознаки в зв'язку з переходом рецесивних генів інтактної гомологічної хромосоми у гемізиготний стан. Послідовність прояву у гетерозиготи рецесивних ознак за делецій різного розміру вказує на порядок розташування генів у хромосомі.

Цитологічні карти хромосом можна будувати також з урахуванням транслокацій, за яких негомологічні хромосоми обмінюються фрагментами. У цьому випадку в обох хромосомах можна визначити точки злому і приєднання чужих фрагментів, наявність у фрагментах тих чи інших генів і їх лінійні розміри.

Сьогодні є можливість визначити локалізацію генів у фізичних хромосомах за допомогою **мічених зондів** — фрагментів молекул ДНК або РНК, комплементарних певній нуклеотидній послідовності досліджуваної хромосоми. Такі зонди специфічно взаємодіють з хромосомою в місці розташування відповідного гена, що дає можливість визначити його місце на цитологічній карті.

Порівняння кросинговерних і цитологічних карт хромосом свідчить, що відстані між окремими генами на генетичних картах загалом більш-менш відповідають фізичним відстаням між цими генами у хромосомі. Однак повної відповідності відстаней на кросинговерних і цитологічних картах немає. Це особливо помітно на ділянках хромосоми, що примикають до центромери: як правило, на кросинговерних картах гени в цих районах розташовуються значно щільніше, ніж на цитологічних. Причиною цього є те, що у більшості видів частота кросинговеру в прицентромерних районах хромосом значно менша, ніж у дистальних районах.

Таким чином, кросинговерні карти відображують не точні, а лише відносні відстані між генами в реальній хромосомі, що пояснюється неоднаковою частотою рекомбінацій на різних її ділянках, однак послідовність розташування генів на такій карті відповідає реальній дійсності.

Порівняння генетичних і цитологічних карт дало можливість підтвердити **основні положення хромосомної теорії спадковості**:

- 1) хромосоми по своїй довжині спадково дискретні;
- 2) кожен ген у хромосомі займає певне місце — локус;

- 3) гени розташовані у хромосомі в лінійній послідовності;
- 4) частота кросинговеру між генами пропорційна фізичній відстані між ними.

Два останніх положення хромосомної теорії досить відносні: в природі зустрічаються гени, що просторово перекриваються, а частота кросинговеру залежить не тільки від відстані між генами. Проте існуючі виключення не зменшують важливості визначення величини кросинговеру з метою побудови генетичних карт.

СТАТЬ І ЗЧЕПНЕ ЗІ СТАТТЮ УСПАДКОВУВАННЯ

Однією з причин успадковування ознак з відхиленням від менделівських формул є зчеплення відповідних генів з так званими **статевими** хромосомами (X і Y). В протилежність всім іншим парам хромосом (або **аутосом**) зазначені статеві хромосоми є гетероморфними, що визначає цілий ряд особливостей успадковування ознак, зчеплених зі статтю. Перш, ніж розглянути ці особливості, необхідно познайомитись з типами хромосомного визначення статі та з деякими іншими проблемами розділу генетики, який називають **генетикою статі**.

9.1. Генетика статі

Генетика статі — це наука про генетичні закономірності визначення первинних і вторинних статевих ознак в онтогенезі, про регулювання чисельного співвідношення особин різної статі та шляхи раннього прогнозування статі. Основоположником цього наукового напрямку вважають німецького генетика К. Корренса.

Значний вклад у розвиток генетики статі внесли Л. Донкастер, Т. Х. Морган, Б. Л. Астауров, В. О. Струнников та інші. Працями цих та інших вчених переконливо доведено, що статеві ознаки (як первинні, так і вторинні) визначаються генами хромосом.

У залежності від стадії онтогенезу, на якій визначається стать, розрізняють **прогамний** (коловертки, попелиці та ін.), **сингамний** (найбільш розповсюджений) та **епігамний** (морський черв'як *Bonellia viridis*) типи визначення статі.

За прогамного типу стать зиготи визначається вже в процесі дозрівання яйцеклітин, які стають різними за розмірами ще до запліднення внаслідок нерівномірного розподілу цитоплазми.

Якщо стать визначається в момент запліднення, то говорять про сингамний тип визначення статі. За епігамного типу стать визначається після запліднення під впливом зовнішніх умов, серед яких найважливіше значення має хімічний склад навколишнього середовища.

Розщеплення за статтю в природі за нормальних умов як правило складає 1:1. Це відповідає розщепленню за моногібридного аналізуючого схрещування і свідчить, що одна стать за певною генетичною детермінантою є гетерозиготою, а протилежна стать — гомозиготою. Про це здогадався ще Г. Мендель.

Вивчення каріотипу особин різної статі привело до висновку про істотні відмінності цього показника у більшості досліджуваних об'єктів.

9.1.1. Типи хромосомного визначення статі

У клопа *Protenor* (рис. 9.1) в одних сперматозоїдах виявилось 7 хромосом, в інших — лише 6. Непарну хромосому назвали статевою X-хромосомою, інші — аутосомами. Всього у самця 13 хромосом, а сперматозоїди за кількістю аутосом (A) і статевих хромосом (X) бувають двох типів, зокрема: $6A + X$ і $6A + O$.

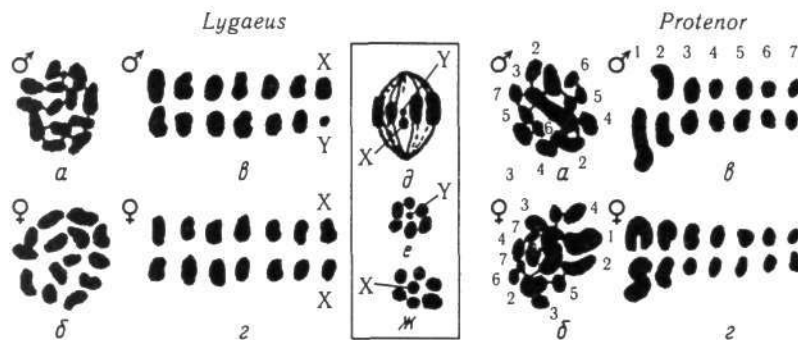


Рис. 9.1. Статеві хромосоми у клопів (*Lygaeus* і *Protenor*):

a, б — набори хромосом самця і самки; *в, г* — ті ж самі набори у розгорнутому вигляді; у самця *Lygaeus* є пара статевих хромосом (XY), а у *Protenor* — лише хромосома X; *δ* — перший поділ мейозу у самця; *ε, ж* — гамети, що несуть X- або Y-хромосому

Щодо самок, то в їх каріотипі було знайдено 14 хромосом, а яйця були завжди одного типу — $6A + X$.

Отже, у самця утворюються статеві клітини двох різних (за кількістю хромосом) типів, а у самки — лише один тип яєць. Саме тому самців *Protenor* віднесли до гетерогаметної статі, а самок — до гомогаметної.

У інших організмів кількісний склад хромосом у клітинах не залежить від статі, але у самців і самок є істотні відмінності в роз-

мірах і формі хромосом однієї пари — статевих хромосом X і Y. Стать, якій властиві дві X-хромосоми, є гомогаметною, а інша, що містить морфологічно відмінні хромосоми X і Y, є гетерогаметною. Саме такий тип хромосомного визначення статі властивий клопу *Lygaeus turcicus* (рис. 9.1). У останнього гомогаметною є жіноча стать (хромосомна формула за статевими хромосомами — XX), а самці є гетерогаметними (статеві хромосоми — XY).

Отже, є організми, у яких стать визначається кількістю статевих хромосом. У особин інших видів статева належність пов'язана з гетероморфністю статевих хромосом, яких називають гетерохромосомами.

У багатьох видів гетерогаметною (хромосомна формула — XO або XY) є жіноча стать. Так, наприклад, у птахів та деяких метеликів (шовкопряд) самки гетерогаметні (XY), а самці — гомогаметні (XX). Саме в таких випадках хромосому X інколи позначають літерою Z, а хромосому Y — літерою W. Таке позначення хромосом свідчить, що мова йде про вид з гетерогаметністю жіночої статі.

Слід підкреслити, що стать визначається не тільки генами статевих хромосом. Жіночі і чоловічі потенції є і в аутосомах. Визначення статі в процесі подальшого розвитку біпотенціальної зиготи багато в чому залежить від кількісного співвідношення чоловічих та жіночих потенцій у геномі або від ступеня їх експресії. Відомо,

Таблиця 9.1

Типи хромосомного визначення статі

Види організмів	Структура за статевими хромосомами			
	Яйця	Сперматозоїди	Зиготи	
			♀	♂
А. Чисельні відмінності статевих хромосом (тип <i>Protenor</i>)				
1. <i>Protenor</i> , деякі інші клопи, пауки, деякі нематоди, коники	X	X + O	XX	XO
2. Міль, попелиця, філоксера	X + O	X	XO	XX
Б. Наявність статевих гетерохромосом (тип <i>Lygaeus</i>)				
1. Клоп <i>Lygaeus</i> , дрозофіла, двокрилі комахи, риби, дводольні рослини, людина	X	X + Y	XX	XY
2. Птахи, метелики, шовкопряд непарний, тутовий, рептилії	X + Y (Z + W)	X (Z)	XY (ZW)	XX (ZZ)
В. Відмінності щодо хромосомних наборів (гапло-диплобонтні): бджоли, оси, їздці, мурахи (самки — диплоїдні, самці — гаплоїдні)				
Г. Визначення статі з допомогою плазмід у бактерій				

що деякі організми взагалі не мають статевих хромосом і належність особин до тієї чи іншої статі залежить від кількості хромосомних наборів. У бджіл, ос, їздців, мурашок та деяких інших комах самки диплоїдні (мають два набори хромосом), а самці — гаплоїдні (мають один набір хромосом). Таке визначення статі називають гапло-диплоїдним. У згаданих видів самці розвиваються із незапліднених яєць, а самки — із зигот.

У деяких бактерій окремі клітини умовно поділяють на жіночі і чоловічі. Так, наприклад, у *E. coli* до чоловічих клітин відносять клітини, що мають фенотип F^+ ; F^- -клітини вважають жіночими. З'ясовано, що F^+ -штами утримують плазмиду F (статевий фактор), який обумовлює кон'югацію клітин F^+ і F^- і обмін генетичною інформацією між цими клітинами (F^+ — донор генетичної інформації, F^- — реципієнт).

Все сказане щодо хромосомного визначення статі у різних видів можна звести до табл. 9.1.

9.1.2. Докази хромосомного визначення статі

К. Коренсом було вперше показано, що дводомні рослини є гетеро- і гомогаметними. Чоловіча рослина бріонії дводомної (*Bryonia dioica*) виявилася гетерогаметною, а жіноча — гомогаметною.

Чіткі докази взаємозв'язку між хромосомами і статтю можна отримати з допомогою тетрадного аналізу. У печіночного моху *Sphaerocarpus* із чотирьох спор, що утворюються із однієї материнської клітини, дві дають жіночі гаплоїдні рослини з X-хромосомою, а дві — чоловічі з Y-хромосомою. Якщо ж отримати диплоїдну рослину з одночасною наявністю в клітині X і Y-хромосом, то така рослина буде однодомною.

Ще одним доказом може слугувати наявність у природі гіандроморфів, які особливо часто зустрічаються серед комах. Є різні типи гіандроморфів — латеральні, передньо-задні, мозаїчні. За латерального гіандроморфізму у дрозофіли, наприклад, одна половина тіла має ознаки жіночої статі, а інша — чоловічої. Цікаво, що це стосується не тільки зовнішніх ознак, але й репродуктивної системи — статевих органів. Мозаїчний гіандроморфізм полягає в тому, що більша частина тіла має ознаки однієї статі, а невеликі ділянки тіла — іншої. Встановлено, що у латерального гіандроморфа дрозофіли у випадку його виникнення із гетерозиготи на одній (чоловічій) половині тіла проявляються рецесивні зчеплені зі статтю гени.

Поява гіандроморфів у *Drosophila* пояснюється тим, що за першого поділу дробління інколи одна із X-хромосом (наприклад,

та, що несе ген забарвлення ока w^+) в одній із дочірніх клітин губиться. Тоді перші два бластомери виявляються неоднаковими щодо вмісту X-хромосом (рис. 9.2, а). У зв'язку з цим у мух-гетерозигот w^+w половина тіла, що розвивається із першого бластомера, буде жіночою і матиме червоне око, а інша половина, що розвивається із другого бластомера, буде чоловічою і з білим оком, бо ген w знаходиться тут у гемізіготному стані (рис. 9.3). За цитологічного дослідження легко перекоонатися, що клітини жіночої половини тіла мають по дві X-хромосоми, а клітини чоловічої — лише одну X-хромосому.

Латеральний гінандроморфізм виявляється не тільки у комах, але й у курей та інших тварин.

Крім цього типу гінандроморфізму, що може бути названий монозіготним, відомий також дизиготний гінандроморфізм. Інколи в яйцеклітинах дрозофіли утворюється два жіночих пронуклеуси, кожен з яких отримує одну X-хромосому і гаплоїдний набір аутосом. За поліспермії, що властива комахам, можливе одночасне запліднення одного пронуклеуса сперматозоїдом з X-хромосоною, а другого — сперматозоїдом з Y-хромосоною (рис. 9.2, б).

Внаслідок такого подвійного запліднення дробління зиготи призводить до утворення двох диплоїдних генетично неоднозначних бластомерів ($2A+XX$ і $2A+XY$), що є причиною розвитку дизиготного гінандроморфа. (Тут і далі буквою А позначено один набір аутосом).

Якщо гетерогаметною статтю є жіноча (тутовий шовкопряд, метелик *Abraaxas*), то іноді у самок утворюються яйця з двома ядрами, одне з яких має хромосому X, а інше — хромосому Y. За поліспермії кожне жіноче ядро зливається із сперматозоїдом, що несе X-хромосому. Виникає двоядерна зигота із однієї яйцеклітини. Дробління зиготи і подальший розвиток призведе до появи ознак гінандроморфізму.

У бджоли двоядерна яйцеклітина може бути запліднена лише одним сперматозоїдом і тоді запліднене ядро дасть жіночу диплоїдну тканину, а незапліднене ядро — чоловічу гаплоїдну.

У їдця *Habrobracon* особини чоловічої статі можуть розвиватись як із незапліднених, так і з запліднених яєць, отже можуть бути як гаплоїдними, так і диплоїдними. Щодо самок, то вони утворюються лише із зигот, тобто завжди диплоїдні. З'ясувалося, що у їдця є особливий ген визначення статі, який у самок знаходиться у гетерозиготному стані (тобто у вигляді двох різних алелів), а у диплоїдних самців — в гомозиготному (дві копії одного алеля). У хабробракона зазначений ген представлений цілою серією рецесивних алелів, які в генотипах самок паруються в різних варіантах (X^aX^b , X^bX^c і т. д.).

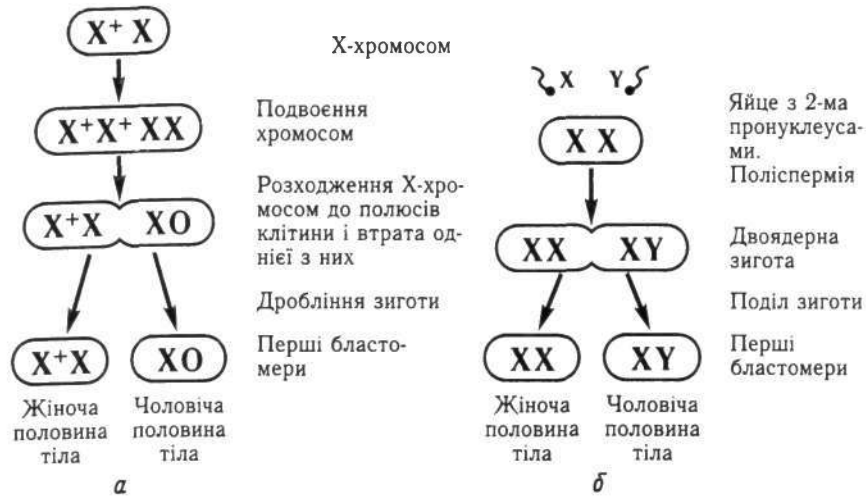


Рис. 9.2. Шляхи можливого утворення латеральних гіандроморфів у дрозофілі: *а* — втрата однієї X-хромосоми за першого поділу зиготи; *б* — утворення генетично відмінних бластомерів за поліспермії

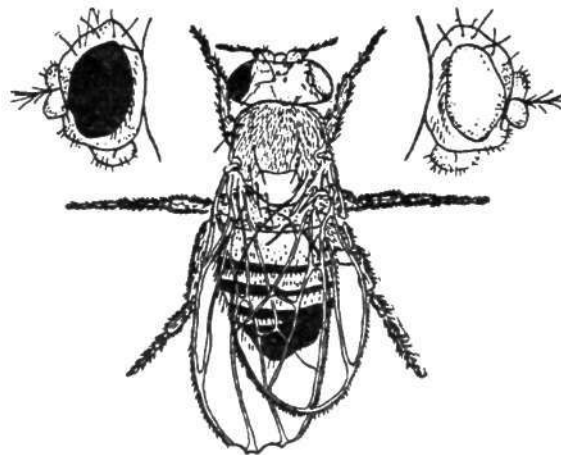


Рис. 9.3. Латеральний гіандроморф *D. melanogaster*, що виник із гетерозиготи w^+w за втрати нею при поділі однієї X-хромосоми:

Ліва (жіноча) половина тіла містить клітини з двома X-хромосомами і по локусу w є гетерозиготною (w^+w). Тому ліве око темночервоне (домінантна ознака, дикий тип). Права (чоловіча) половина тіла складається із клітин, які містять лише одну X-хромосому, що несе рецесивний ген w . Тому праве око біле (рецесивна ознака).

Отже, дизиготний гінандроморф їздця може утворитися шляхом одночасного запліднення двоядерної яйцеклітини двома різними сперматозоїдами, Х-хромосоми яких відрізняються алельними генами.

9.1.3. Гени, що визначають та змінюють стать

Належність особин до тієї чи іншої статі визначається багатьма неалельними генами, що містяться не тільки в статевих хромосомах, але й в аутосомах. Тому особливості каріотипу не завжди співпадають з наявністю тих чи інших статевих ознак. Певне відношення генів аутосом до формування первинних та вторинних статевих ознак добре відоме.

У дрозофіли в одній із аутосом знайдено рецесивний ген *transformer* (*tra* або *t*), який змінює (трансформує) стать. В гомозиготному стані (*tt*) цей ген жіночі зиготи ($2A + 2X$) перетворює у фенотипових самців, щоправда стерильних. Самець $2A + XY$, гомозиготний за геном *t*, є плодючим.

Кукурудза як однодомна рослина має тичиночне суцвіття (волоть) і маточне (качан). Однак знайдено мутантні гени, які однодомну рослину перетворюють у дводомну. Рецесивний мутантний ген *sk* (*silkless*) у гомозиготному стані перетворює рослину кукурудзи у чоловічу, а інший ген — *ts* (*tassel seed*) — за цих же умов призводить до розвитку насіння у волоті. Пиляки за цих умов розвиваються. Таким чином, гомозиготність гена *ts* призводить до перетворення волоті у жіноче суцвіття.

Отже, стать контролюється цілісною системою генотипу, що передбачає взаємодію генів статевих хромосом і аутосом.

Слід підкреслити, що зміна локалізації того чи іншого гена може призвести до серйозних порушень у прояві статевих ознак. Так, наприклад, домінантний ген *Sxr* (*Sex reversed*) знаходиться в Y-хромосомі ссавців і обумовлює розвиток чоловічої статі. Можливо, цей ген (або група тісно зчеплених генів) визначає структуру білка, функцією якого є індукція розвитку насінників. Причотним до цього процесу є також так званий HУ-антиген, який знаходиться на поверхні клітин, що мають Y-хромосому. У особин жіночої статі (XX) цей антиген не виявляється. Якщо ген *Sxr* випадково вбудовується в структуру X-хромосоми, то із зиготи на самку (XX) розвивається фенотиповий самець, не здатний до сперматогенезу.

Встановлено, що кожна зигота є потенційно бісексуальною, тобто може розвиватися як за жіночим, так і за чоловічим типом, але

є генетичні механізми, які чітко диференціюють стать за даних умов розвитку зиготи. Є докази того, що становлення статі на ранніх стадіях розвитку визначається або співвідношенням (дозою) генів чоловічих та жіночих потенцій або ж різною силою їх експресії. Ці дві точки зору, що доповнюють одна одну, лягли в основу двох загальновідомих теорій визначення статі, які отримали найменування **балансової** та **фізіологічної** теорій.

9.1.4. Теорії визначення статі

Балансова теорія К. Бріджеса

К. Бріджес виходив із припущення, що у дрозофіли гени чоловічих потенцій знаходяться в аутосомах, а жіночих — у X-хромосомах, і що визначення статі конкретних особин залежить від співвідношення кількості тих та інших генів у генотипі.

Для перевірки цього припущення триплоїдних самиць дрозофіли (деякі з них виявилися життєздатними і плодючими) К. Бріджес схрестив з нормальними диплоїдними самцями. За такого схрещування отримували нащадків з різним співвідношенням кількості X-хромосом до наборів аутосом:

$$\begin{array}{l} \varphi (3A + 3X) \times \sigma (2A + XY) \\ \text{Гамети самки: } 2A + 2X \quad \text{Гамети самця: } A + X \\ \quad \quad \quad A + X \quad \quad \quad \quad \quad A + Y \\ \quad \quad \quad 2A + X \\ \quad \quad \quad A + 2X \end{array}$$

де A — гаплоїдний набір аутосом, X та Y — статеві хромосоми.

$$\begin{array}{l} \text{Типи зигот: } 3A + 3X \quad 3A + 2X + Y \\ \quad \quad \quad 2A + 2X \quad 2A + XY \\ \quad \quad \quad 3A + 2X \quad 3A + XY \\ \quad \quad \quad 2A + 3X \quad 2A + 2X + Y \end{array}$$

Виявилось, що відношення X/A вказує на стать особин, а саме:

Відношення X/A	Стать	Відношення X/A	Стать
1	самка	> 1	надсамиця
1...0,5	інтерсекс	< 0,5	надсамець
0,5	самець		

Таким чином, у дослідях на дрозофілі підтвердилася думка про те, що стать визначається балансом генів аутосом і Х-хромосом, тобто чоловічих і жіночих потенцій. Однак у більшості тварин ця закономірність не простежується.

У людини, наприклад, чоловічу стать незалежно від кількості Х-хромосом визначає наявність Y-хромосоми. Таким чином, співвідношення X/A або X/Y у людини не мають істотного значення для визначення статі.

Хромосомний механізм визначення статі у рослин поділяється на два основних типи:

1. У одних рослин у визначенні чоловічої статі активну роль виконує Y-хромосома і навіть у тетраплоїда XXXY — стать чоловіча. Лише наявність чотирьох Х-хромосом (XXXXY) обумовлює розвиток гермафродитів. Прикладом таких рослин слугує *Melandrium alba*.

2. У інших рослин стать визначається балансом аутосом і Х-хромосом, при цьому Y-хромосома практично інертна (*Rumex acetosa* та ін.).

Отже, стать не завжди визначається співвідношенням генів аутосом і гетерохромосом, тому балансова теорія К. Бріджеса вимагає деяких уточнень.

Фізіологічна теорія Р. Гольдшмідта

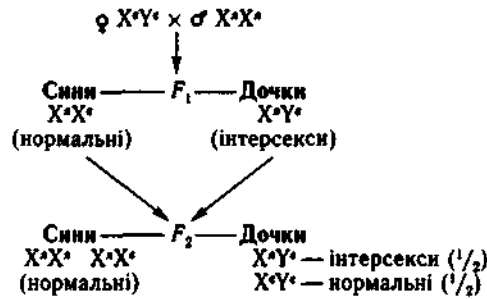
За схрещування різних географічних рас деяких комах виявилось, що серед нащадків разом із нормальними самками і самцями, виникають і проміжні форми, які виявляють поступовий перехід первинних і вторинних статевих ознак від однієї статі до другої, тобто є **інтерсексами**. Можна припустити, що це залежить від відносної сили прояву генів чоловічих і жіночих потенцій, які завжди є у потенційно бісексуальної зиготи.

З метою перевірки цього припущення Р. Гольдшмідт схрещував дві географічно віддалені раси непарного шовкопряда — європейську і японську, які істотно відрізнялися статевими потенціями. За цими ознаками європейська раса є кволюю, а японська — сильною.

Виявилось, що за схрещування самки європейської раси з самцями японської в F_1 розвивається інтерсексуальність жіночого типу.

Справа в тому, що Х-хромосома непарного шовкопряда визначає чоловічу стать, а Y-хромосома — жіночу. Жіноча тенденція Y-хромосоми сильніша чоловічої тенденції Х-хромосоми, тому зигота XY — це зигота на самку. Однак статева потенція Y-хромосоми європейського непарного шовкопряда в сукупності з Х-хромосомою японського не дає виразної переваги жіночій тенденції, бо чоловічі потенції Х-хромосоми японської раси дуже сильні. Саме тому із

гібридної зиготи X^eY^e (я — японська, e — європейська) розвивається інтерсекс. Схема досліджу:



Отже, для становлення статі дуже важливим є ступінь експресії тих чи інших генів, що визначають тип статевого розвитку.

Факт бісексуальності зиготи і можлива регуляція її статевих потенцій залежно від генотипу і навколишніх умов лежать в основі явища відносної сексуальності деяких організмів у природі.

У хламідомонади мінус-клітини зливаються тільки з плюс-клітинами, утворюючи диплоїдну зиготу. Остання проходить два мейотичних поділи і утворює тетраду зооспор, із яких дві є «плюс», а інші дві — «мінус»-формами, тобто розщеплення за статтю складає 1:1. Серед «+»- та «-»-клітин є клітини з проміжною (більш слабкою) статевою потенцією, і ці клітини здатні копулювати як між собою, так і з клітинами з більш виразною статевою диференціацією.

У дріжджів також знайдено «+»- і «-»-лінії гаплоїдних клітин, що кон'югують з клітинами, протилежними за знаком, тобто з іншою статевою потенцією. Ці форми дріжджів називають гетероталічними, а форми, у яких гаплоїдні клітини зливаються незалежно від знака їх статевої потенції, називають гомоталічними.

Фізіологічне диференціювання статі у *Protozoa* (наприклад, у інфузорій), у гомоталічних дріжджів та інших організмів забезпечується існуванням різних «типів злучення», характерних для данного виду. Кон'югація може здійснюватися лише у певному напрямку, залежно від наявності клітин необхідного «типу злучення».

9.1.5. Гетерохромосоми і дозова компенсація

В X-хромосомі *Drosophila* вже картовано сотні генів. Більшість із них не має відповідних алелів в Y-хромосомі і у самців знаходиться

ся в гемізиготному стані. Виключення складають окремі гени, наприклад ген *bobbed* (*bb*), який кодує рРНК, бо його алелі є як у Х-, так і в Y-хромосомах. Є гени, що містяться лише в Y-хромосомі — це, наприклад, ген фертильності самців, який призводить до розвитку насінників і обумовлює сперматогенез. Отже, наявність гомологічних послідовностей нуклеотидів у Х- та Y-хромосом *D. melanogaster* дуже мала, а генетично життєва важливість Y-хромосоми є незначною в порівнянні з X-хромосоною.

Щодо людини, то серед десятків (більше 100) генів, локалізованих на сьогодні в Y-хромосомі, знайдено ключовий для становлення чоловічої статі ген — *Sxr* або *SRY*. Відповідальними за різні стадії сперматогенезу вважають ген *AZF* (фактор азооспермії) та ще два гени, недавно локалізовані в довгому плечі хромосоми Y. Остання, як з'ясувалося, містить також гени, що не мають прямого відношення до репродуктивної функції, — це ген, контролюючий зріст людини (*GCY*), ген гістосумісності, ген розміру зубів та ін. Порухення структури цих генів призводить до відомих спадкових аномалій, що передаються голандрично (від батька — синові). Серед них — людина-дикуобраз, синдактилія, безплідність, поява гонадобластом тощо.

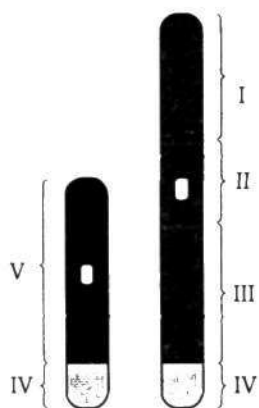


Рис. 9.4. Схематичне зображення X- (зліва) і Y- (справа) хромосом *Melandrium alba*:

Гомологічні сегменти світліші

Якщо відсутня ділянка I, рослини утворюють гермафродитні квіти, за відсутності сегментів III—IV виникає чоловіча стерильність. Дільниця II, можливо, контролює розвиток пиляків. Сегмент V, що є лише в X-хромосомі, утримує детермінанти жіночої статі.

Незважаючи на те, що у більшості видів клітини жіночої статі мають дві X-хромосоми, а чоловічої — лише одну, рівень експресії

малій, що передаються голандрично (від батька — синові). Серед них — людина-дикуобраз, синдактилія, безплідність, поява гонадобластом тощо.

Генетична значущість X-хромосоми у людини є значно більшою, ніж Y-хромосоми. Навіть така чисто чоловіча ознака, як розвиток та дозрівання сперматозоїдів, контролюється генами не тільки Y, але й X-хромосом, причому переважна більшість цих генів належить X-хромосомі.

Генетична неоднозначність X- та Y-хромосом виявлена також у рослин. Ці хромосоми у *Melandrium alba* мають спільні та відмінні послідовності ДНК, які умовно позначаються римськими цифрами I—V (рис. 9.4). Y-хромосома складається з ділянок I—IV.

Якщо відсутня ділянка I, рослини утворюють гермафродитні квіти, за відсутності сегментів III—IV виникає чоловіча стерильність.

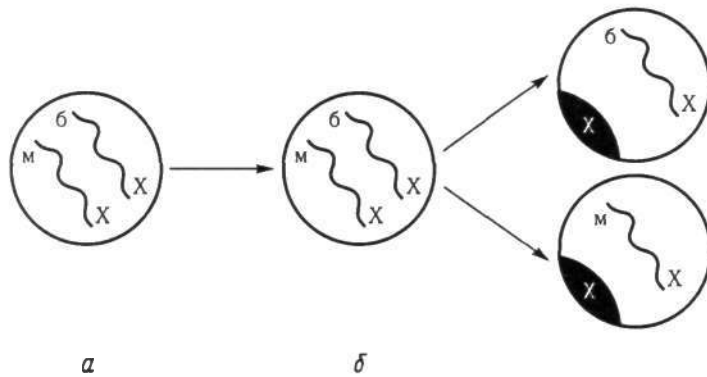
X-хромосою
означає,

D. melanogaster

(, ,)

(гетерохроматинізації, лайонізації)

(. 9.5).



a

б

. 9.5. , ілюструє

еухроматинними

(б).

50% стає

50% —

; () - ;

з

z>

coat (C^B).

yellow coat (C^Y),

black

П'ятнисте черепахове забарвлення кішок (генотип $C^Y C^B$) обумовлене випадковою інактивацією X-хромосом у ранньому періоді розвитку. Клоні клітин, що виникли за поділу клітини з інактивованим алелем C^Y , обумовлюють чорну шерсть (експресується ген C^B), а плями жовтої шерсті виникають за рахунок розмноження клітин з інактивованим алелем C^B .

Жінки, гетерозиготні за генами X-хромосом, теж є мозаїками. Так, наприклад, зчеплена зі статтю мутація ектодермальної дисплазії, що обумовлює відсутність зубів і потових залоз, проявляється лише в деяких місцях щелеп та поверхні шкіри (мозаїцизм). Відомі жінки-мозаїки за проявом генів деяких ферментів, факторів зсідання крові та ін.

У самців з генотипами XXУ, XXXУ і т. п. функціонує теж лише одна X-хромосома (у них виявляються тільця Барра). Тому наявність тільця Барра не можна вважати вторинною статевую ознакою, за якою можна завжди розпізнати жіночу стать.

Механізм інактивації X-хромосом ще не з'ясований. Відомо, що у дрозофіли за дозової компенсації регулюється не активність всієї X-хромосоми, а кожного гена окремо. Якщо ген аутосоми перенести в X-хромосому, то регуляції його активності по типу компенсації дози не спостерігається. Отже, цей механізм регуляції досить специфічний саме для генів X-хромосом. Його пояснюють наявністю гіпотетичного гена-компенсатора в X-хромосомі, який не підлягає дозовій компенсації і обумовлює синтез інгібітора транскрипції генів X-хромосоми. Чим більше X-хромосом, тим більше синтезується інгібітора і тим нижча активність відповідних генів. Припускають також існування аутосомного компенсатора, який забезпечує синтез активатора транскрипції генів X-хромосоми.

9.1.6. Особливості визначення статі у ссавців

Розвиток статі у ссавців — процес, що складається з двох етапів. Хромосомний склад ядра зиготи визначає статеву диференціацію гонад, які розвиваються або в насінники (за хромосомного складу зиготи $2A + XY$) або в яєчники (за хромосомного типу $2A + 2X$). Насінники продукують тестостерон, в цьому випадку розвиток йде по чоловічому типу. Інший гормон насінників — χ -фактор — подавляє розвиток яєчників і фалопієвих труб. Отже, розвиток насінників і продукція чоловічих гормонів — результат експресії генів Y-хромосоми.

Найважливіше значення для цього має домінуючий ген *Sex-reversed* (*Sxr* або *SRY*). Наявність гена *Sxr* в одній із X-хромосом

призводить до того, що зиготи XX розвиваються за чоловічим типом з утворенням насінників. Сперматогенез у цьому випадку відсутній. Такі самці є мозаїками щодо функції генів, зчеплених зі статтю. Аномальна X-хромосома, характерна для самців XX *Sxr*, виникає внаслідок генетичної рекомбінації між хромосомами X і Y.

Розвиток зигот за чоловічим типом можливий лише за наявності продукту зчепленого з X-хромосомою гена (*Tfm*⁺), що обумовлює утворення зв'язуючого тестостерон білка, який є в цитоплазмі клітин як самців, так і самок. Цей білок виконує функцію регулятора, який активується, зв'язуючи тестостерон. Комплекс білок-тестостерон входить в ядро і активує гени, необхідні для диференціювання клітин за чоловічим типом.

Відомий синдром, що називається **тестикулярною фемінізацією**. Він зустрічається у багатьох видів, включаючи і людину. Клітини мутантних ембріонів X^{Tfm}/Y абсолютно нечутливі до дії тестостерону. Внаслідок цього всі вторинні статеві ознаки зародка розвиваються не за чоловічим, а за жіночим типом. Однак із-за наявності Y-хромосоми замість яєчників у таких особин утворюються насінники, які подавляють за рахунок χ -фактора розвиток фалопієвих труб і матки, внаслідок чого виникає сліпа вагіна.

Введення тестостерону в зародки генотипу XX або в кастровані зародки XY викликає розвиток всіх вторинних статевих ознак самця. Однак із-за відсутності χ -фактора у таких ембріонів розвиваються не тільки чоловічі, але й жіночі статеві органи, що призводить до гермафродитизму.

Отже, з відкриттям мутацій *Sxr* і *Tmf* картина статевого розвитку ссавців стала зрозумілою, але поки що лише в загальних рисах.



Рис 9 6 Послідовність подій за визначення чоловічої статі у ссавців

Загальна схема подій у ссавців за визначення первинних і вторинних статевих ознак представлена на рис. 9.6.

9.1.7. Кількісне співвідношення особин різної статі і його регуляція

Попередній аналіз, проведений на рослинах моху, хламідомоні, грибках *Neurospora* та інших об'єктах, а також статистичні дані свідчать про існування **генетичного визначення** статі, яке забезпечує розщеплення нащадків за статевими ознаками у співвідношенні 1:1. У процесі індивідуального розвитку статі формується під впливом факторів зовнішнього і внутрішнього середовища. Тому **первинне співвідношення** особин за статтю, яке визначається генетично, може істотно змінюватися за розвитку зиготи залежно від гормонального фону, життєздатності особин різної статі та інших причин. Це змінене співвідношення називають **вторинним співвідношенням** за статтю.

Найчастіше вторинне співвідношення зсувається в бік переважання жіночої статі, бо у багатьох видів чоловіча стать як гетерогаметна має меншу життєздатність. За статистикою, у людини на 100 новонароджених дівчаток приходить 106 хлопчиків, у дитячому віці на 100 дівчаток нараховується 103 хлопчики, у юнацькому віці це співвідношення складає 100:100. У віці 50 років — 100 жінок на 85 чоловіків, а в 85 років — 50 чоловіків на 100 жінок.

Генетичними причинами відхилень у розщепленні за статтю можуть бути нерівномірність розходження хромосом у гамети гетерогаметної статі, наявність рецесивних леталей у статевих хромосомах, наявність у генотипі генів, що змінюють стать, та ін.

9.1.8. Методи штучного регулювання статі

У багатьох тварин статеву належність особин незалежно від їх генотипової структури вдається регулювати за допомогою гормонів.

З фактом перевизначення статі за рахунок гормонального фону ми зустрічаємось і в природі (морський черв'як *Bonellia viridis*). Якщо личинка приєднується до хоботка самки, то вона розвивається у самця. Вільно плаваючі личинки розвиваються як самки. Справа в тому, що в хоботці самки є хімічні сполуки, здатні перевизначати стать личинки, яка є потенційно бісексуальною.

Зроблено чимало спроб штучно впливати на статевий розвиток тварин за допомогою гормонів. Позитивні результати по перетво-

ренню однієї статі в іншу внаслідок гормонального впливу отримано в дослідях на тритонах, жабах, рибах, птахам та інших тваринах.

Так, обробка естрогенами курячих яєць до інкубації призводить до перетворення чоловічої статі в жіночу, що проявляється принаймні на ембріональній стадії розвитку (В. Б. Савватеев).

Цікавим прикладом повного перевизначення статі в онтогенезі з допомогою гормонів можуть бути досліді Т. Ямамото на акваріумних рибках медаках (*Oryzias latipes*). У цих риб гетерогаметною є чоловіча стать (XY). Вирощування мальків у присутності жіночого статевого гормону (естрону або стильбестролу) сприяє розвитку чоловічих генотипів XY у нормальних самок. Вони схрещуються з самцями і дають нащадків. Цей дослід свідчить про генетичну бісексуальність організмів і про можливість змінювати стать штучно.

Інші підходи до штучного регулювання статі були розроблені російськими генетиками Б. Л. Астауровим і В. О. Струнниковим на тутовому шовкопряді. В дослідях Б. Л. Астаурова ооцити I порядку прогрівали до 46 °С. За цих умов мейоз не здійснюється і яйця залишаються диплоїдними. Такі яйця розвиваються партеногенетично, і всі нащадки мають жіночу стать (ZW).

Отримати чисто чоловічих нащадків у тутового шовкопряда можна шляхом штучного андрогенезу (Астауров). Незапліднені яйця обробляють високою температурою (тепловий шок) і опромінюють рентгенівськими променями. За цих умов ядро яйця руйнується. За поліспермії два чоловічих пронуклеуси зливаються і утворюють диплоїдне ядро. Це так звана андрогенетична зигота, з якої розвивається організм з фенотипом батька.

Інший підхід до отримання чоловічих особин тутового шовкопряда використав В. О. Струнников. В основі методу — отримання ліній, гетерозиготних по двох рецесивних летальних мутаціях, локалізованих у кожній із двох X-хромосом самця. Самці (XX) з такими мутаціями виживають, а самки (XY або ZW) гинуть, бо гени X-хромосоми у них знаходяться в гемізиготному стані.

Відомі спроби регулювати стать ссавців штучним заплідненням після поділу сперми на сперматозоїди з X-хромосомами і Y-хромосомами шляхом центрифугування (X-хромосоми важчі) та електрофоретичного розподілу.

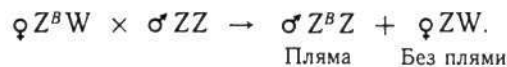
Перспективними в справі регулювання статі можуть бути імунгенетичні методи, які передбачають імунізацію самок антигенами, що є в Y-сперматозоїдах. Взаємодія отриманих антитіл з імплантованими зиготами може забезпечити отримання необхідної статі у потомства.

Важливе значення має раннє розпізнавання статі нащадків. Розроблено чимало генетичних методів для розв'язання цієї проблеми.

1. Жіночу стать у ссавців, враховуючи й людину, можна розпізнати на ранніх стадіях розвитку завдяки наявності тілець Барра. Для цього проводять цитологічний аналіз клітин біляплідної рідини. Сьогодні цей метод використовується рідко, бо він не зовсім безпечний.

2. Отримано лінії шовкопряда, у яких грани на самця — білі, а на самку — чорні. Цього досягнуто шляхом упродовження в Y-хромосому гена w^+ , що обумовлює чорне забарвлення коконів.

3. У курей домігантний ген B , який визначає поперечно-строкате сіре забарвлення пір'я, проявляється вже у курчат у вигляді світлої плями на голові. Якщо курку ZW , що має ген B в Z -хромосомі, схрестити з півнем, що не має сірого оперення, то півники матимуть світлі плями на потилиці:



4. Крім генетичних та цитологічних методів, ранне розпізнавання статі може успішно здійснюватись імунологічними, біохімічними, молекулярногенетичними та іншими методами. Прикладом може бути дослідження НУ-антигена та його генетичних детермінантів на ранніх стадіях розвитку у ссавців.

9.2. Успадковування ознак, зчеплених зі статтю

В тих випадках, коли гени досліджуваних ознак знаходяться в аутозомах, кількість яких однакова у особин різної статі, за реципрокних схрещувань розщеплення в F_2 є однаковим. Зовсім інше розщеплення за цих схрещувань спостерігається тоді, коли гени локалізуються в статевих хромосомах. Оскільки Y-хромосома у дрозофіли в порівнянні з X-хромосомою генетично майже інертна, то гени X-хромосом, за невеликим виключенням, не мають своїх аельних копій в Y-хромосомах. У зв'язку з цим успадковування генів, зчеплених із статевими хромосомами, проходить своєрідно; їх розподіл по гаметах і надходження до зигот відповідає поведінці генетично неоднозначних статевих хромосом у мейозі і в момент запліднення.

У зв'язку з тим, що у гетерогаметної статі більшість генів X- і Y-хромосом знаходиться в гемізиготному стані, рецесивні ознаки, що кодуються генами статевих хромосом, у гетерогаметних особин виявляються у фенотипі (явище псевдомініантності).

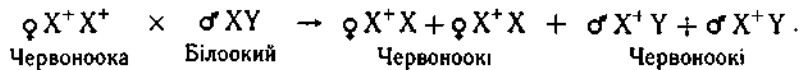
У гомогаметної статі рецесивні гени, як правило, не проявляються, бо у гетерозиготи їм протистоять домінантні алелі в гомологічній Х-хромосомі.

Успадковування ознак, гени яких знаходяться в статевих хромосомах, називають успадковуванням, зчепленим зі статтю.

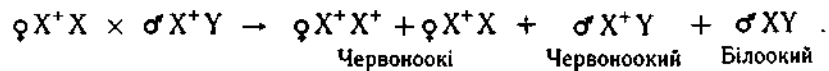
Це явище було відкрито Т. Морганом у дослідженнях на дрозофілі і дало змогу генетично підтвердити роль хромосом у спадковості та експериментально обґрунтувати хромосомну теорію.

9.2.1. Особливості успадковування за повного і неповного зчеплення зі статтю

Т. Морган провів реципрокне схрещування диких червонооких (w^+) мух з мутантними білоокими (w). За першого варіанту схрещування (самки червоноокої, самці — з білими очима) всі нащадки (і самки, і самці) виявляються червоноокими:

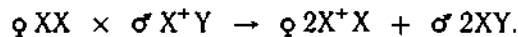


(В цій та подальших схемах схрещувань символ X^+ означає наявність Х-хромосоми з домінантним генем, а символ X — з рецесивним). У другому поколінні:

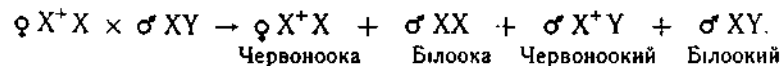


Спостерігається розщеплення у співвідношенні 3 червонооких : 1 білоока муха. При цьому всі самки мають червоні очі, половина самців — білоока, а друга половина — червоноока (рис. 9.7, а).

За реципрокного схрещування самку, гомозиготну з гена білоокості, схрещували з червоноокою самцем (рис. 9.7, б):



В цьому випадку вже в F_1 нащадки розщеплюються за фенотипом у співвідношенні 1:1, причому всі самки виявляються червоноокими, а самці — білоокими. В F_2 особини як жіночої, так і чоловічої статі розщеплюються на червонооких і білооких у співвідношенні 1:1:



Як видно з наведених схем схрещувань, розщеплення за фенотипом залежить від гомогаметності або гетерогаметності нащадків.

У гетерогаметних самців (XY) рецесивний ген w знаходиться в гемізиготному стані і тому проявляється у фенотипі. Щодо гомогаметних самок (XX), то у них рецесивна ознака виявляється лише за гомозиготності рецесивного гена ($w w$). У гетерозигот ($w^+ w$) фенотип визначає домінуючий ген w^+ .

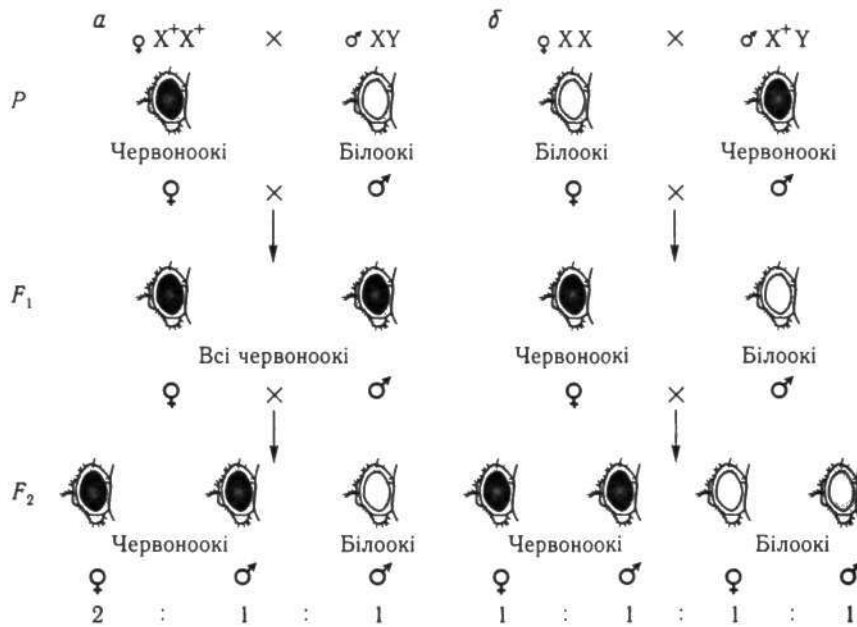


Рис. 9.7. Розщеплення за фенотипом у реципрокних (а, б) схрещуваннях мутантних білооких і нормальних червонооких мух *D. melanogaster*

Оскільки X-хромосоми матері передаються як синам, так і дочкам, а єдина X-хромосома гетерогаметного батька — лише дочкам, то за певного напрямку схрещування ознаки, що визначаються генами X-хромосом, успадковуються хрест-навхрест, тобто від батька передаються дочкам, а від матері — синам. Таке успадкування називають успадкуванням **хрест-навхрест або крис-крис**.

За такою схемою у людини успадковуються деякі спадкові хвороби, наприклад, дальтонізм (кольорова сліпота щодо зеленого та червоного кольору), гемофілія В (один із видів кровоточивості) та ін.

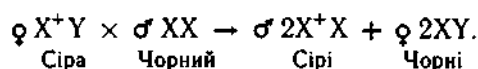
Гени, що знаходяться лише в Y-хромосомі, визначають так звані **голандричні** ознаки. Вони успадковуються разом з хромосомою Y,

тобто у більшості видів — по чоловічій лінії. В цьому випадку виявляється повне зчеплення зі статтю.

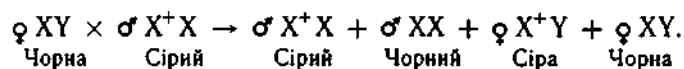
Зазначені особливості успадкування, зчепного зі статтю, властиві і тим видам, у яких самці гомогаметні, а самки гетерогаметні. В цих випадках гени X-хромосом знаходяться в гемізіготному стані не у самців, а у самок, у яких і проявляється явище псевдодомінантності.

У курей, шовкопрядів та інших тварин зчепно зі статтю по типу крис-крос успадковується цілий ряд ознак. Прикладом може бути успадкування сіро-строкатого оперення у плімутроків.

За схрещування сіро-строкатих курочок (X^+Y) з чорними півниками (XX) уже в першому поколінні нащадки за фенотипом чітко розщеплюються залежно від статі:



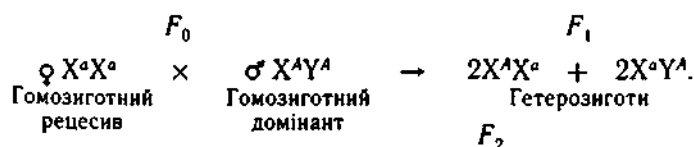
У другому поколінні



особини з сірим та чорним забарвленням пір'я зустрічаються у співвідношенні 1:1 як серед курочок, так і серед півників.

В усіх наведених прикладах гени, що кодують досліджувані ознаки, містяться лише в одній із гетероморфних статевих хромосом (X або Y) і не мають алельних копій у протилежній хромосомі. Відповідні ознаки називають повністю зчепленими зі статтю.

Буває й неповне зчеплення, коли відповідні алелі знаходяться в обох гетерохромосомах. Такі гени за нормальних умов не перебувають у гемізіготному стані, тому рецесивний алель проявляється лише за гомозиготності, яка може бути як у матері, так і у батька. Цікаво, що за схрещування рецесивних і домінантних гомозигот з цих генів через одне покоління спостерігається вищеплення аналогічних гомозигот, статева належність яких буде такою ж, як і у батьківських форм:



(В наведеній схемі схрещування символами X^A і Y^A позначено статеві хромосоми з домінантними генами, а символами X^a і Y^a — ті ж

хромосоми, але з рецесивними генами). Як видно із схеми схрещування, в поколінні F_2 має місце розщеплення серед особин як жіночої, так і чоловічої статі на гомозигот та гетерозигот у співвідношенні 1 : 1. Статева належність гомозиготних домінантів і рецесивів співпадає з такою у батьківських (F_0) форм. Отже, якщо ушкоджений ген міститься в X-хромосомах гомозиготної жінки і є причиною спадкової хвороби, то хвороба може знову виявитися через покоління і лише у внучок. У випадку, коли носієм хвороби є чоловік, в поколінні F_2 хворітимуть тільки внуки.

Якщо особини F_2 з рецесивною ознакою мають ту ж саму стать, що і батьки (F_0) з такою ж ознакою, то це свідчить про **неповне зчеплення** відповідної ознаки **зі статтю**.

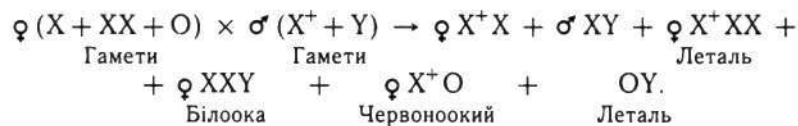
У людини деякі хвороби (шкірний рак, загальна кольорова сліпота) успадковуються саме за такою схемою.

9.2.2. Особливості успадкування за нерозходження статевих хромосом

Вивчаючи успадкування зчеплених зі статтю ознак у дрозофіли, К. Бріджес звернув увагу на те, що інколи спостерігається порушення схеми крис-крос успадкування.

Так, за схрещування білооких самиць з червоноокими самцями з частотою 0,001—0,1% в F_1 появляються білоокі самки і червоноокі самці. Причиною цього, як виявилось, є нерозходження статевих хромосом у мейозі.

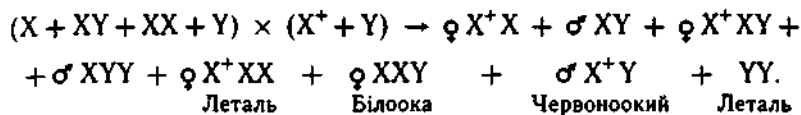
У білоокої гомозиготної самки (XX), окрім нормальних гамет (X), інколи (за рахунок нерозходження X-хромосом у мейозі) утворюється також незначна кількість незвичайних гамет (XX і O). Ці три класи гамет (X, XX і O) зливаються із сперматозоїдами червоноокого самця (X^+ і Y):



Зиготи X^+XX та OY нежиттєздатні. Серед інших типів зигот виключними є білоокі самки (XXY) та червоноокі самці (X^+O), яких за нормального розходження хромосом не буває. Самці дрозофіли, що не мають Y-хромосоми, стерильні. Виключні самки (XXY) — фертильні.

Зазначене нерозходження хромосом, що вперше трапляється у мейозі, називають **первинним нерозходженням** хромосом.

За схрещування виключних білооких самок (XXY) з нормальними червоноокими самцями (X⁺Y) процент виключних нащадків значно збільшується (до 8%). Останнє є результатом так званого вторинного нерозходження хромосом. Самка XXY утворює гамети, які за складом статевих хромосом поділяються на 4 типи (X + XY + XX + Y). Їх злиття із сперматозоїдами нормального червоноокого самця (X⁺ + Y) дає такі типи зигот:

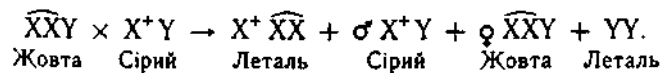


Виключні (білооки) самки в цьому випадку розвиваються із зиготи XXY, а виключні (червонооки) самці — із зигот X⁺Y.

Нерозходження статевих хромосом буває не тільки у самок, але й у самців (XY), у яких у цьому випадку утворюються незвичайні за складом статевих хромосом сперматозоїди (XY і O). Інколи за рахунок нерозходження хроматид на стадії тетравалента можливі гамети XX і YY.

Вторинне нерозходження хромосом може досягати 100% за умов хімічного сполучення між статевими хромосомами. В цьому випадку обидві зчеплені X-хромосоми попадають в одну гамету, в той час як в іншу гамету не попадає жодна. Ознака, що зчеплена з такими подвійними X-хромосомами, успадковується із покоління в покоління по материнській лінії. Л. В. Морган знайшла виключну (XXY) жовту (*yellow*) самку дрозофіли, в X-хромосомах якої в гомозиготному стані утримувався рецесивний ген *y*. Схрещуванням цієї самки (X^yX^yY) з нормальними сірими самцями (X⁺Y) виявлено, що рецесивна ознака жовтого тіла успадковується самками як першого, так і наступних поколінь, в той час як ознака сірого тіла постійно передається самцям. Таким чином, успадкування типу крис-крос у цьому випадку не спостерігається.

Цитологічний аналіз виявив, що обидві X-хромосоми виключних самок фізично зв'язані одна з одною (XXY). Лінія, що має такі зчеплені X-хромосоми і гомозиготна по гену *y*, називається *double yellow* (подвійна жовта). Успадкування X-хромосом і ознаки забарвлення тіла за схрещування самки лінії *double yellow* з нормальним самцем йде за такою схемою:



В цьому випадку самки успадковують свої зчеплені дві X-хромосоми від матері, а самці свою єдину X-хромосому — від батька.

Лінія дрозофіли подвійна жовта (*yy*) використовується в спеціальних схрещуваннях з метою виявлення спадкових змін у статевій хромосомі самців.

Отже, нерозходження статевих хромосом — як випадкове первинне, так і обумовлене особливостями каріотипу вторинне — призводить до того, що розщеплення зчепних зі статтю ознак не відповідає класичним формулам.

Підсумовуючи все сказане, слід зазначити, що в принципі гени X- та Y-хромосом успадковуються так само, як і гени аутосом, тобто у відповідності з закономірностями незалежного або зчепного успадкування. Однак морфологічна і генетична відмінність статевих хромосом призводить до того, що успадкування кодованих ними ознак має свої особливості. Основні із них — це невідповідність результатів реципрокних схрещувань, а також ряд відхилень від менделівських формул розщеплення. Як видно із наведених вище прикладів, у випадку успадкування, зчепного зі статтю, розщеплення ознак іноді спостерігається вже в F_1 , чого не буває за успадкування аутосомних генів, а розщеплення в F_2 може не відповідати менделівському. Зате *зчепному зі статтю успадкуванню властива залежність розщеплення ознак від гомо- та гетерогаметності нащадків.*

Слід зазначити, що зчепне зі статтю успадкування, як і зчепне успадкування взагалі, не тільки не спростовує менделівських законів, але й слугує на їх користь, бо переконливо свідчить про:

- 1) наявність генів як матеріальних носіїв спадковості;
- 2) локалізацію генів у хромосомах;
- 3) обумовленість успадкування тих чи інших генів поведінкою хромосом у мейозі, а також за запліднення.

З'ясування таких проблем, як хромосомний механізм визначення статі, зчепне зі статтю успадкування, визначення частоти кросинговеру і побудова генетичних карт, дало вичерпні і остаточні докази наявності генів у конкретних локусах хромосом і тим самим створило надійну основу хромосомної теорії спадковості.

НЕХРОМОСОМНЕ УСПАДКОВУВАННЯ

Нехромосомним успадкуванням називають процес передачі нащадкам спадкових детермінантів нехромосомними структурами клітини. Остання може утримувати чимало напівавтономних нехромосомних генетичних елементів, що містять ДНК або РНК. Молекули цих нуклеїнових кислот виявляються в нуклеоплазмі, в органелах цитоплазми еукаріотних клітин (мітохондріях, пластидах та ін.), в плазмідах прокаріотів, у складі інфекційних агентів, ендосимбіонтів тощо.

В тих конкретних випадках, коли успадковуються ознаки, що визначаються генами цитоплазми еукаріотних клітин, можна говорити про **цитоплазматичну спадковість**. *Сукупність генів, що знаходяться в цитоплазмі еукаріотної клітини, називають плазмоном або плазмотипом.* Найважливішими носіями генетичної інформації в цитоплазмі еукаріотів є мітохондрії та пластиди. Гени ДНК мітохондрій складають так званий **хондріом**, а гени ДНК пластид — **пластидом** або **пластом**. Всі ці гени передаються нащадкам разом з цитоплазмою статевих клітин і незалежно від генів ядра.

Проте говорити про повну незалежність генів ядра і генів цитоплазми (**плазмогенів**) не можна, бо функції їх у тій чи іншій мірі взаємно пов'язані. Є ознаки, що кодуються одночасно як ДНК ядра, так і ДНК цитоплазми. Це свідчить про тісну взаємодію генів ядра і цитоплазми в процесах реалізації генетичної інформації і безпосередньо в процесах успадкування.

Роль цитоплазми в спадковості не обмежується наявністю в ній власних генів (плазмогенів), — цитоплазма, як виявилось, істотно впливає на реалізацію генетичної інформації хромосом. Тому є ще один аспект ролі цитоплазми в явищі спадковості — це так званий **материнський ефект**. Суть його полягає в тому, що властивості цитоплазми яйцеклітини формуються під контролем материнського генотипу. **Перебудова (предетермінація) властивостей цитоплазми** яйця під впливом ядерних генів матері призводить до того, що властивості зиготи, ранні етапи розвитку, а іноді і весь онтогенез

у значній мірі визначаються генотипом матері, а не зиготи. Це явище називається **материнським ефектом** і спостерігається тоді, коли цитоплазма в зиготу вноситься переважно яйцеклітиною. У більшості видів за запліднення саме жіноча гамета є донором цитоплазми, і тому материнський ефект спостерігається дуже часто. За дробління зиготи фенотипові ознаки матері виявляються до тих пір, поки цитоплазма клітин, що утворюються, не змінить своїх властивостей під впливом геному батька.

Повертаючись до проблеми нехромосомного успадковування, слід зазначити, що плазмогени містяться не тільки в ДНК збірної групи внутрішньоклітинних органел; нерідко вони належать різним введеним зовні в клітину інфекційним агентам та симбіонтам, які розмножуються в клітині і разом з цитоплазмою передаються нащадкам. Плазмогенам уподібнюються і деякі інші позахромосомні елементи, які розповсюджуються з цитоплазмою (ДНК-копії деяких РНК та ін.).

Характерними рисами і водночас **критеріями** нехромосомного успадковування є:

1) відсутність менделівського розщеплення на рівні тетрад, а також за аналізуючих та інших схрещувань;

2) невідповідність результатів реципрокних схрещувань;

3) наявність материнського (іноді батьківського або змішаного) типу успадковування (фенотип нащадків визначається тим, кому із батьків належить цитоплазма зиготи);

4) незалежність успадковування ознак від наявності тих чи інших хромосом ядра; заміна в зиготі всіх батьківських хромосом материнськими чи навпаки не впливає на фенотип нащадків, в той час як заміна цитоплазми має вирішальне значення;

5) наявність постзиготичних розщеплень і вищеплення гаплоїдних сегрегантів за митотичних поділів клітин, гетерозиготних по генах органел цитоплазми.

Зважаючи на особливості генетичних детермінантів, що можуть знаходитись у цитоплазмі, на різноманітність виявів їх взаємодії з генами ядер і між собою, доцільно детальніше розглянути такі найважливіші проблеми нехромосомної спадковості:

1) мітохондрії і пластиди як носії генетичної інформації за цитоплазматичної спадковості;

2) успадковування ознак, що контролюються одночасно генами ядра і цитоплазми;

3) ендосимбіонти, інфекційні агенти та деякі інші позахромосомні елементи як носії генетичної інформації;

4) предетермінація генами ядра властивостей власне цитоплазми і материнський ефект у спадковості.

10.1. Цитоплазматична спадковість

У дослідах на еукаріотах генетики зустрілися з численними фактами, які неможливо пояснити з позицій хромосомної теорії спадковості. Перш за все — це факт фенотипової відмінності гібридів, отриманих внаслідок реципрокних схрещувань. Цей факт спостерігали за вивчення закономірностей успадкування багатьох ознак (строкатолістості у рослин, розміру колоній у хлібних дріжджів, напрямку завитків черепашок у ставника великого та ін.). Все пояснюється нерівнозначною участю жіночих і чоловічих статевих клітин в утворенні гібридного організму, що пов'язано з неоднаковою кількістю або якістю цитоплазми в яйцеклітині і сперматозоїді. Буває і так, що ДНК органел одного із батьків руйнується рестриктазами у складі зиготи як така, що не метильована в необхідний спосіб.

У більшості випадків зигота отримує гени цитоплазми в основному від яйцеклітини. В цих випадках нащадки із покоління у покоління повторюють фенотип материнського організму. Це так званий **материнський тип успадкування**.

Буває і **батьківський тип**, бо у деяких видів саме чоловічі статеві клітини є донорами цитоплазми. Нарешті буває й так, що цитоплазма нащадкам передається від обох батьків і необов'язково у рівних співвідношеннях. Це — **змішаний тип** цитоплазматичного успадкування. В усіх цих випадках результати реципрокних схрещувань не співпадають, а зворотні схрещування, незалежно від їх напрямку, не впливають на фенотипи нащадків F_2 .

10.1.1. Мітохондрії і пластиди як носії генетичної інформації

Існує припущення, що мітохондрії та пластиди — це трансформовані в процесі еволюції ендосимбіонти (бактерії), що ввійшли у взаємодію з попередниками сучасних клітин (**симбіогенетична гіпотеза**). Вважають, що внаслідок окремої еволюційної події первинною клітиною були захоплені ціанобактерії, які були здатні до фотосинтезу. Згодом вони перетворились у хлоропласти, що призвело до виникнення первісних рослинних клітин. Попередниками мітохондрій могли бути особливого роду пурпурові фотосинтезуючі бактерії, що потім втратили здатність до фотосинтезу, але зберегли дихальний ланцюг.

Оскільки більшість генів, що кодують білки пластид та мітохондрій, знаходиться в ядерному геномі, вважають, що значна кількість генів первісних органел згодом була перенесена в ДНК ядра.

Слід підкреслити, що структура як мітохондрій, так і протопластів, закодowana двома різними генетичними системами: відносно невелика кількість білків кодується власною ДНК органел і синтезується їх власними рибосомами, в той час як більшість білків цих структур визначається ядерною ДНК і синтезується рибосомами цитоплазми. Системи транскрипції і трансляції в органелах істотно відрізняються від таких в ядрі та власне цитоплазмі. Так, наприклад, антибіотик циклогексимід пригнічує синтез білка у власне цитоплазмі, але не впливає на цей процес у мітохондріях і хлоропластах. Інші антибіотики, такі як хлорамфенікол, тетрациклін і еритроміцин, навпаки, подавляють синтез білка в мітохондріях, але не виявляють помітного впливу на його цитоплазматичний синтез.

Молекули ДНК органел відносно невеликі і у вищих еукаріотів замкнуті в кільце. Мітохондріальний геном у рослин значно більший, ніж у тварин, а геном пластид майже однаковий за своїми розмірами у всіх вищих рослин (≈ 150 кб). У мітохондрію клітин ссавців входить лише одна кільцева молекула ДНК масою біля 11 млн Да, що в сто з лишнім тисяч разів менше ядерного геному. Що ж до мітохондрій рослин, то їх геном в 30—100 разів більший і складається із декількох різних кільцевих ДНК. У деяких представників *Protozoa* і водоростей ДНК органел має лінійну структуру.

Мітохондрії і хлоропласти рослин можуть містити по декілька (інколи й багато) копій своєї геномної ДНК. Ці ДНК розподіляються на окремі групи молекул у матриксі мітохондрій і в стромі хлоропластів, де вони фіксовані на внутрішній мембрані. Місце фіксації ДНК органел називають **центромером**. В органелах немає гістонів і, як вважають, структура геному органели (хондріому чи пластоому) скоріше нагадує бактеріальний геном, ніж хроматин еукаріотів. У ссавців ДНК мітохондрій складає менше 1% всієї ДНК клітини, однак в інших випадках (клітини рослин, дуже великі яйця амфібій) доля ДНК органел може бути значно більшою.

Незважаючи на відносно невелику кількість білків, що кодується хондріомом і пластомом, відповідні органели мають власні системи реплікації, транскрипції та трансляції. Ферменти, що здійснюють ці процеси, є специфічними для органел, однак більшість із них кодується ядерним геномом. Відомо, що всі білки зовнішньої мембрани і матрикса, а також переважна більшість білків внутрішньої мембрани мітохондрій закодovані в генах ядра. Отже, продуктів, що кодуються власним геномом мітохондрій, не так вже й багато. В основному це деякі субодиниці комплексу ферментів дихального ланцюга та деякі інші.

Мітохондріальна ДНК людини складається із 16 569 нуклеотидних пар, в ній практично відсутні некодуючі ділянки. Кодогенною

по черзі слугують то одна, то інша нитка кільцевої ДНК. В ній знайдено гени рРНК, тРНК, білків внутрішньої мембрани мітохондрій і чимало неідентифікованих рамок зчитування. Інtronів у мітохондріальній ДНК людини не знайдено. На кожному з двох ланцюгів ДНК міститься по одному промотору, отже ланцюг ДНК — це один транскриптон, тому довжина відповідних РНК-копій дорівнює довжині всієї кільцевої ДНК. За гіпотезою Д. Аттарді, ця геномна РНК-копія у подальшому розрізається на менші за розміром фрагменти, кожен з яких містить послідовність рРНК або іРНК, а на кінці — послідовність певної тРНК (у хондріомі людини знайдено 22 гени тРНК). У подальшому тРНК-кінець від зазначеної молекули-попередника відрізається і утворюються вільні тРНК, 16S-рРНК, 12S-рРНК та іРНК, необхідні для трансляції.

Щодо мітохондрій дріжджів, то їх ДНК складає 75 кб, вона дуже надлишкова, окремі гени містять інтрони. Транскрипція здійснюється лише на одному ланцюгу ДНК, але з різних промоторів для різних генів (рис. 10.1).

Дуже цікаво, що в мітохондріях існує система триплетного коду, якої немає ні у бактерій, ні в ядерних ДНК рослин і тварин. Так, наприклад, у мітохондріях ссавців кодони AGA і AGG не кодують, як звичайно, аргінін, а слугують стопсигналами. Замість AUG і GUG в ролі стартових кодонів в іРНК мітохондрій можуть виступати AUA і AUU. В той же час у пліснявих грибів кодони AGA, AGG і AUA в мітохондріях транслюються згідно з універсальним кодом.

Система трансляції в мітохондріях має багато спільного з бактеріальною: рибосоми мітохондрій чутливі до антибактеріальних антибіотиків, синтез поліпептидного ланцюга розпочинається з формілметионіну і т. ін. Однак рибосоми мітохондрій дещо відрізняються від бактеріальних.

З ряду причин механізми успадковування генів мітохондрій в основному вивчають на культурах *Saccharomyces carlsbergensis* (пивні дріжджі) і *Saccharomyces cerevisiae* (пекарські або хлібні дріжджі). Це пояснюється перш за все тим, що ці дріжджі виявляють унікальну здібність існувати не тільки за рахунок дихання, але й за рахунок анаеробного бродіння, тобто обходиться без функції мітохондрій. Це дає можливість отримувати життєздатних мутантів по генах ДНК мітохондрій, які є летальними у випадку інших об'єктів дослідження. Крім того, дріжджі — досить прості одноклітинні еукаріоти — можуть розмножуватись як у гаплоїдній, так і в диплоїдній фазі безстатевим шляхом — брунькуванням. Інший шлях розмноження дріжджів — статевий, коли дві гаплоїдні клітини зливаються, утворюючи диплоїдну зиготу. Остання потім поділяється або мітотично, або мейотично. В останньому випадку знову

утворюються гаплоїдні клітини. Використовуючи властивість дріжджів переключатись із статевого на безстатевий шлях розмноження, зручно вивчати гени, відповідальні за функцію мітохондрій — їх локалізацію, успадкування тощо.

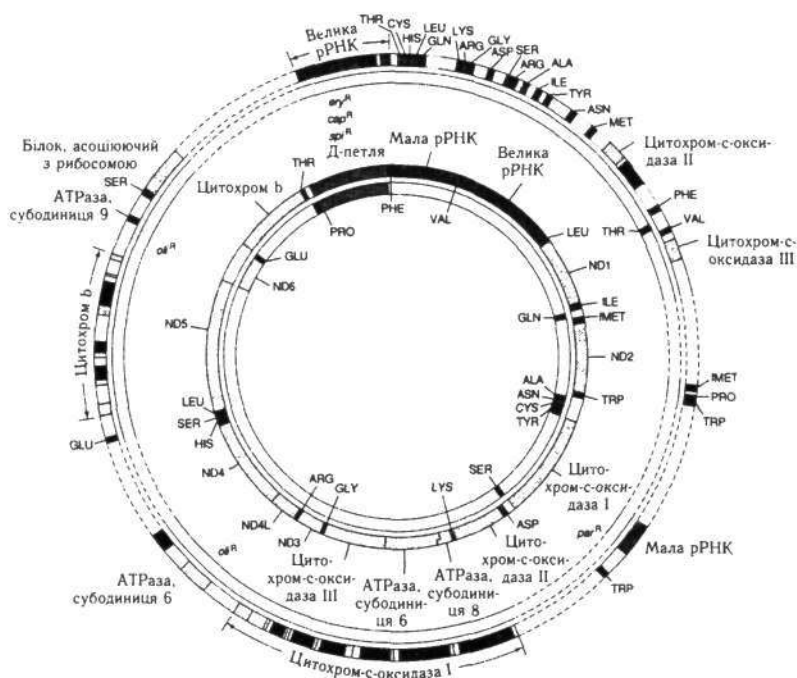


Рис. 10.1. Неповні карти мітохондріальних ДНК *Saccharomyces cerevisiae* і *Homo Sapiens* (по Л. Гривеллу):

Зовнішні два кола — дволанцюгова мтДНК дріжджів, внутрішні — мтДНК людини. Масштаб карти останньої зменшено у два рази по відношенню до масштабу карти мтДНК дріжджів. Інтенсивно темними секторами зображено неідентифіковані рамки зчитування, сірими показано гени білків, проміжне (темно-сіре) забарвлення мають гени рРНК і тРНК. Символами амінокислот позначено гени відповідних тРНК. ND1—6 — NADH-дегідрогеназа, субодинаці 1—6

Хлоропласти, як і мітохондрії, мають свою власну систему біосинтезу білків. Специфічна функція цих білків з'ясована лише в окремих випадках. У фотосинтезуючих клітинах рослин до 50% усіх рибосом випадає на долю хлоропластів, і в кожному з них є 10—60 копій молекул ДНК кільцевої форми. Відомо, що ДНК хлоропластів містить інформацію про рРНК — 16S, 23S і 5S, а також гени тРНК і структурні гени десятків білків, серед яких один дуже

специфічний для хлоропластів. Це білок—фермент 1,5-рибулозо-дифосфат—карбоксилаза. В кодуванні субодиниць цього ферменту взаємодіють ДНК хромосом і ДНК хлоропластів, що є одним із доказів тісного зв'язку між цитоплазмою і ядром.

Приблизно у двох третин представників рослинного світу хлоропласти батьківської форми, що містяться в пилових зернах, не попадають у зиготу, тому хлоропласти успадковуються по материнській лінії. У інших рослин у зиготу переходять пластиди обох батьків і тому разом успадковуються.

Реплікація ДНК органел здійснюється не тільки одночасно з ДНК ядра (тобто в S-фазу клітинного циклу), але і в інші фази. Індивідуальні молекули ДНК реплікуються незалежно не тільки від реплікації ядерної ДНК, але й від інших ДНК органел. Тому деякі молекули ДНК мітохондрій протягом одного клітинного циклу можуть подвоюватись декілька разів, а інші — ні разу. Незважаючи на таку випадковість реплікації, середня кількість ДНК органел у клітині є стабільною.

Однак відомі випадки, коли процес подвоєння органел здійснюється дуже узгоджено з цитокінезом і безпосередньо передує останньому. Саме так поділяються хлоропласти у деяких водоростей, наприклад, єдиний хлоропласт у водорості *Klebsormidium*.

На сьогодні для багатьох видів вищих рослин, моху і водоростей послідовність нуклеотидів ДНК в мітохондріях і хлоропластах повністю розшифрована. Недавно повністю секвеновано два хлоропластних геноми — печіночники (*Marchantia polymorpha*, 121 024 п. н.) і тютюну (*Nicotiana tabacum*, 155 844 п. н.). Обидва геноми виявилися дивовижно однаковими щодо вмісту генів: крім рРНК і тРНК, вони кодують 55 ідентифікованих і 30 неідентифікованих білків. Деякі гени хлоропластів об'єднані в оперони, як у бактерій. Стало відомо, що ДНК хлоропластів містить інвертовані і неінвертовані повтори, а також рибонуклеотидні вставки довжиною від 10 до 20 нуклеотидів. У гороху, наприклад, виявлено 19 таких вставок. Чимало хлоропластних генів містять інтрони, отже пластидам властивий процесинг і сплайсинг. Деякі із виявлених інтронів поводять себе як транспозибельні елементи.

Відносно недавно в пластидах виявили ще один дуже важливий молекулярногенетичний процес — так зване РНК-редагування. Останнє полягає в модифікації практично всіх кодуючих ділянок іРНК, в елімінації ініціюючих і термінуючих кодонів тощо. Показано, що функціонально активні білки синтезуються лише на відредагованих молекулах іРНК. Слід зазначити, що редагування іРНК залежно від цитотипу та гістотипу буває як повним, так і частковим. Отже, в пластидах можливе утворення за рахунок однієї ге-

нетичної послідовності різних за будовою генних продуктів, необхідних для диференціювання клітин і тканин.

Ще одна особливість хлоропласних геномів — наявність у них трьох типів промоторів, один із яких розпізнається власною РНК-полімеразою пластиди, другий — РНК-полімеразою ядра, а третій (знайдений у кукурудзи) активується світлом.

10.1.2. Методи вивчення структури та функцій хондріому

Вже зазначалося, що об'єктами, зручними для з'ясування функцій мітохондріального геному, є факультативні аероби, які здатні за неможливості дихання існувати завдяки анаеробному процесу бродіння. Такими факультативними аеробами є деякі дріжджі, серед яких відомо чимало мутантів по генах мітохондрій (порушення дихання, поява стійкості до лікарських препаратів тощо).

В 1949 році Б. Ефрусі знайшов, що окремі клітини із популяції пекарських дріжджів *S. cerevisiae* дають біля 1% карликових колоній (так звані *Petite*-мутанти). Їх фенотип позначають як Pet^- в протилежність дикому типові Pet^+ . Мутанти Pet^- не можуть дихати і утворюють дрібні колонії за рахунок енергії бродіння. Частоту таких мутантів можна збільшити дією мутагенів, що уражують цитоплазматичну ДНК, — таких як акрифлавін, еуфлавін, бромистий етидил та інші. З'ясувалося, що мутанти карликовості (Pet^-) несуть делеції (втрати) мтДНК різної протяжності аж до повної відсутності мтДНК у клітинах.

Схрещуючи гаплоїдні клітини $Pet^- \times Pet^+$, отримують диплоїдів, здібних до дихання. За споруляції кожна така диплоїдна зигота утворює чотири спори, з яких проростає стільки ж нормальних щодо процесу дихання гаплоїдних форм. Отже, розщеплення за ознаками дихання і розміру колоній у випадку мітохондріальної локалізації мутацій не відбувається, або складає 4 Pet^+ : 0 Pet^- . Відсутність розщеплення свідчить про цитоплазматичну локалізацію мутації *pet*. Електронно-мікроскопічні дослідження підтвердили думку про належність зазначеної мутації до мтДНК.

Існують також мутанти Pet^- , що виникають за рахунок пошкодження ядерних генів. В цьому випадку за схрещування $Pet^- \times Pet^+$ на рівні гаплоїдних форм виявляється розщеплення у співвідношенні 2 Pet^+ : 2 Pet^- . Щоб відрізнити ядерних (генеративних) і мітохондріальних (вегетативних) мутантів карликовості, запропоновано їх різне позначення. Генотиповим символом ядерної мутації залишено запис *pet*, мітохондріальні мутації позначають як *rho*⁻ або *ρ*⁻.

Схрещуванням дріжджів $rho^- \times rho^+$ виявлено дивовижний факт. Замість характерного розщеплення в тетрадах $4 rho^+ : 0 rho^-$, що властиве мітохондріальній локалізації мутації, інколи виявляється розщеплення $4 rho^- : 0 rho^+$ (рис. 10.2). Отже, як і повинно бути, фактичного розщеплення в тетрадах немає, але фенотип гаплондних нащадків прямо протилежний теоретично очікуваному.

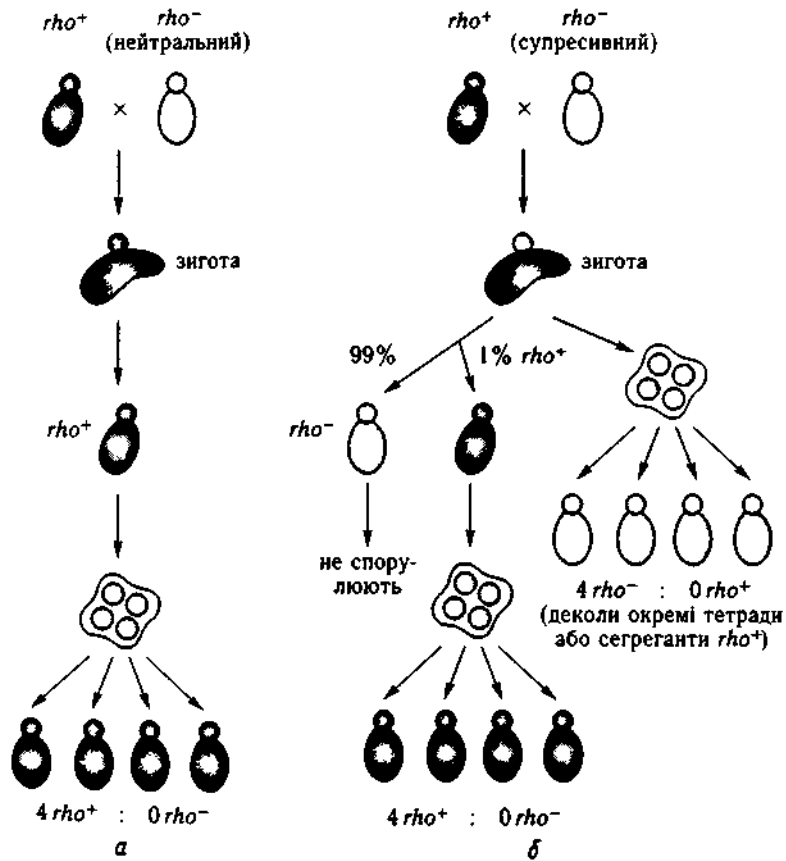


Рис 10.2 Успадковування ознаки Pet^- у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за схрещування $[rho^-] \times [rho^+]$

а — нейтральний rho^- -мутант, б — супресивний rho^- -мутант

Саме цей незвичайний фенотип стабільно успадковується як за вегетативного розмноження, так і за схрещування дріжджів

Це явище отримало назву **супресивності**. Виявилось, що у мутантів з високою супресивністю замість молекули мтДНК є лише невеликий її шматочок із сайтом початку реплікації. Така кільцева міні-ДНК реплікується значно швидше, ніж нормальна мтДНК, і швидко повністю витісняє останню за вегетативного поділу клітин. Цікаво, що *rho*-мутанти, які зовсім не мають мтДНК, не здатні до супресивності. Їх називають нейтральними *rho*⁻-мутантами або *rho*⁰-мутантами.

Крім *rho*-мутацій, у *S. cerevisiae* виявлено і ряд інших, пов'язаних з ДНК мітохондрій. Серед них — мутації резистентності до антибіотиків, які пригнічують біосинтез білка у бактерій (еритроміцин, хлорамфенікол), а також блокують процес дихання (олігоміцин).

Мутанти з порушенням дихання, а також з ознаками стійкості до лікарських препаратів виявлені не тільки у дріжджів. У грибка *Neurospora crassa* мутація *roky* (убогий, кволий), а також мутації *mi* призводять до дуже повільного росту міцелію. Останнє є наслідком порушення структури мітохондрій, їх дихального ланцюга, а також білкового синтезу. Успадковування ознаки *roky* здійснюється по материнській лінії. Це легко виявляється за реципрокних схрещувань нейроспори.

У *Paramecium aurelia* знайдено ряд мутантів, стійких до лікарських препаратів. Ці ознаки успадковуються разом з мітохондріями по материнській лінії. Резистентність клітин ссавців до антибактеріальних антибіотиків (хлорамфеніколу та інших) також визначається цитоплазматичними структурами. Внесення мітохондрій резистентних клітин у клітини, чутливі до антибіотиків, перетворює останні в більш стійкі форми клітин.

Важливо зазначити, що коли в клітині містяться генетично гетерогенні мітохондрії, чого можна досягти злиттям гаплоїдних мітохондріальних мутантів дріжджів, між молекулами ДНК мітохондрій можна виявити генетичну рекомбінацію.

За вивчення рекомбінації хондріомів слід враховувати, що в диплоїдній зиготі утворюється сукупність молекул мтДНК, які вступають у численні акти злучень і обмінів. За подальших мітотичних поділів зиготи дуже швидко настає розщеплення, так що диплоїдні вегетативні клітини утримують або один із батьківських типів мітохондрій, або рекомбінантний. За частотою виникнення рекомбінантних форм можна будувати генетичну карту мтДНК.

Ще більш ефективним виявився метод використання делеційних мутантів *rho*⁻. Для цього існують набори штамів дріжджів, що мають різну локалізацію *rho*-мутацій на карті. Схрещуючи досліджуваного мутанта із стандартними делеційними мутантами, можна визначити місце невідомої мутації на карті. Шляхом дослідження

частоти рекомбінацій між окремими мутантними мтДНК, методами використання делеційних мутантів, а також шляхом розрізання кільцевої мтДНК з допомогою рестриктаз і гібридизації фрагментів мтДНК і комплементарних їм РНК побудовано генетичні карти мтДНК людини, *S. cerevisiae* та інших об'єктів. В цих ДНК вже виявлено і локалізовано багато десятків генів (див. рис. 10.1).

10.1.3. Методи дослідження структури та функцій пластоми

Вперше явище цитоплазматичної спадковості, що, як з'ясувалося, пов'язане з пластидами, спостерігали ще в 1908 р. Е. Баур і К. Корренс. Цих вчених вважають засновниками вчення про цитоплазматичну спадковість.

К. Корренс вивчав передачу нащадкам особливого типу плямистості у рослині нічної красуні (*Mirabilis jalapa*). У цієї рослини на зеленому фоні листа виділяються світлозелені або білі плями — ділянки тканини, що не мають пластид, або мають дефектні безхлорофільні пластиди (рис. 10.3). Іноколи ці відхилення від норми охоплюють весь лист або цілу гілку. Такий тип плямистості (**строкатолистість**) відомий більш ніж у двадцяти родів рослин. Серед них — кукурудза, рис та ін.

Ознака строкатолистості залежить від одночасної наявності в клітинах тканин не тільки зелених, але й незабарвлених (безхлорофільних) пластид. Ця чисто плазмогенна ознака істотно залежить від ядерних генів — так званих мутаторів пластид. Один із них — рецесивний ген *pm* (від англ. *plastid mutator*) кодує ушкоджену субодиницю пластидної ДНК-полімерази. У гомозигот *pm pm* пластиди утримують дефектну ДНК і, як наслідок, дефектні білки фотосинтезу. Поява безхлорофільних хлоропластів є причиною строкатолистості.

Якщо за материнську форму нічної красуні взяти квітки з незабарвлених безхлорофільних гілок і опилити їх пилком зеленої рослини, то в F_1 появляються лише безхлорофільні форми — альбіноси, які досить швидко гинуть. За реципрокного схрещування всі рослини покоління F_1 виявляються зеленими. У випадку опилення квіток строкатолистої гілки пилком зеленої можна отримати строкатолистих, зелених і безхлорофільних



Рис. 10.3. Мозаїчний лист рослини *Mirabilis jalapa* (за К. Корренсом)

нащадків, а за реципрокного схрещування — лише зелених. Отже, в наведеному прикладі характер успадкованої ознаки визначається походженням яйцеклітин; звідки брався пилок — не мало значення. Саме так і буває за **материнського типу успадковування**.

Протилежний тип успадковування — **батьківський** — спостерігається у кіпрею: ознака строкатолистості у цієї рослини передається з пилом і успадковується по чоловічій лінії.

Близький до батьківського тип успадковування спостерігається у **герані**: якщо квітки строкатолистої рослини опилити пилом зеленої, то лише 30% рослин-нащадків будуть строкатолистими, а 70% — зеленими. За реципрокного схрещування (зелені × строкатолисті) 70% гібридів будуть строкатолистими, тобто будуть мати ознаку батька. В цьому випадку пластиди попадають у зиготу головним чином від батьківської форми, проте частково і від материнської. Такий тип успадковування називають **змішаним**.

Основні закономірності пластидного успадковування з'ясовано на одноклітинній зеленій водорості *Chlamidomonas*. Ця водорість має, як правило, одне гаплоїдне ядро, один хлоропласт і біля 20 мітохондрій. Життєвий цикл хламідомонади складається із послідовної зміни безстатевого і статевого розмноження. В останньому випадку зливаються ізогамети протилежних типів (mt^+ , mt^-). У зиготі об'єднуються гаплоїдні ядра і два хлоропласти батьків. Після цього настає мейоз, що веде до розщеплення ядерних алельних генів у співвідношенні 2:2. Однак гени, що належать ДНК хлоропластів, цьому правилу не підлягають.

Мутантів хламідомонади, що слугують об'єктами для вивчення хлоропластних генів, поділяють на три групи:

1) такі, що не здатні до фотосинтезу і потребують для свого розвитку ацетату (джерело вуглецю);

2) такі, що виявляють підвищену чутливість до високої або низької температури;

3) такі, що нечутливі до дії антибіотиків або ї потребують їх для нормального розвитку.

Ці мутації материнська форма mt^+ передає всім нащадкам. Це пояснюється особливостями біогенезу хлоропласта зигот. Як правило, в зиготі зберігається тільки хлоропластна ДНК материнської форми mt^+ . Однак іноді (приблизно в 1% випадків) в зиготі зберігається пластидна ДНК як однієї (mt^+), так і іншої (mt^-) батьківської форми. В цьому випадку утворюються гетерозиготні по генах хлоропласта зооспори. Такі цитоплазматичні гетерозиготи називають **цитогетами**. За мітотичного поділу зооспор хламідомонади хлоропластні гени у цитогет розщеплюються у такий спосіб, що врешті решт виходять у гомозиготу. При цьому на стадії чотирьох хромомем мож-

лива реципрокна рекомбінація на ділянці ген-центромера. Може здійснюватись також конверсія та коконверсія генів (розділ 12.1).

Наявність цитогет і мітотичного кросинговеру у них використовують для побудови генетичних карт пластидної ДНК. Гени картують за частотою мітотичного кросинговеру а) між досліджуваним геном і центромерою, б) між двома досліджуваними генами, а також в) за частотою коконверсії генів.

У вивченні генетики пластид дуже допомагають сучасні методи культивування і штучного зливання клітин.

10.1.4. Ознаки, що контролюються генами і цитоплазми, і хромосом

Прикладом ознаки, що визначається як ядерними, так і цитоплазматичними генами, є так звана **чоловіча стерильність**. За останньої у рослин не утворюється пилок або він не здатний до запліднення. Це явище може залежати від одного із рецесивних генів хромосом, однак відома і так звана цитоплазматична чоловіча стерильність, що успадковується лише по материнській лінії. Починаючи з досліджень М. Родса і М. І. Хаджінова в 1930—1932 рр., материнське успадкування чоловічої стерильності виявлено майже у сотні видів покритонасінних рослин. Найбільш детально генетика **цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС)** з'ясована у льону і кукурудзи, у яких це явище використовують у сільському господарстві з метою отримання гібридного насіння.

У кукурудзи відомо декілька типів ЦЧС, наприклад, **техаський (Т-тип)** і **молдавський (S-тип)**. За техаського типу повністю стерильні пиляки не виступають назовні, чим Т-тип стерильності відрізняється від S-типу. Крім того, істотна різниця існує у взаємодії цитоплазматичних факторів стерильності з хромосомними **генами-відновниками** та **закріплювачами** фертильності. Відомо, що у рослин з цитоплазмою техаського типу стерильності фертильність у рослин можуть відновити два гени хромосоми 2, а також деякі гени інших хромосом. Якщо стерильну цитоплазму позначати як Cyt^s , доміантний алель ядерного гена-відновника фертильності як Rf , а рецесивний алель цього гена як rf , то ознака ЦЧС виявляється лише у рослин $rf\ rf\ Cyt^s$. Отже, ЦЧС виявляється тоді, коли стерильна цитоплазма поєднується з гомозиготністю рецесивного ядерного гена rf . За інших умов (наявність нормальної цитоплазми — Cyt^N , або доміантного гена-відновника — Rf) рослини будуть фертильними. Таким чином, рослини $Rf\ Rf\ Cyt^s$, $Rf\ rf\ Cyt^s$, $rf\ rf\ Cyt^N$, $Rf\ rf\ Cyt^N$ утворюють нормальні пиляки і пилкові зерна.

За багаторазових схрещувань $rf\ rf\ Cyt^s \times rf\ rf\ Cyt^N$ всі нащадки будуть стерильними, а у випадку $rf\ rf\ Cyt^s \times Rf\ Rf\ Cyt^N$ можна отримати гібридів з нормальним пилком, незважаючи на наявність у них стерильної цитоплазми Cyt^s .

Слід підкреслити, що ген Rf (як і інші гени-відновники фертильності) не змінює властивостей Cyt^s , а лише нівелює їх вияв. Саме тому за відсутності цього доміантного гена ознака ЦЧС зберігається у численних поколіннях, передаючись по материнській лінії. Навіть тоді, коли всі 10 пар хромосом таких стерильних рослин кукурудзи замінити хромосомами фертильних рослин, за відсутності гена Rf ознака ЦЧС зберігається.

Явище відновлення фертильності пилку з допомогою гена Rf широко використовується в сільському господарстві з метою отримання гетерозисних **подвійних міжлінійних гібридів** кукурудзи, чого можна досягти лише перехресним запиленням ліній. Останні за генами Rf підбирають таким чином, щоб одні батьківські форми були фертильними, а інші — стерильними. За певних напрямків схрещування утворюються гібриди двох пар різних ліній рослин, один з яких стерильний, а другий фертильний:

- 1) $rf\ rf\ Cyt^s \times rf\ rf\ Cyt^N \rightarrow rf\ rf\ Cyt^s$ (стерильний);
- 2) $rf\ rf\ Cyt^s \times Rf\ Rf\ Cyt^N \rightarrow Rf\ rf\ Cyt^s$ (фертильний).

Схрещуючи цих гібридів у наступному році, отримують подвійних міжлінійних гібридів з явищем гетерозису:

- 3) $rf\ rf\ Cyt^s \times Rf\ rf\ Cyt^s \rightarrow Rf\ rf\ Cyt^s$ (фертильний) + $rf\ rf\ Cyt^s$ (стерильний).

Практичне використання явища ЦЧС дуже вигідне, бо з його допомогою можна уникнути трудомкого процесу — штучного вилучення чоловічих суцвіть у однієї із батьківських форм.

Причина Т-типу ЦЧС в останні роки з'ясована. Оскільки рослини з Т-типом цитоплазми дуже чутливі до патогену, який продукується паразитом *Helminthosporium maydis*, то це спонукало до інтенсивного дослідження мітохондріальної ДНК рослин з Т-типом ЦЧС. З'ясувалося, що суттєвою відмінністю хондріому таких рослин від геному нормальної кукурудзи є наявність у мутантів особливого гена $T-urf13$. Цей ген кодує поліпептид з м. м. 13 кДа. Він здатний вбудовуватись у внутрішню мембрану мітохондрій і блокувати дихання, що призводить до дисфункції пиляків і стерильності пилку. Ген $T-urf13$ є химерним, — він складається із кусків двох різних мітохондріальних генів. Підраховано, що для виникнення такого химерного гена необхідна семикратна перебудова хондріому.

В загальних рисах з'ясовані також молекулярні механізми відновлення фертильності у рослин під впливом генів-відновників ($Rf1$, $Rf2$, $F2$ тощо). Останні можуть призводити до вилучення із

хондріому химерних генів, провокуючих ЦЧС (фасоля), змінювати розміри (кукурудза) і кількість (соняшник) транскриптів цих генів, впливати на ефективність їх транскрипції, способи редагування транскриптів, на структуру і функцію окремих білків. Так, наприклад, у рису химерний ген *atp6* кодує іРНК довжиною 2,0 кб. Під впливом ядерного гена *Rf1* ця РНК модифікується до розміру 1,5 кб, а потім ще редагується, внаслідок чого транслюється нормальний поліпептид — шоста одиниця АТРази, властива фертильним рослинам. У відсутність гена-відновника іРНК з химерного гена не процесується і не редагується. Як результат, синтезується декілька дефектних поліпептидів, які і обумовлюють фенотип ЦЧС.

10.2. Інфекційні агенти і позахромосомні елементи клітин

Гени багатьох симбіонтів і інфекційних агентів, що знаходяться в клітинах еукаріотів, виявляють властивості плазмогенів. Вони визначають деякі фенотипові ознаки і успадковуються через цитоплазму за материнським типом.

Перший приклад такого явища був наведений у 1938 р. Т. Соннеборном, який у *Paramecium aurelia* знайшов особливі цитоплазматичні агенти («капа-частки»), що успадковуються разом із цитоплазмою. Як з'ясувалося пізніше, ці капа-частки наділені власною лінійною ДНК і являють собою бактерії *Caedobacter taemospuralis*. Ці бактерії-симбіонти не мають аналогів серед бактерій, що живуть вільно. Парамеції, що живуть у симбіозі з цими бактеріями, виділяють у навколишнє середовище парамецин — токсичний білок, що вбиває чутливих особин інших штамів. За таку здібність штами парамецій з капа-частками отримали назву «вбивці». Самі вони нечутливі до дії парамецину завдяки наявності у них трьох домінантних генів — K , S_1 , S_2 . Чутливі форми мають хоча б один рецесивний алель у гомозиготному стані. Зазначені ядерні гени проявляють свою дію в залежності від властивостей цитоплазми.

Окрім капа-часток, у інфузорій відомі й інші симбіонти — гама, сигма тощо. Деякі з них мешкають не тільки в цитоплазмі, але й у макро- чи мікронуклеусі.

У *D. melanogaster* є лінії, що складаються лише із самиць. З'ясувалося, що ці самиці заражені спірохетами, здатними вбивати самців на стадії ембріонального розвитку. Відомі також лінії мух, що надто чутливі до CO_2 і гинуть у його атмосфері через секунди.

Якщо хромосоми мух такої чутливої лінії замінити хромосомами нормальної лінії, нищівна дія вуглекислоти на цих мух не зникає. Фактор сигма, який є причиною цього явища, виявився вірусом, дуже близьким до вірусу везикулярного стоматиту, що є збудником псевдоящура у коней та корів. У мух він передається головним чином через цитоплазму яйцеклітин, отже успадковується за материнським типом. У дрозофіли виявлено ще декілька типів РНК-вірусів, що живуть в організмі мухи як симбіонти і теж успадковуються з цитоплазмою. Дуже часто наявність інфекційних агентів у цитоплазмі підвищує її мутабельність.

Слід підкреслити, що явище ендосимбіотизму в природі, особливо у *Protozoa*, дуже поширене. Відомі випадки, коли ні ядро, ні цитоплазма амеби не могли нормально функціонувати без ендосимбіонта (бактерії), що ще недавно був патогенним. Наведені факти слугують на користь теорії симбіогенетичного походження еукаріотної клітини.

Крім інфекційних агентів, у про- і еукаріотів відомі і власні позахромосомні елементи. Як уже зазначалось, у бактерій, крім основної кільцевої ДНК, яку називають хромосомою, є багато менших за розміром кільцевих молекул — плазмід. Майже всі типи плазмід за кон'югації бактерій легко поширюються серед них, чим пояснюється зміна статевої належності, поява стійкості до антибіотиків та інших ознак у клітин-реципієнтів. Характер успадкування генів плазмід дуже нагадує успадкування плазмогенів у еукаріотів.

Існує думка, що віруси і плазмиди — це видозмінені фрагменти хромосом, які в процесі еволюції отримали здатність до автономного існування. Це дуже уподібнює їх позахромосомним елементам еукаріотів, серед яких — копії деяких генів та їх фрагментів, що існують у вигляді кільцевих молекул ДНК поза хромосомами. Одним із шляхів їх виникнення є зворотна транскрипція (розд. 6.1.7).

Утворення ДНК-копій на матриці РНК шляхом зворотної транскрипції властиве не тільки ретровірусам, але й неінфікованим клітинам еукаріотів. Множинні дисперговані гени (*mdg*) дрозофіли, відкриті Д. Хогнесом, Г. П. Георгієвим та В. А. Гвоздьовим, називають **ретротранспозонами**, бо одним із способів їх переміщення в геномі є синтез на них РНК, а на останній з допомогою зворотної транскриптази — ДНК-копії, яка і вбудовується в нове місце геному.

Деякі позахромосомні елементи еукаріотів являють собою копії хромосомних генів, що виникають внаслідок їх множення (ампліфікації) і наступного вилучення копій із хромосом. Найчастіше — це гени рРНК, потреба у яких на деяких стадіях розвитку дуже велика.

У зв'язку з тим, що плазмідні бактерій, деякі інші нехромосомні елементи, а також віруси можуть у складі своїх ДНК переносити гени клітини-хазяїна в інші клітини, існує гіпотеза про так званий **горизонтальний перенос генів** між особинами одного виду або навіть різних видів.

Ендосимбіонти, інфекційні агенти та позахромосомні елементи можуть передаватись у дочірні клітини за мітотичних та мейотичних поділів, за кон'югації, копуляції, трансдукції, трансформації та інших біологічних процесів.

10.3. Предетермінація цитоплазми або материнський ефект

Як уже зазначалося, вплив цитоплазми на ознаки нащадків виявляється і тоді, коли цитоплазма яйцеклітини зазнає тимчасових (інколи досить стійких) змін під впливом генотипу матері. Ці зміни властивостей цитоплазми можуть істотно впливати на фенотип самого яйця, зиготи або ембріона, а інколи відбиваються на всіх стадіях розвитку організму і навіть його найближчих нащадків. Оскільки властивості цитоплазми яйця формуються під впливом ядерних генів матері, то фенотипи нащадків на ранніх стадіях їх розвитку, а іноді і пізніше уподібнюються фенотипу матері (**материнський ефект**).

*Явище перебудови властивостей цитоплазми яйця (а отже і зиготи) під впливом ядерних генів матері називається **генетичною предетермінацією цитоплазми**.*

Спостерігається також перебудова властивостей цитоплазми, яка провокується дією факторів зовнішнього середовища, наприклад, високою температурою. А. Кюн, автор терміну «предетермінація», в досліджах на їздцях *Habrobracon juglandis* показав, що дія підвищеної температури на незапліднені яйця призводить до змін у забарвленні тіла майбутніх нащадків. Ці зміни поступово слабшають з кожним поколінням і врешті решт зникають за розмноження хабробракона в нормальних умовах. Цікаво, що за прогрівання сперматозоїдів ніяких змін у забарвленні тіла майбутніх їздців не виникає. В даному прикладі перебудова (предетермінація) цитоплазми відбувається не як правило, а лише за певних умов навколишнього середовища.

Якщо визвана зовнішніми умовами предетермінація цитоплазми призводить до досить тривалих змін фенотипу, які зберігаються

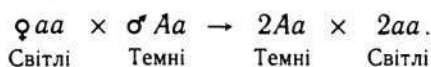
іноді протягом кількох поколінь, то зазначені зміни називають **тривалими модифікаціями**.

В протилежність модифікаційній, генетична предетермінація цитоплазми не визначається умовами середовища — вона є обов'язковою для нормального індивідуального розвитку. Справа в тому, що в період дозрівання яйця в його цитоплазмі накопичуються продукти хромосомних генів матері — деякі іРНК у складі інформосом, рРНК, готові білки, іноді пігменти та ін. Всі ці генні продукти використовуються після запліднення для розвитку майбутнього організму.

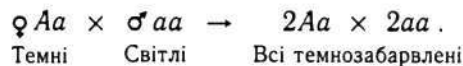
Відомо, що найперші етапи дробління зиготи та інші в ній перетворення здійснюються тоді, коли обидва геноми — і материнський, і батьківський — ще заблоковані (розділ 14). Інформаційна РНК та деякі речовини, що необхідні на цій ранній стадії розвитку, накопичуються ще в незаплідненому яйці і разом з його цитоплазмою попадають у зиготу. Саме тому найперші стадії розвитку супроводжуються проявом материнського ефекту. Ще Т. Бовері та інші дослідники, вивчаючи розвиток безхребетних, звернули увагу на те, що тип дробління зиготи завжди співпадає з типом, характерним для материнського організму, навіть тоді, коли ядро клітини вилучено.

За предетермінації цитоплазми результати реципрокних схрещувань не співпадають.

У мучної молі *Ephestia kuhniella* знайдено мутанта з відсутністю пігмента, що забарвлює тіло, очі і інші органи у личинок і дорослих особин. Схрещування незабарвлених самок цього генотипу (*aa*) з гетерозиготними нормально забарвленими самцями (*Aa*) дає нормальне розщеплення 1:1:



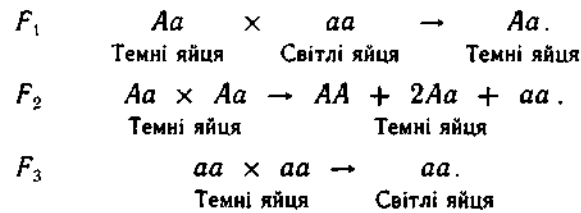
Однак у реципрокному схрещуванні (мати темнозабарвлена, самці світлі) всі личинки виявляються темними незалежно від їх генотипу:



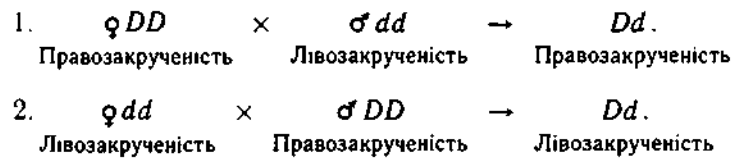
Причина цього полягає в тому, що в яйцеклітинах самки *Aa* накопичується кінуренін — попередник пігменту, який і забарвлює клітини, що утворюються із зиготи. Слід підкреслити, що генотипи *Aa* в подальшому продукують свій власний кінуренін і тому личинки цього генотипу залишаються темними, а метелики, що з них розвиваються, темні і чорноокі. В протилежність цьому, генотипи *aa*

нездатні до власного синтезу і використовують лише готовий кінуренін, що надійшов до зиготи з яйцеклітиною. Тому в цьому випадку материнський ефект поступово затухає в онтогенезі: личинки *aa* поступово світлішають і з них виникають червоноокі метелики.

Схожу ситуацію можна спостерігати на прикладі тутового шовкопряда. В цьому випадку материнський ефект щодо забарвлення яєць зникає лише у третьому поколінні:



Дуже яскравим прикладом материнського ефекту, що також затухає протягом декількох поколінь, є успадковування напрямку завитків черепашок у ставника (*Limnaea*). Цей прісноводний молюск є гермафродитом і може розмножуватись як самозаплідненням, так і шляхом схрещувань. Є два типи закручення черепашки — ліве і праве. Правозакрученість (*D*) домінує над лівозакрученістю (*d*). Гетерозиготи з цих ядерних генів (*Dd*) не завжди мають однаковий фенотип, бо на прояв алельних генів — *D* або *d* — визначальний вплив має цитоплазма зиготи, отримана від материнської форми:



Самозапліднення отриманих гетерозигот *Dd* як з правими, так і з лівими завитками дає в обох випадках однакове за фенотипом покоління — всі молюски в F_2 матимуть правозакручені черепашки (домінує ген *D*). І тільки в F_3 , також отриманому шляхом самозапліднення, розщеплення за ознаками *D* і *d* складає 3:1 (рис. 10.4). Отже, просте менделівське розщеплення цієї пари ознак виявляється не в F_2 , а в F_3 . Це пояснюється тим, що напрямок закручення черепашки *Limnaea* залежить від властивостей цитоплазми яйцеклітини, яка визначає напрямок веретена дробління зиготи.

Розглянуті приклади предетермінації цитоплазми не відносяться безпосередньо до явища цитоплазматичної спадковості, бо властивості цитоплазми в цих випадках детерміновані генами ядра, а не цитоплазми. В протилежність материнському типу

успадковування, за якого та чи інша ознака передається всім поколінням по материнській лінії, за предетермінації цитоплазми виявляється лише тимчасовий материнський ефект.

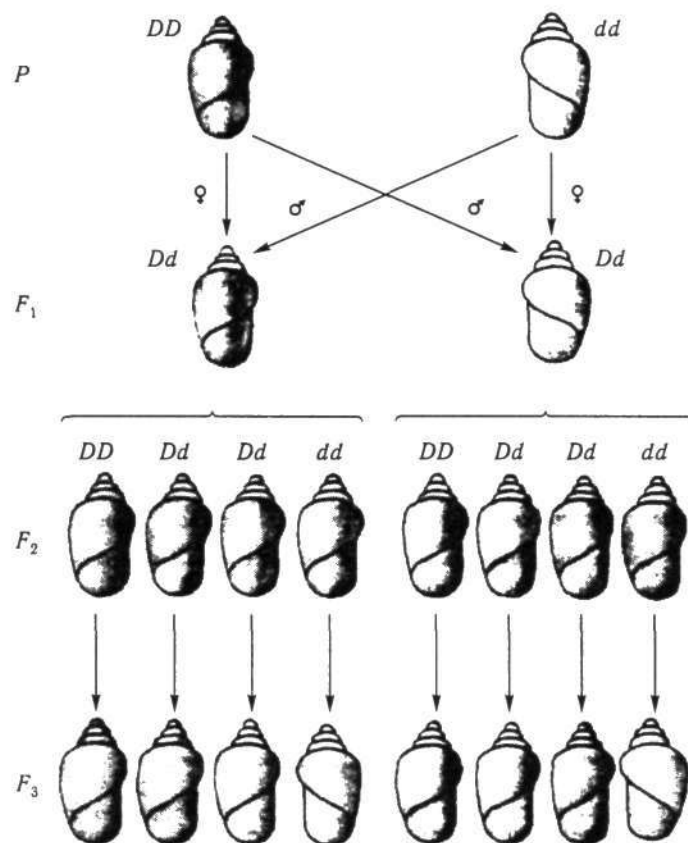


Рис. 10.4. Успадковування напрямку закручення черепашки у ставника великого

Явище генетичної предетермінації цитоплазми іноді призводить до того, що не кожен генотип може бути біологічно сумісним з даною цитоплазмою. Цей факт легко виявляється за деяких міжлінійних і особливо міжвидових схрещувань. Така несумісність предетермінованої цитоплазми і генів гібридного ядра називається гібридним дисгенезом (розділ 11.5).

Частина IV

**ГЕНЕТИЧНІ ЗАСАДИ
МІНЛИВОСТІ**



ТИПИ МІНЛИВОСТІ. МОДИФІКАЦІЇ І МУТАЦІЇ

Мінливість організмів можна розглядати як результат реакції генотипу на умови зовнішнього середовища. Властивість живої природи змінюватись є однією із передумов і одним із факторів еволюційного процесу, так само як спадковість і природний добір. Саме мінливість слугує джерелом нових форм генотипів і фенотипів для природного і штучного добору. Тому з'ясування причин і механізмів мінливості є і буде найважливішим розділом сучасної генетики.

11.1. Класифікація мінливості

Фенотипова мінливість організмів складається із **спадкової** і **неспадкової**. До спадкової відносять таку мінливість, в основі якої лежать зміни генетичного матеріалу, що передається нащадкам. В протилежність цьому, неспадкова мінливість не пов'язана з істотними змінами генотипу, а є лише виявом його здатності реагувати на умови зовнішнього середовища в межах так званої **норми реакції**. Отже, *за спадкової мінливості зміни фенотипу є наслідком змін генотипу, а за неспадкової мінливості змінюється лише фенотип*. Тому неспадкова мінливість, яку ще називають **модифікаційною**, не передається наступним поколінням.

Спадкову мінливість поділяють на комбінаційну і мутаційну. **Комбінаційна** є наслідком двох добре відомих явищ: 1) незалежного розподілу хромосом у мейозі і випадкового поєднання їх у зиготі, що створює розмаїття гібридних форм; 2) процесів генетичної рекомбінації, за яких у хромосомах утворюються нові комбінації алельних генів вихідних батьківських форм. За даного типу мінливості структура хромосом і дискретних одиниць спадковості — генів — не змінюється, варіюють лише комбінації генів та взаємодія останніх у геномі. Тому комбінаційну мінливість розглядають як вторинне явище, а первинними вважають мутаційні процеси.

Мутаційна мінливість — це результат виникнення нових алелей генів і навіть більш істотних перебудов у генетичному апараті клітин. Ці перебудови можуть здійснюватися на рівні хромосом та інших носіїв генетичної інформації. В усіх випадках вони мусять бути незворотними і передаватись із покоління у покоління. Саме такі особливості властиві **мутаціям** — відносно стійким структурним змінам генетичних нуклеїнових кислот, що призводять до появи нових генотипів і фенотипів.

Розрізняють також так звану **онтогенетичну мінливість**, що властива одному і тому ж організмові на різних стадіях його онтогенетичного розвитку. Фактично це реалізація генетичної програми розвитку, тобто реалізація норми реакції даного генотипу в часі. За цим критерієм онтогенетична мінливість відноситься до неспадкової. Однак є безперечні докази того, що за індивідуального розвитку можливі деякі незворотні зміни генетичного матеріалу.

11.2. Модифікаційна мінливість

Нездатність модифікаційної мінливості успадковуватись була з'ясована не відразу. Еволюційна теорія Ж. Б. Ламарка (1744—1829) ґрунтувалася на помилковому припущенні, згідно з яким зміни, що набуваються в процесі життя, успадковуються. Можливість успадкування набутих ознак допускав також Ч. Дарвін (1809—1882). Він поділяв мінливість на **визначену** і **невизначену**, що приблизно співпадає із сучасним поділом мінливості на неспадкову і спадкову, однак вважав, що і та, і інша може підлягати природному добору.

Одним із перших дослідників, хто спеціально досліджував **модифікаційну мінливість** або **модифікації**, був К. Негелі (1865). Він показав, що альпійські форми рослин можуть змінитися до невпізнанності, якщо їх пересадити на родючі ґрунти і створити найкращі умови для росту і розвитку (умови ботсаду). Якщо ж ці рослини знову перенести на бідні кам'яні ґрунти високогір'я, до них повертається їх первісний зовнішній вигляд. Ці чіткі результати, однак, не змінили поглядів автора на проблему, — К. Негелі, як і деякі інші дослідники, залишався прибічником помилкової теорії Ж. Б. Ламарка.

Непримиренним супротивником ламаркізму був А. Вейсман (1833—1914), який заявив, що фенотипові зміни в соматичних клітинах не можуть впливати на властивості клітин генеративного зародкового ряду і, врешті, гамет.

Чіткі експериментальні докази неспадковості модифікацій були отримані В. Йогансеном і опубліковані ним у роботі «Про успадкування в популяціях і в чистих лініях». Він показав, що добір у гомозиготних чистих лініях, у яких різноманітність фенотипів пояснюється модифікаційною мінливістю, не дає результату до тих пір, поки у особин не виникнуть мутаційні зміни. Отже, модифікації, за В. Йогансеном, не успадковуються.

Неможливість успадкування модифікацій у подальшому була підтверджена численними дослідями інших авторів і врешті цей постулат набув сили закону. В наші дні закон неможливості успадкування змін, набутих в онтогенезі, знайшов підтвердження у вигляді центральної догми молекулярної біології, згідно з якою інформація може передаватися від нуклеїнових кислот до білків, але не в зворотному напрямку:



Таким чином, модифікації не успадковуються, а якщо інколи і передаються найближчим поколінням, то це не результат успадкування відповідних нових генетичних детермінантів, а наслідок інших причин, наприклад тривалої предетермінації цитоплазми під впливом факторів зовнішнього середовища.

Слід, однак, застерегтись від думки, що генетичний апарат клітини не має ніякого відношення до модифікацій, бо модифікаційна мінливість здійснюється в межах норми реакції, а остання визначається генотипом.

Залежно від генотипу досліджуваних об'єктів можна спостерігати різноманітні, інколи навіть разючі приклади модифікацій. Серед них — визначення статі деяких нижчих тварин після запліднення, як це відбувається у морського черв'яка *Bonellia viridis*. Навіть у хребетних, наприклад у деяких риб, можна змінити стать за допомогою гормонів. Добре відомі модифікаційні зміни підводних і надводних листків у водних рослин, наприклад у водяного жовтеця (*Batrachium*), стрілолиста (*Sagittaria*) та ін. У сіамських котят, що утримуються в холодному приміщенні, формується більш темне забарвлення шерсті, ніж у теплих умовах.

Ці та інші приклади модифікацій свідчать про те, що розглядати модифікації відірвано від особливостей генотипу не можна.

Слід зазначити, що переважна більшість модифікацій, які виникають у межах норми реакції генотипу, є адаптивними, тобто сприяють виживанню даного організму за конкретних умов середовища. Більш ефективно виживання особин, в свою чергу, сприяє збереженню популяції і виду. Тому адаптивні модифікації грають важли-

ву роль у процесах еволюції, хоча ця роль у порівнянні із спадковою мінливістю значно менша.

Існують адаптивні модифікації, які є майже універсальними, тобто вони властиві якщо не всім, то принаймні багатьом представникам живої природи. Прикладом таких адаптивних модифікацій може бути реакція клітин на дію опромінення або хімічних мутагенів, які за певних умов індукують систему SOS-репарації. Як вже зазначалося (розділ 5), у цьому випадку підсилюється функція генів ексцизійної та рекомбінаційної репарації і, крім того, додатково включаються деякі гени, що обумовлюють репарацію з помилками. Таким чином, ця захисна реакція формується в межах можливостей генотипу (в межах норми реакції) і може розцінюватись як модифікація.

Ще один приклад універсального механізму адаптивних модифікацій — це синдром теплового шоку, який розвивається у тварин і рослин у відповідь на вплив високої температури.

Було встановлено, що за короткочасного теплового шоку (37 °С) в гіганських хромосомах дрозофіли виявляється специфічний набір пуфів (від 5 до 10, залежно від виду мух). Ці пуфи появляються вже в першу хвилину після дії на личинок високої температури, а також інших стресових агентів. За цих умов у клітинах синтезуються нові (шокові) білки, яких не було до стресу, а синтез традиційних білків пригнічується. Загальний вміст шокових білків може скласти до 10% усього білка клітини.

Шокові білки виявляють високу спорідненість до еухроматинових областей хромосом і, як вважають, захищають клітину від ушкоджуючої дії стресового чинника. За штучно подавленого синтезу цих білків клітина після теплового шоку не може поновити синтез нормальних білків або цей процес дуже уповільнюється. Механізм захисної дії шокових білків трактується неоднозначно, але безперечним є те, що «синдром теплового шоку» — це ще один універсальний генетичний механізм неспецифічної адаптивної модифікації. Суть його полягає в чітко регульованих процесах репресії одних і індукції інших генів. *Регулювання генної експресії в самих широких межах — один із найважливіших (але не єдиний) механізм формування норми реакції і виникнення адаптивних модифікацій, характерних для даного генотипу.*

Слід зазначити, що адаптивні модифікації — це реакція клітин і організму на зміни умов середовища, які неодноразово діяли на організми в процесі еволюції. Однак, деякі діючі фактори середовища можуть бути зовсім новими з еволюційної точки зору, або за силою біологічного впливу виходити за межі захисних можливостей норми реакції. Останнє особливо часто трапляється, коли ушкод-

жуючий агент діє в так звані **критичні періоди** індивідуального розвитку — в цей час чутливість клітин до деяких впливів різко зростає. Часто за цих умов спостерігаються випадкові за своїм проявом і досить глибокі фенотипові зміни, що не мають адаптивного значення і не успадковуються. Такі зміни називають **морфозами**.

Відомі морфози у рослин, що виникають внаслідок недостатчі або надлишку в ґрунті мікроелементів. Найчастіше морфози проявляються у вигляді тих чи інших виродливостей, які інколи повністю імітують морфологічні мутації, але, в протилежність останнім, не успадковуються. *Морфози, що нагадують фенотипові прояви відомих мутацій, називаються фенокопіями* цих мутацій.

В 30—40-х роках І. А. Рапопорт, вивчаючи вплив на дрозофілу різних хімічних сполук, встановив, що чимало хімічних агентів визивають характерні для них морфози: сполуки ртуті, наприклад, призводять до фенокопії *minute* (тонкі щетинки), сполуки сурми — *brown* (брунатні очі), сполуки срібла — *yellow* (жовте тіло) і т. п. При цьому за дії хіміопрепарату на певній стадії індивідуального розвитку деякі морфози індукувалися з дуже високою частотою. Вираженість морфозів зростає із збільшенням дози діючої сполуки. Це дозволяє диференціювати морфози і мутації, бо сила прояву мутантного гена ніколи не залежить від концентрації мутагена, яким ця мутація визвана.

Крім морфозів, що виражаються відхиленням від стандартного фенотипу, можливі і **фенокопії норми** у мутантних ліній. У цьому випадку серед мутантних генотипів можуть появитися цілком нормальні за фенотипом особини без реверсії ушкодженого гена до дикого типу.

Явище **фенокопіювання норми** або **фенотипової супресії** зручно вивчати на мікроорганізмах. Досліди показали, що в основі фенотипової супресії лежать молекулярні механізми, які призводять до помилкової трансляції. В окремих випадках це виявляється вигідним для клітин, що утримують, наприклад, нонсенс-мутації, наявність яких блокує трансляцію і тому не сумісна з нормальною функцією. С. Бензер і С. Чеймп знайшли, що серед амбер-мутантів *rII* фага T4 за наявності в середовищі 5-фторурацилу виникають форми, здатні до лізису клітин *E. coli* K (λ), тобто такі, що імітують дикий генотип. З'ясувалося, що 5-фторурацил в іРНК замінює урацил, і в цьому випадку можуть утворюватися комплементарні пари з гуаніном, а не з аденіном. Це призводить до нових варіантів кодон-антикодонних взаємодій і до відновлення трансляції, яка хоч і здійснюється з помилками, все ж приводить інколи до нормалізації фенотипів мутантів *rII*.

Подібну фенотипову супресію нонсенс-алелей у бактерій викликають аміноглікозидні антибіотики, наприклад, стрептоміцин. У цьому випадку антибіотик взаємодіє з рибосомою, що теж призводить до відновлення трансляції за рахунок неточного зчитування генетичного коду.

З'ясовано, що у дріжджів фенотипова супресія мутацій-нонсенсів здійснюється і за таких звичайних умов, як зниження температури з 30 до 20 °С або заміна глюкози на гліцерин, етанол або галактозу (С. Г. Інге-Вечтомов). Таким чином, помилки трансляції, що підсилюються деякими зовнішніми впливами, властиві як прокаріотам, так і еукаріотам, і можуть бути причиною фенокопій норми.

Інший можливий механізм модифікацій — так званий **передмутаційний стан ДНК**, тобто наявність у ній тимчасових неспадкових змін, що усуваються системами репарації. Перш, ніж ці порушення будуть усунені, вони можуть проявитися, особливо в критичні періоди онтогенезу, і стати причиною модифікацій типу морфозів та інших аномалій розвитку.

В більшості випадків модифікації є нестійкими і зникають, як тільки перестає діяти провокуючий їх агент. Однак морфози і фенокопії, що виникають у критичні стадії онтогенезу, наприклад, під час закладки певних органів та тканин, можуть зберігатися протягом всього життя особини.

Крім вже зазначених типів неспадкової мінливості, відомо декілька прикладів так званих **тривалих модифікацій**. У цьому випадку неспадкові фенотипові зміни, що виникають за певних умов у популяціях клітин або навіть багатоклітинних організмів, зберігаються протягом декількох поколінь, але за відсутності провокуючих факторів середовища поступово затухають і нарешті зникають зовсім. Відомо, що попередня дія на парамецій токсикантів у незначних концентраціях підвищує стійкість цих інфузорій до наступних впливів тих же отрут. Індукована стійкість не передається нащадкам за статевого розмноження (кон'югації) парамецій, але зберігається за численних вегетативних поділів. Інтимні механізми тривалих модифікацій ще не з'ясовані. Їх пов'язують з так званим **епігенетичним успадкуванням**, тобто з успадкуванням певних механізмів регуляції функцій геному та з явищем предетермінації цитоплазми під впливом умов середовища.

Слід зазначити, що знання генетичних основ модифікаційної мінливості вкрай необхідне не тільки для подальшого розвитку еволюційної теорії, але й для практики сільського господарства і медицини. Норму реакції організму, межі його модифікаційної мінливості слід враховувати за створення нових форм рослин, тварин

і мікроорганізмів, потрібних людині. Не менш важливо знати норму реакції і самої людини на нові засоби лікування та профілактики. На жаль, у деталях генетика модифікацій ще не з'ясована.

11.3. Мутаційна мінливість

Біологічна еволюція може здійснюватися завдяки тому, що матеріальний носій спадковості — генетична нуклеїнова кислота — може змінюватися від покоління до покоління. Передача ознак від батьків до нащадків — процес загалом консервативний, але ця консервативність не абсолютна. Іноколи трапляються помилки у функціонуванні систем реплікації, репарації, рекомбінації та інших, внаслідок чого кількість ДНК у дочірній клітині чи послідовність нуклеотидів у ній змінюється. Ці зміни спадкового матеріалу називають **мутаціями**.

Отже, **мутації** — це структурні зміни генетичного матеріалу, що призводять до порушень біохімічного гомеостазу і в кінцевому результаті — до появи нових властивостей у клітини чи організму. У дрозофіли отримано сотні мутацій, які змінюють морфологію тіла, очей, кінцівок і інших органів, впливають на плодючість, тривалість життя, статеву поведінку, імуногенетичні особливості, реакцію на різні фактори зовнішнього середовища (температуру, освітлення, інсектициди); нерідко генетичні перебудови призводять до явища **гомеозису**. В останньому випадку замість одних органів у дрозофіли виникають інші, наприклад, замість антен розвиваються ноги, замість галтерів — додаткова пара крил і т. д.

Мутанти мікроорганізмів можуть бути ауксотрофами або суперпродуцентами амінокислот, вітамінів та інших біологічно активних сполук, можуть втратити або збільшити вірулентність, набути спадкову стійкість до антибіотиків або інших отрут, змінити морфологію колоній тощо.

Велетенська кількість мутацій властива клітинам людини. Вони призводять до численних біохімічних, фізіологічних та морфологічних відхилень, що можуть проявлятися у вигляді спадкових хвороб.

Термін «мутація» вперше був запропонований Г. де Фрізом в його класичній праці «Мутаційна теорія». Викладені в цій роботі основні положення мутаційної теорії зберегли своє значення і сьогодні, хоч Г. де Фріз і припустився принципової помилки, протиставивши теорію мутацій теорії природного добору. Він помилково вважав, що внаслідок мутацій без всякого добору можуть виникати

не тільки нові форми, але й нові види. Насправді мутації є лише джерелом спадкових змін, що слугують матеріалом для добору.

Основні тези мутаційної теорії Г. де Фріза такі:

1. Мутація виникає раптово, без всяких перехідних форм;
2. Нові форми, що виникли внаслідок мутацій, досить стійкі;
3. В протилежність неспадковим змінам мутації не утворюють безперервних рядів, не групуються навкруги середнього типу (моди);
4. Мутації проявляються по-різному і можуть бути як корисними, так і шкідливими;
5. Вірогідність виявлення мутацій залежить від кількості досліджених особин;
6. Одні і ті ж мутації можуть виникати багаторазово.

Ці основні положення Г. де Фріза в подальшому були поглиблені і доповнені. Найзначнішим і найважливішим із таких доповнень став **закон гомологічних рядів** спадкової мінливості, сформульований М. І. Вавіловим у 1920 р. Згідно з цим законом, *близьким видам і родам організмів властиві подібні ряди спадкової мінливості*, і чим ближче досліджувані організми в таксономічному відношенні, тим більше спільного спостерігається в спектрах цієї мінливості. Цей закон М. І. Вавілова стоїть у ряду найвидатніших наукових досягнень, які свідчать про єдність живої природи і про універсальність багатьох біологічних структур і функцій.

11.3.1. Мутації і модифікації, їх відмінності

Автор теорії мутацій Г. де Фріз визначив мутації як стрибкоподібні, переривчасті зміни спадкових ознак. Це чітке, хоч і не досконале, визначення дійсне і сьогодні.

Для генетиків і селекціонерів у їх практичній роботі дуже важливо мати надійні критерії розпізнавання спадкових мутаційних змін і їх розмежування з модифікаціями.

На деякі найважливіші відмінності мутацій і модифікацій слід звернути особливу увагу. Ч. Дарвін називав мутаційну мінливість **невизначеною**, враховуючи те, що у відповідь на дію одного фактора можуть виникати зовсім різні спадкові зміни ознак і, навпаки, різні фактори зовнішнього середовища можуть призводити до однакових спадкових змін фенотипу. Що ж до модифікаційної мінливості, то Ч. Дарвін її називав **визначеною**, бо в цьому випадку характер фенотипових змін можна заздалегідь прогнозувати, знаючи, який фактор діятиме. Дійсно, можна з високим ступенем вірогідності передбачити характер неспадкових змін фенотипу рослин у

відповідь на підвищену чи низьку температуру, умови посухи чи високої вологості тощо. Основні відмінності мутацій від модифікацій наведено у табл. 11.1.

Таблиця 11.1

Основні відмінності мутацій і модифікацій

№ п. п.	Особливості мутацій	Особливості модифікацій
1.	Невизначеність	Визначеність
2.	Вираженість змін не залежить від сили і тривалості дії фактора, що викликає мутації	Ступінь змін фенотипу прямо пропорційний силі і тривалості впливу провокуючого фактора
3.	Не мають безпосереднього адаптивного значення. Інколи можуть бути корисними, але лише випадково	У переважній більшості мають адаптивне значення в межах норми реакції генотипу. Виключенням з цього правила є переважна більшість морфозів
4.	Константні (не зникають протягом життя особини)	Не стійкі. Як правило, зникають протягом життя особини. Виключення — тривалі модифікації
5.	Успадковуються	Не успадковуються

Враховуючи ці та інші особливості мутацій і модифікацій, їх можна розпізнавати навіть за ідентичності фенотипових виявів. Таке розпізнавання вкрай необхідне за відбору вихідного матеріалу для подальшої селекції, бо остання може бути ефективною лише у випадку добору за ознаками, які успадковуються.

11.3.2. Класифікація мутацій

В основі класифікацій, що використовуються, лежать різні принципи. В сучасній генетиці залежно від принципів класифікації мутації поділяють на такі:

1. Залежно від способу виникнення мутацій:
 - а) спонтанні, що постійно виникають у природі без очевидних причин і з певною частотою;
 - б) індуковані мутації, що виникають у відповідь на дію різноманітних факторів середовища.
2. За виявом у гетерозиготи:
 - а) домінантні мутації;
 - б) рецесивні мутації.

3. За відношенням до норми або так званого дикого типу:

а) **прямі** мутації, за яких гени дикого типу перетворюються в алельні форми;

б) **супресорні** і **зворотні** мутації, за яких відновлюється дикий фенотип. Повернення мутанта до дикого фенотипу (тобто реверсія) найчастіше є результатом супресії, тобто іншої мутації. Зворотні мутації, за яких ушкоджений ген повністю відновлює свою будову і перетворюється у вихідний ген дикого типу, бувають рідко.

4. За локалізації в еукаріотній клітині:

а) **ядерні**, якщо мутації відбуваються в ДНК ядра;

б) **цитоплазматичні**, якщо мутації відбуваються в ДНК цитоплазми.

5. В залежності від типу клітин, в яких виникають мутації:

а) **генеративні** — виникають у статевих клітинах та їх попередниках;

б) **соматичні** — виникають у соматичних клітинах і розповсюджуються за їх мітотичного поділу.

6. За фенотиповим виявом:

а) **морфологічні** — мутації, що проявляються тими чи іншими змінами будови клітин та організмів, структури колоній прокаріотів тощо;

б) **фізіологічні** — супроводжуються порушенням фізіологічних функцій;

в) **біохімічні** — мутації, для яких встановлена суть основних порушень обміну речовин, в першу чергу на рівні білкових молекул.

7. За впливом на адаптивну здатність клітин і організмів:

а) **корисні** мутації — за фенотиповим проявом імітують адаптивні модифікації і тому сприяють збереженню виду за даних умов;

б) **нейтральні** мутації — не впливають на життєздатність клітин і організмів;

в) **субвітальні** мутації — знижують життєвість генотипів на 10—50%;

г) **напівлетальні** мутації — знижують життєвість генотипів на 50—90%;

д) **летальні** — призводять до загибелі 100% генотипів, що мають таку мутацію;

е) **умовно-летальні мутації** — проявляються лише за певних умов.

8. Залежно від змін генотипу:

а) **генні** або **точкові** мутації — зміни структури ДНК у межах гена;

б) **хромосомні** мутації або хромосомні перебудови — порушення структури хромосом;

в) **геномні** мутації — випадкові зміни кількості окремих хромосом або кількості хромосомних наборів.

З наведених класифікацій найглибше генетичне підґрунтя має класифікація, що основана на характері змін у генотипі. На жаль, не для всіх мутацій відома суть генотипових порушень. Тому поруч з класифікацією, що ґрунтується на врахуванні змін у генетичному апараті, широко використовується найбільш еклетична класифікація, яка основана на особливостях змін фенотипу, а також інші класифікації.

11.3.3. Загальна характеристика деяких типів мутацій

Спонтанні та індуковані мутації

Спонтанні або природні мутації виникають з певною частотою ($1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-9}$) без будь-яких видимих причин. З'ясовано, що частота цих мутацій дуже залежить від генотипу. Так, у дрозофіли частота появи летальних мутацій у Х-хромосомі в середньому складає 0,15%, однак у природі зустрічаються лінії із спадково обумовленою здатністю до високої мутабельності — 1% мутацій на покоління. Темп мутування залежить не тільки від генотипу, але й від фізіологічного стану клітини чи організму — від віку, стадії розвитку та інших умов. Так, М. С. Навашин на насінні *Crepis capillaris* показав, що збільшення віку насіння супроводжується зростанням частоти спонтанних мутацій у їх клітинах.

Встановлено, що природні мутації є наслідком можливих помилок у роботі фізіологічних систем клітини, які в нормі забезпечують функцію генетичного апарату. Дійсно, ефективність ферментів реплікації, репарації, рекомбінації та інших молекулярногенетичних процесів істотно залежить від індивідуальних особливостей генотипу та умов його існування. Цим пояснюється різна частота можливих помилок у роботі відповідних ферментів і, як наслідок, різна частота спонтанних мутацій за конкретних умов.

Поруч з генами, які мутують із звичайною частотою (10^{-5} — 10^{-8} і рідше), описано гени, що відрізняються значно вищою мутабельністю. Високомутабельні гени знайдено у цілому ряду рослин — кукурудзи, дельфініума та ін. Соматичні мутації таких генів є причиною виникнення строкатого забарвлення листя, пелюсток та інших частин рослини.

Крім того, є гени, які можуть як збільшувати частоту мутацій інших генів (**гени-мутатори**), так і зменшувати її (**гени-антимута-**

тори). Так, за наявності гена *mutT* частота деяких генних мутацій (трансверсій) у кишкової палички зростає в 10 000 разів, а наявність гена *mutL* збільшує кількість мутацій (транспозицій і порушень рамки зчитування) у 100 разів.

Однією з причин високої частоти соматичних мутацій виявились інсерції — вставки в різні місця хромосом мобільних генетичних елементів (транспозонів, ретропозонів і т. п.). Це показано для кукурудзи (Б. Мак-Клінток), для дрозофіли (Г. Б. Георгієв) та інших об'єктів. Для багатьох локусів дрозофіли, на думку М. Д. Голубовського, вставка мобільного генетичного елемента є головною причиною мутагенезу.

До 1925—1927 рр. дослідники працювали лише на природних мутантах, які виникають досить рідко. Це значно гальмувало тоді генетичні дослідження, і цілком зрозумілими були спроби вчених першої половини ХХ сторіччя збільшити частоту мутацій шляхом **індукованого мутагенезу**.

Вперше збільшення частоти спадкової мінливості у нижчих грибів під впливом дії «променів радію» спостерігали у 1925 р. мікробіологи Г. А. Надсон і Г. С. Філіпов. Це була перша вдала спроба отримати індуковані мутації. Згодом, у 1927 р. Г. Меллер виявив мутаційний вплив рентгенівського опромінення на дрозофілу. В наступні роки і десятиліття мутагенна дія іонізуючих та ультрафіолетових опромінь була досліджена на численних об'єктах — рослинах, тваринах, прокаріотах.

Був відкритий також і хімічний мутагенез: спершу В. В. Сахаров (1932), а потім М. Ю. Лобашов і Ф. А. Смирнов (1939) показали, що деякі хімічні сполуки індукують рецесивні леталі в Х-хромосомі дрозофіли. В 1939 р. С. М. Гершензон вперше виявив сильну мутагенну дію екзогенної ДНК.

Дуже важливою віхою в розвитку генетики було відкриття **надмутагенів (супермутагенів)** — хімічних сполук, що індукують мутації з високою частотою — до 100%. Це було зроблено в 1946 р., коли І. А. Рапопорт сповістив про високу мутагенну активність етиленіміну, а Ш. Ауербах і Дж. Робсон — азотистого іприту.

Згодом були відкриті **речовини-антимутагени**, що ослаблюють дію хімічних та фізичних факторів на ДНК і за рахунок цього або інших захисних механізмів зменшують частоту мутацій.

Індукований мутагенез став сьогодні одним із основних шляхів отримання нових вихідних форм для селекції. В одночас штучний мутагенез став частиною генетичного аналізу, бо використання мутацій для маркування генетичного матеріалу стало традицією генетичних досліджень.

Слід зазначити, що в ділянках хромосом з різною послідовністю нуклеотидів інсерції мобільних генетичних елементів відбуваються з різною частотою. Крім того, показана певна вибірковість у дії хімічних мутагенів і опромінення на ДНК. Цим пояснюється той факт, що окремі райони хромосом і певні послідовності нуклеотидів у межах окремого гена мутують частіше, ніж сусідні ділянки геному. Так, наприклад, вивчення природного мутагенезу в районі *rII* фага T4 показало існування в генах «гарячих» точок, тобто місць або сайтів високої мутабельності.

За дії опромінення у *Vicia faba* розривів у великій хромосомі в два з половиною рази більше, ніж у малих хромосомах. Після обробки корінців цієї рослини іпритом співвідношення кількостей розривів ще більш радіючі — 50:2 на користь великої хромосоми. З'ясувалося, що розриви хромосом зосереджені головним чином у ділянках гетерохроматину, який у великій кількості виявляється в центральній частині великої хромосоми.

Така ж нерівномірність розподілу ушкоджень між різними хромосомами і вдовж окремих хромосом виявлена за дії хімічних мутагенів — гідроксиламіну, 5-бромдезоксипуридину, формальдегіду та ін. Вважають, що 5-бромдезоксипуридин виявляє більшу спорідненість (тропність) до послідовностей нуклеотидів, багатих парами «аденін-тимін», а гідроксиламін — до ділянок хромосом, збагачених парами «гуанін-цитозин». Крім того, є мутагени (наприклад, профлавін), що переважно діють на молекули цитоплазматичної ДНК — мітохондріальної, пластидної тощо.

Отже, існує відносна специфічність дії мутагенних факторів, яка покладена в основу розробки методів «направленого» мутагенезу — штучного отримання мутацій у бажаних місцях геному. Слід зазначити, що це — одна із найважливіших проблем сучасної генетики.

Рецесивні і домінантні мутації

Більшість мутацій, що виникають спонтанно або індукуються чинниками зовнішнього середовища, є **рецесивними** і лише деякі з них — **домінантними**. Рецесивність мутацій дуже важлива для існування виду, оскільки мутації в своїй переважній більшості за даних умов є шкідливими. Незважаючи на цю шкідливість, рецесивні алелі в гетерозиготному стані довго зберігаються у особин популяції і проявляються в процесі комбінаційної мінливості. За певних умов зовнішнього середовища такі мутації можуть виявитися корисними і отримати селекційну перевагу над генами дикого типу.

Згідно з **теорією домінантності** в процесі еволюції можливий перехід рецесивного алеля в домінантний стан; цей перехід є досить складним і довготривалим процесом. Поряд з цим іноді може здійснюватися стрибкоподібне раптове перетворення мутантного алеля в ген дикого типу шляхом зворотної мутації.

Домінантні мутантні гени, у випадку їх шкідливості, негайно вилучаються добром.

Прямі, зворотні та супресорні мутації

Прямі мутації, за яких гени дикого типу перетворюються в алельні форми, частіше бувають рецесивними, а **зворотні** — домінантними. За зворотних мутацій спостерігається повернення до дикого фенотипу. *Процес зворотного переходу мутантного гена у дикий називають його реверсією*. В деяких випадках зворотних мутацій не спостерігається зовсім. Це буває, коли пряма мутація пов'язана із втратою частини генетичного матеріалу (дефішенсі, делеції). Ці втрати можуть бути дуже незначними, так що цитологічно їх виявити не завжди вдається.

У більшості випадків реверсія до дикого фенотипу є наслідком не зворотної, а **супресорної мутації**. Остання може локалізуватись у тому ж гені, що й пряма, але в іншому його місці (сайті). Так, наприклад, делеція однієї пари нуклеотидів у гені є прямою мутацією, що призводить до зсуву рамки зчитування і до спотворення всієї інформації, записаної після сайту делеції. Однак інша мутація — вставка пари нуклеотидів неподалік зазначеної делеції — може бути причиною реверсії до дикого фенотипу в зв'язку з тим, що після вставки відновлюється правильна рамка зчитування на більшій протяжності гена.

Як видно з рис. 11.1, делеції в гені можуть супресуватись вставками і навпаки. Відомі випадки, коли одна зміна компенсується іншою в межах одного гена. Мутантні триптофансинтетази, у яких Gly-21 замінений на Glu або Trp-175 на Cys, були неактивними, тоді як білок, що мав ці обидві зміни, був цілком активним.

Прикладом міжгенних супресорних мутацій є так звані **нонсенс-супресії**, які можуть відновлювати трансляцію поліпептидів (білків), хоч гени останніх є носіями нонсенс-мутацій, тобто містять термінуючі триплети замість значущих. Транскрипція в цьому випадку здійснюється нормально, і наявні в гені нормальні і мутантні кодони переписуються на інформаційну РНК (іРНК), однак повноцінна трансляція з цих іРНК неможлива із-за дострокової термінації зазначеного процесу в місці розташування мутантного нонсенс-кодону.

Будова нонсенс-триплетів у складі іРНК була з'ясована в 60-х роках, і вони отримали дещо екзотичні назви: UAG — амбер (янтар), UAA — охра, UGA — опал.

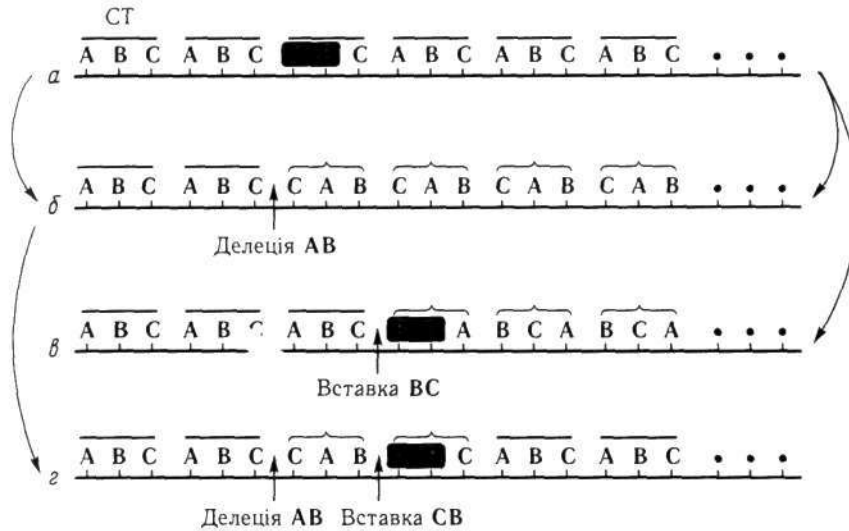


Рис. 11.1. Зміст кодонів на ділянці гена дикого типу (а), за делеції двох нуклеотидів (б), вставки двох нуклеотидів (в) та одночасної наявності в гені зазначених мутацій (г):

А, В, С — умовні нуклеотиди, стрілки — місця мутацій; ————— — кодони за нормальної рамки зчитування; ————— — триплети за зсуву рамки зчитування; СТ — стартовий кодон зчитування коду. Нуклеотиди, які випадають або вставляються, ретушовано

Існування цих трьох типів мутантних кодонів-термінаторів і їх супресія встановлені як для вірусів і прокаріотів, так і для еукаріотних об'єктів. У 1962 р. С. Бензер і С. Чеймп описали амбер-мутації в локусі *rII* фага Т4. Реверсія до дикого фенотипу (здатність розмножуватись у клітинах *E. coli* К12) виникла у фага за рахунок додаткових (супресорних) мутацій у геномі бактерії-хазяїна. Аналогічні амбер-мутації, що подавляються генами-супресорами (*su*⁺) було знайдено у *E. coli*, дріжджів *S. cerevisiae* та інших мікроорганізмів.

За амбер-, опал- та охра-супресій синтез поліпептидів відновлюється завдяки утворенню в клітині незвичайних тРНК, антикодони яких можуть взаємодіяти з нонсенс-триплетами мутантної іРНК. За участю цих тРНК в місці розташування нонсенс-триплету рибосома може включати в поліпептид, що синтезується, амінокислоту,

кодон якої відрізняється від нонсенс-триплету одним нуклеотидом (рис. 11.2).

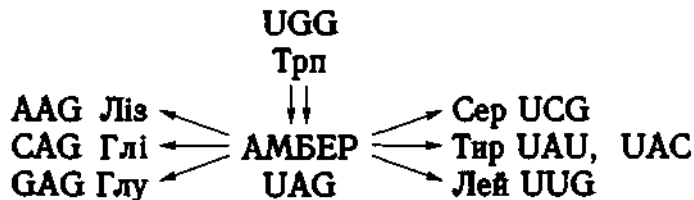


Рис. 11.2 Заміни амінокислот, що спостерігаються при реверсіях амбер-мутантів по структурному гену лужної фосфатази *E. coli*

Таким чином, **супресія нонсенс-мутацій** полягає у виникненні додаткових мутацій у генах тРНК, внаслідок чого змінюється кодова специфічність антикодонів і стає можливою трансляція нонсенс-триплетів іРНК. Як правило, нонсенс-супресорами виявляються ті тРНК, антикодони яких можуть взаємодіяти з нонсенс-триплетами після заміни одного нуклеотиду на інший.

Крім **нонсенс-супресій**, відомі також **місенс-супресії**, тобто мутації в генах тРНК, за яких останні можуть взаємодіяти з іншими (не «своїми») смисловими кодонами. Такі супресорні мутації можуть виправляти помилки трансляції, що виникають внаслідок прямих мутацій у структурному гені і призводять до амінокислотних заміни у білках. Так, наприклад, якщо в результаті прямої мутації в якомусь гені кишкової палички із кодону GGG (Глі) утвориться кодон GAG (Глу), тобто виникне місенс-мутація, то супресія такої мутації може бути здійснена мутантною гліциновою тРНК з незвичайним антикодоном CUC. За допомогою такої мутантної тРНК^G гліцин буде включатись у поліпептид замість глутамінової кислоти, отже можлива супресія зазначеної вище місенс-мутації.

Існують супресорні мутації генів тРНК, що змінюють кількість нуклеотидів в антикодонах. Наприклад, у *Salmonella typhimurium* знайдена мутантна форма тРНК^G з антикодоном CCCC. Така тРНК взаємодіє з мутантним кодоном гліцину GGGG, який виникає внаслідок прямої мутації — вставки додаткового G у кодон. Завдяки супресорній мутації в антикодоні, відновлюється нормальна рамка зчитування коду, що була порушена прямою мутацією (вставкою). Все це — приклади супресій, які нівелюють вплив мутацій типу «зсуву рамки зчитування».

Супресорні зміни генів тРНК не призводять до дезорганізації процесів трансляції, бо гени тРНК у геномах представлені багатьма копіями, а супресорні мутації відбуваються лише в деяких із них.

Супресії на рівні трансляції можуть здійснюватися також завдяки мутаціям у генах, що кодують білки рибосом. Внаслідок цих мутацій рибосома помиляється в осмисленні окремих кодонів. Так, наприклад, нонсенс-триплети можуть сприйматися рибосомою як значущі без особливих мутантних форм тРНК. Нонсенс-супресорні мутації в подібних випадках не мають відношення до генів тРНК, а змінюють структуру генів деяких білків рибосом.

Згадані форми **генотипової супресії** слід чітко відмежувати від проявів **фенотипової супресії** нонсенс-алелів. Остання також відбувається на рівні трансляції, але без супресорних мутацій і лише у відповідь на дію чинників зовнішнього середовища, які призводять до помилок у роботі рибосоми (дія низької температури, аміноглікозидних антибіотиків тощо).

Ядерні та цитоплазматичні мутації

У еукаріотів, яким властиві як гени ядра, так і плазмогени, мутантний фенотип може бути наслідком спадкових структурних змін як у тих, так і в інших. Тому у еукаріотів мутації поділяють на **ядерні та цитоплазматичні**. Вони відрізняються не так фенотиповими проявами (деколи останні співпадають), як особливостями успадковування. Ознаки, що визначаються мутантними генами хромосом, успадковуються за законами ядерного успадковування, тобто у відповідності з законами Г. Менделя, зчепного успадковування і т. п. Щодо цитоплазматичних мутацій, то вони передаються у спадок за законами цитоплазматичного успадковування (розділ 10).

Генеративні та соматичні мутації

Мутації, що виникають у статевих клітинах або в їх попередниках, називають **генеративними**. Якщо ж структурні зміни генетичного матеріалу виникають в інших клітинах організму, то такі мутації відносять до **соматичних**.

Принципової різниці в механізмах виникнення цих мутацій немає, але вони можуть істотно відрізнитися за своїми наслідками і значимістю для еволюційного процесу. Генеративна мутація, що локалізується в статевій клітині, за запліднення переноситься в зиготу, а потім — і в усі інші клітини організму, який розвивається із цієї зиготи. Якщо ця мутація домінантна, то вона може проявитися в усіх клітинах організму, тобто мати **генералізований** характер. У випадку, коли генеративна мутація виникає в одній із зародкових клітин або в період розмноження сперматогоніїв чи овогоніїв, вона пошириться лише на відповідний клон клітин-нащадків. Це озна-

чає, що не всі статеві клітини, а, отже, і не всі нащадки, будуть мутантними.

Соматичні мутації, що виникають у клітинах окремих органів та тканин, у переважній більшості призводять до **мозаїцизму** — локального розмноження мутантних клітин у місцях їх виникнення.

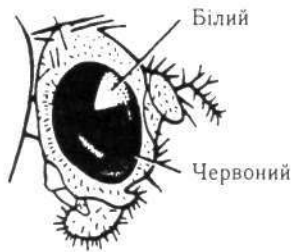


Рис. 11.3. Мозаїка забарвлення фасеток ока у дрозозіли (сектори червоного і білого кольору) як результат соматичних мутацій

Особини, що несуть ділянки мутантних тканин, називаються **мозаїками** або **химерами**. У диплоїдних організмів у випадку рецесивності соматичної мутації вона проявляється лише за гомозиготності або гемізиготності. Прикладом такого мозаїцизму може слугувати одночасна наявність в очах мутантних самців дрозозіли червоних і білих фасеток (рис. 11.3). Ця мозаїка ока пояснюється виникненням рецесивної мутації в статевій хромосомі X окремих клітин на стадії розвитку імагінальних дисків. У самок зазначений мозаїцизм не виявляється, оскільки

у них дві X-хромосоми, і відповідний рецесивний алель (w) нівелиюється домінантним алелем (w^+).

За статевого розмноження соматичні мутації (за виключенням таких у зародкових генеративних клітинах) не передаються нащадкам і тому не мають першорядного значення для еволюції. Однак у видів, яким властиве вегетативне розмноження, соматичні мутації можуть відігравати важливу роль, особливо в селекції. Так, наприклад, у плодових і ягідних рослин із клітин, що несуть соматичну мутацію, можна отримати рослину і цілий клон з мутантною ознакою. Сьогодні це стало можливим для численних представників рослинного світу, завдяки існуючим методам регенерації вегетативних форм рослин із отриманих у лабораторії культур клітин та протопластів (розділ 14).

Одним із типів соматичних мутацій у рослин є **брунькові мутації**, які виникають у меристемних клітинах точки росту стебла. З мутантних клітин, що при цьому утворюються, виростають пагоги, що містять лише мутантні клітини. Їх можна використовувати для подальшої селекційної роботи, як це робив відомий селекціонер І. В. Мічурін та інші.

Дослідження соматичних мутацій сьогодні дуже важливе для з'ясування причин виникнення деяких захворювань (наприклад, пухлин) у рослин, тварин та людини, зниження фізіологічної активності за старіння тощо. Крім того, на моделях соматичних мутацій

з'ясовують можливу частоту виникнення генеративних мутацій. Останнє пов'язано з тим, що причини і механізми виникнення генеративних і соматичних мутацій нічим не відрізняються.

Морфологічні, фізіологічні та біохімічні мутації

Виходячи з фенотипових виявів тих чи інших мутацій, їх поділяють на **морфологічні, фізіологічні та біохімічні**. Така класифікація з наукової точки зору не дуже коректна, бо в основі всіх фенотипових проявів лежать біохімічні процеси. Незважаючи на умовність зазначеної класифікації, вона досить зручна, особливо за дослідження мало вивчених мутацій, і тому часто використовується в літературі.

До **морфологічних мутацій** відносять такі, за яких у сукупності фенотипових змін на перший план виступають зміни в будові клітин та організмів, у формі колоній прокаріотних об'єктів, негативних колоній у фагів тощо. Для дрозофіли відомо сотні мутацій, що порушують морфологію тіла, очей, крил і т. п. (рис. 11.4). Відомо чимало морфологічних мутацій у сільськогосподарських тварин — коротконогість, відсутність шерсті чи пір'я, двоголовість, безногість, безкрилість і т. д.

У людини відомо дуже багато морфологічних порушень (ознак дисплазій розвитку), що виникають внаслідок структурних змін

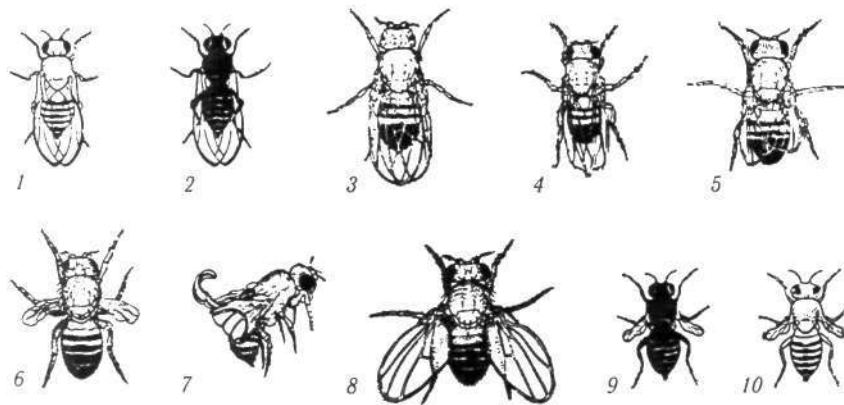


Рис. 11.4. Приклади морфологічних мутацій у *D. melanogaster*:

1 — норма (дикий тип) — тіло сіре, очі темно-червоні; 2 — чорне тіло (мутація *b* — black); 3 — вузькі (щілиноподібні) очі (мутація *B* — Bar); 4 — вирізки на крилах (мутація *cut*); 5 — маленькі крила (*rudimentari*); 6 — зачаткові крила (*vestigial*); 7 — загнуті крила (*curly*); 8 — розчепірені крила (*dichaeete*); 9 — подвійний мутант *b ug*; 10 — подвійний мутант *ug B*

у генотипі: мікроцефалія, макроцефалія, екзофтальм, невірне розташування зубів, рідкі зуби, арахнодактилія і т. ін.

Фізіологічними мутаціями називають мутації, що супроводжуються порушеннями фізіологічних функцій: фертильності, стійкості до ксенобіотиків, вірусної інфекції, змін численних показників життєздатності, поведінки тощо. До цієї ж групи можна віднести мутації, які за іншим принципом класифікації поділяють на корисні і шкідливі, на нейтральні, субвітальні, напівлетальні і летальні. Наведені їх наймення свідчать про те, що ці мутації призводять головним чином до змін адаптивних реакцій і життєздатності генотипів.

Безумовно, причиною виникнення морфологічних та фізіологічних відхилень у тих чи інших мутантів є вже відомі або ще не з'ясовані біохімічні зміни. Мутації, за яких біохімічні порушення очевидні і добре з'ясовані, умовно називають **біохімічними**. Переважно це генні мутації, в той час як морфологічні виродливості часто бувають наслідком численних хромосомних аберацій.

Умовно летальні мутанти

Відомі мутації, що не сумісні з життям за одних умов, але не проявляються або майже не проявляються за інших умов утримання організмів чи клітин. Летальність таких мутацій свідчить про те, що відповідні гени контролюють життєво важливі функції, а умовність летальності можна пояснити здатністю мутантного гена (точніше — його продукту) виконувати свою функцію за деяких ідеальних умов. Саме тому умовно летальні мутанти слугують єдиною можливими об'єктами для вивчення генів, що контролюють життєво важливі функції.

Серед численних мутантних ознак у мікроорганізмів часто спостерігається втрата здатності синтезувати вкрай необхідні для життєдіяльності сполуки (амінокислоти, нуклеотиди, вітаміни). Такі мутації називають **мутаціями ауксотрофності**, а мутантів — **ауксотрофами**. Вони нормально розмножуються лише на тих середовищах, кожне з яких, крім неорганічних солей та глюкози, містить необхідну для даного ауксотрофа речовину в готовому вигляді.

Інші (**субстратнозалежні**) мутанти не можуть використовувати ті чи інші сполуки за джерела енергії та вуглецю. Для їх розвитку необхідні особливі живильні середовища, що містять доступні для мутанта субстрати. Отже, існують біохімічні мутанти, які за одних (**пермісивних**) умов можуть нормально розвиватися, а за інших (**непермісивних**) — не можуть.

До групи умовно летальних мутантів входять також мутанти з температурнозалежними та супресорнозалежними мутаціями.

Температурнозалежні мутанти нормально розмножуються за одних температурних умов, але гинуть за інших. Так, наприклад, дикий тип фага T4 розвивається в широкому діапазоні температур, утворюючи стерильні плями на газоні кишкової палички як за 25 °С, так і 42 °С. Температурнозалежні мутанти фага за 25 °С розмножуються нормально, а за 42 °С не утворюють негативних колоній, тобто не розмножуються. Є температурночутливі форми мутантів *E. coli*, які утворюють колонії на чашках з агаром в умовах 25 °С, але, в протилежність диким формам, не ростуть за 40 °С. Температурнозалежні мутанти виявлені також у інших бактерій, вірусів і еукаріотів. Відомі мутанти дрозофіли, що розвиваються в умовах 25 °С, але не дають нащадків за більш високих температур. Виявлено також холодочутливих мутантів різних організмів.

Супресорнозалежні мутанти фагів можуть інфікувати лише ті бактерії, які містять супресорну мутацію, здатну нівелювати дію умовно летальної мутації в геномі фага. Прикладом можуть бути нонсенс-мутації. Такі мутації виявляються летальними для фага за інфікування ним певних штамів клітин. Однак у бактеріях інших штамів, що несуть супресорний ген (*su⁺*), розвиток подібних мутантних фагів здійснюється нормально.

В основі прояву всіх умовно летальних мутацій лежать біохімічні порушення, які для ряду випадків добре з'ясовані. Це або втрата активності окремими ферментами, що призводить до аукотрофності чи субстратної залежності, або такі порушення структури ферментів та інших молекул, за яких вони виконують свою функцію лише в конкретних умовах (певна температура, наявність супресорної мутації в клітині-хазяїні тощо).

Слід ще раз зазначити, що умовно летальні мутації використовуються генетиками як єдино можливі маркери за дослідження деяких життєво важливих генів, бо всі інші мутації цих генів, як правило, є летальними і виключають отримання нащадків. До таких генів відносяться, наприклад, гени реплікативних ДНК-полімераз та інших ферментів.

11.4. Методи вивчення мутацій

Однією з умов успішного проведення генетичного аналізу є наявність ефективних методів виявлення мутацій. Аналіз мутацій є одночасно методом вивчення спадковості, тому удосконалення методичних підходів щодо виявлення і дослідження мутантних форм

будь-яких організмів має величезне значення для розвитку всієї генетики.

Поява мутацій у геномі супроводжується певними змінами у фенотипі, однак ці зміни не завжди можна виявити без спеціальних досліджень і не в кожному випадку вони можуть бути безперечним доказом наявності відповідних мутацій. Тому в генетичних дослідженнях віддають перевагу мутантам, які: 1) легко виявляються; 2) швидко розмножуються; 3) мають стійкі фенотипові прояви за умов досліду. Найкраще відповідають зазначеним умовам численні мутанти мікроорганізмів — вірусів, грибків, бактерій. Саме для цих об'єктів запропоновані відносно прості і дуже надійні методи виявлення і дослідження мутацій.

11.4.1. Дослідження мутацій у мікроорганізмів

Мутації у бактерій можуть призводити до різноманітних змін фенотипів, серед яких найбільш розповсюджені такі:

— втрата здатності самостійно синтезувати амінокислоти, пурини, піримідини, вітаміни та інші фактори росту. Це мутанти-ауксотрофи;

— втрата здатності ферментувати вуглеводи. Таких мутантів називають ферментативними або субстратнозалежними;

— поява стійкості до фізичних чинників (ультрафіолетового і іонізуючого опромінення, температури);

— поява стійкості до антибіотиків, сульфаніламідів, бактеріоцинів, антиметаболітів та інших токсичних речовин;

— поява стійкості до бактеріофагів;

— зміни антигенних властивостей;

— зміни вірулентності;

— зміни морфології колоній;

— порушення генетичної рекомбінації.

Сьогодні відомо багато бактеріальних мутантів із зазначеними особливостями фенотипів і розроблено зручні і надійні методи їх визначення. Метаболітний дефект у лактозонегативного (Lac^-) штаму *E. coli* легко виявити, якщо висіяти бактерії на спеціальне індикаторне середовище — ЕМЦ-агар. Цей агар містить живильний бульйон, барвники еозин жовтий і метиленовий синій і той цукор, можливість використання якого досліджується. На ЕМЦ-агарі бактерія, що ферментує доданий цукор, утворює темно-червону колонію, а у випадку втрати такої здібності — безбарвну, що залежить від альтернативного стану індикаторних барвників. Тому коли на ЕМЦ-агар з лактозою висівають *E. coli* Lac^- , то вона утворює

безкольорові колонії. Однак після довгої інкубації таких чашок Петрі на колоніях появляються окремі темно-червоні краплі або бугорки. Пересіваючи бактерії з червоних бугорків на ЕМЦ-агар з лактозою, можна переконатися, що ці бактерії знову стали здатними зброджувати лактозу внаслідок зворотної мутації $Lac^- \rightarrow Lac^+$. Коли стало відомо, що ця варіабельність фенотипу бактерії дійсно має мутаційну природу, Дж. Ледерберг виявив лактозонегативних мутантів серед звичайних бактерій *E. coli* дикого типу.

Мутація $Lac^- \rightarrow Lac^+$ пов'язана з геном *lacZ*, який контролює синтез β -галактозидази, отже гідроліз лактози на галактозу і глюкозу. Фенотип Lac^+ виникає також за мутацій у гені галактозидпермеази (*lacY*) та інших генів, що мають відношення до функції *lac*-оперону. Диференціація цих різних мутантів з однаковим фенотипом можлива лише з допомогою більш складних генетичних досліджень. Використання індикаторного ЕМЦ-агару дало можливість досліджувати також мутантів бактерій, не здатних використовувати за джерела вуглецю і енергії такі речовини, як арабіноза (Ara^-), галактоза (Gal^-), ксиліоза (Xyl^-), мальтоза (Mal^-), маннітол (Mtl^-) та інші. З'ясувалося, що в усіх цих випадках один і той же мутантний фенотип може визначатися більш ніж одним структурним порушенням ДНК.

Зручний метод для визначення ауксотрофних мутантів був розроблений у 1940 р. Г. Бідлом і Е. Татумом для грибка *Neurospora crassa*. Цей грибок можна вирощувати на простому синтетичному середовищі, що містить мінеральні солі, глюкозу і єдину складну органічну добавку — біотин. Для виділення ауксотрофних мутантів нейроспори в кожен із багатьох пробірок, які містили **повне живильне середовище** (тобто просте синтетичне середовище з доданням екстракту дріжджів), вносили по одній спорі грибка. Потім пробірки з **мінімальним середовищем**, яке містило лише глюкозу, мінеральні солі і біотин. Виявилось, що грибок дикого типу може рости як на повному, так і на мінімальному середовищі. Однак приблизно одна спора з двохсот давала початок грибу, що ріс лише на повному середовищі. Ці незвичайні грибки, які ростуть лише за оптимальних умов живлення, є носіями генних мутацій, що блокують біосинтез необхідних для росту грибків сполук — амінокислот, вітамінів, пуринових і піримідинових основ. Щоб напевне визначити, яку саме із цих сполук потребує для свого росту той чи інший мутант, зразки цього ауксотрофного мутанта вносять у ряд пробірок з мінімальним середовищем. В кожен з цих пробірок додають один із факторів росту, так що різні пробірки утримують різні ростові фактори. Та речовина, за наявності якої мутантний

грибок здатний рости, і є необхідним для даного ауксотрофа фактором росту. Детальні генетичні і біохімічні дослідження аномальних грибків показали, що у більшості з них блокована лише одна яка-небудь стадія в ланцюгу реакцій, що забезпечують синтез необхідного ростового фактора — амінокислоти, вітаміну чи азотистої основи. Основуючись на цих фактах, Г. Бідл і Е. Татум запропонували свою знамениту теорію «**один ген — один фермент**», згідно з якою кожний ген контролює лише одну хімічну реакцію, залежну від одного відповідного ферменту.

Метод дослідження, що вперше був застосований для пошуку мутантів у нейроспори, Е. Татум та інші дослідники використали в роботі з бактеріями. З'ясувалося, що біля одного відсотка колоній *E. coli* можуть рости на повному середовищі, але не ростуть на мінімальному. Фенотипи цих ауксотрофних мутантів позначають як Thr^- (потреба в треоніні), Pro^- (потреба в проліні), Tgr^- (потреба в триптофані), Thi^- (потреба в тіаміні), Ade^- (потреба в аденіні) і т. ін. Відповідна прототрофна форма бактерій дикого типу позначається як $\text{Thr}^+\text{Pro}^+\text{Tgr}^+\text{Thi}^+\text{Ade}^+$. Індeksi «плюс» або «мінус» у цих трибуквених символів означають здатність або нездатність клітин **синтезувати** відповідну сполуку, а не здатність використовувати її за джерело енергії і вуглецю, як це прийнято для субстратозалежних мутантів типу Lac^- , Gal^- та ін.

Метод, використаний Е. Татумом для виділення ауксотрофів, виявився дуже складним: приходилося відбирати навмання і знову висівати тисячі бактеріальних колоній. Значно зручнішим виявився метод Б. Девіса і Дж. Ледерберга, що отримав назву **методу збагачування або концентрування мутантів**, і який дозволяє проводити прямий відбір ауксотрофів. Метод ґрунтується на тому, що антибіотик пеніцилін вбиває бактерії лише у тому випадку, коли вони знаходяться в стані росту, бо пеніцилін блокує синтез клітинної стінки бактерії. Щоб відібрати нечисленних ауксотрофних мутантів із великої кількості їх прототрофних сибсів, бактерії культивують на мінімальному середовищі з доданням до нього пеніциліну. За цих умов усі наявні в культурі прототрофи починають рости і тому гинуть від дії пеніциліну. Що ж до ауксотрофів, які нездатні рости на мінімальному середовищі, то вони виживають і після висіву на агар з повним живильним середовищем утворюють клони або колонії. Їх специфічну потребу в конкретних факторах росту можна виявити за схемою дослідження, що була запропонована для нейроспори.

Інший дуже зручний метод виявлення мутантів — це **метод відбитків** або **метод реплік**. За цим методом на поверхню агару вихідної (первинної) чашки, що містить колонії бактерій, накладають

шматочок оксамиту, натягнутого на круглу дерев'яну печатку, що має діаметр чашки Петрі. Потім торкнувшись цією оксамитовою печаткою чистої поверхні агару іншої чашки Петрі, переносять на цей агар відбитки колоній попередньої чашки (рис. 11.5). Після інкубації в кожній точці агару, де була колонія на вихідній чашці, виростає колонія і на чашці-репліці.

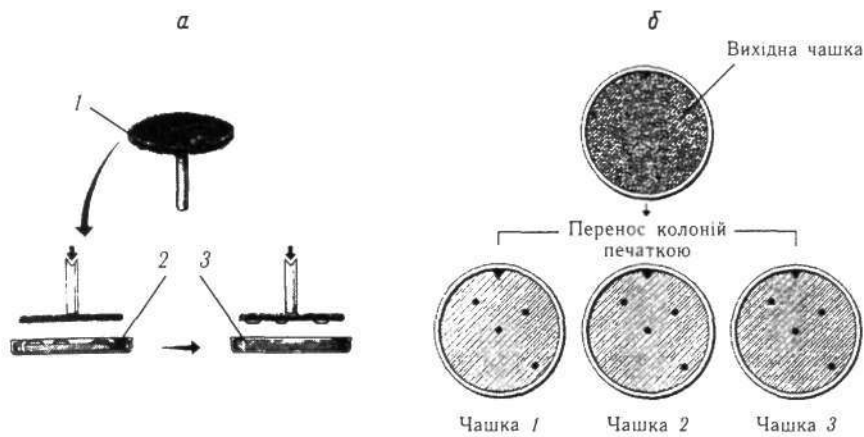


Рис. 11.5. Виявлення мутантних форм бактерій методом реплік:

a — схема отримання реплік. (Стерильна оксамитова печатка 1 прикладається до вихідної чашки 2, на якій ростуть колонії. Потім прикладається до чашки 3 з чистим агаром); *b* — вияв мутантів *E. coli*, стійких до фага T1 (колонії Top^r). (Вихідна чашка містить 10⁷ колоній Top^s *E. coli*. Чашки-репліки 1—3 містять високі концентрації фага T1. На всіх цих чашках виростало по чотири ідентичних колонії Top^r, що свідчить про спонтанне (без впливу фага T1) виникнення мутацій Top^s → Top^r)

Для виявлення ауксотрофних мутантів отримують відбитки колоній з вихідної чашки на чашці з мінімальним середовищем. Порівнюючи розташування колоній на чашці з повним середовищем і на чашці-репліці, легко відшукати на вихідній чашці будь-яку рідкісну колонію ауксотрофа, бо саме ця колонія буде відсутньою на чашці-репліці, яка не містить необхідного фактора росту (рис. 11.6, *a*). Визначивши таким чином місце розташування на вихідній чашці ауксотрофного мутантного клону, його потім можна виділити і з'ясувати його потребу в конкретному факторі росту. Використовуючи пеніциліновий метод добору або зазначений метод реплік, можна отримати велику кількість ауксотрофів *E. coli*, а також поліауксотрофні штами, які потребують для свого росту одразу декількох факторів. Наприклад, якщо отримали мутанта His⁻, що потребує гістидину, то його можна використати для дру-

служує відношення фага до тих чи інших бактерій-хазяїв: мутантний фаг може втратити здатність розмножуватись в одних штаммах бактерії, але зберегти її стосовно інших штамів. Мутації лізогенних фагів (наприклад, λ) можуть призвести до втрати лізогенного шляху розвитку за збереження літичного циклу чи навпаки.

У складних фагів, як і у бактерій, гени поділяються на **істотні** (життєво важливі) і **неістотні**, тобто такі, мутування яких сумісне з життєдіяльністю. Мутації істотних генів у бактеріофагів можна ідентифікувати за допомогою умовно летальних мутацій. З цією метою використовують температурночутливих мутантів і нонсенс-мутантів.

Враховуючи ту обставину, що частота спонтанних мутацій незначна, для їх виявлення необхідно обстежити якомога більшу вибірку. Саме тому бактерії і фаги стали улюбленими об'єктами молекулярної генетики.

11.4.2. Дослідження мутацій у еукаріотів

Вивчення мутаційного процесу, особливо спонтанного мутування, у вищих еукаріотів — рослин і тварин — дуже утруднюється обмеженістю вибірки, довготривалістю генеративного циклу, а також їх диплоїдністю, яка заважає безпосередньому вияву рецесивних мутацій. Однак для деяких представників еукаріотів, особливо для дрозофіли, розроблено ряд дуже зручних методів виявлення і враховування мутацій.

Методи виявлення мутацій у еукаріотів різноманітні. Вони залежать від особливостей об'єкта і способу його розмноження. За безстатевого розмноження багатоклітинних організмів мутації враховуються в соматичних клітинах і у нащадків однієї особини (клону). У самоzapильних рослин і автогамних тварин рецесивні мутації виявляються вже в наступному після виникнення мутації поколінні. У перехресноzapильних рослин і алогамних тварин виникаючі рецесивні мутації знаходяться у гетерозиготному стані і для їх виявлення необхідно застосовувати близькородинні схрещування (інбридинг). Бажано носія мутації зхрестити з представником лінії-аналізатора, що має одну або декілька маркованих груп зчеплення. Це дає можливість не тільки підтвердити факт наявності мутації, але й локалізувати її у певній хромосомі.

Для виявлення видимих мутацій у статевій хромосомі самців дрозофіли можна скористатися методом, який оснований на особливостях розщеплення нащадків мух стандартної лінії *double-yellow* (подвійна жовта). Схрещуючи самок цієї лінії з самцями досліджу-

ваної популяції, можна виявити окремі видимі рецесивні мутації, що виникають у X-хромосомах статевих клітин самців і виявляються у особин чоловічої статі в F_1 (рис. 11.7).

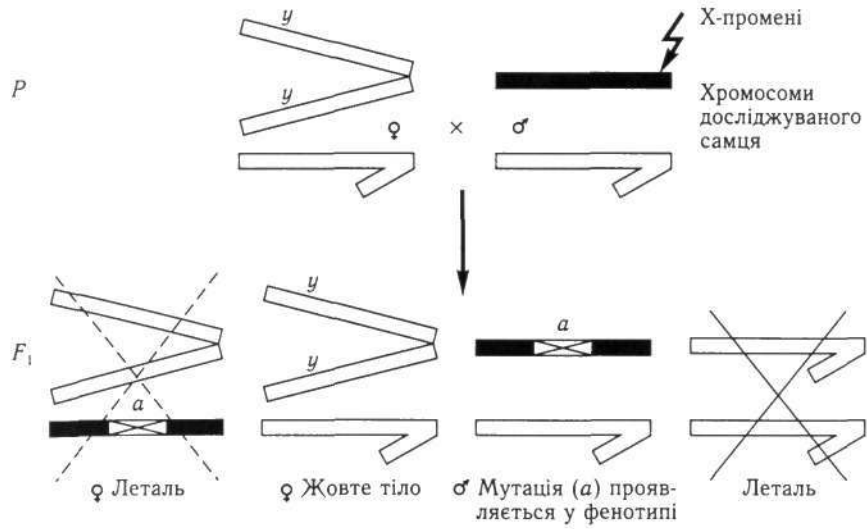


Рис. 11.7. Використання лінії *double yellow* для обліку рецесивних мутацій в X-хромосомах самців дрозофіли:

a — рецесивна мутація, що виникла в X-хромосомі досліджуваного самця

Найбільш об'єктивно можна враховувати рецесивні летальні мутації, які у гомозиготному стані несумісні з життям. Для врахування таких мутацій у статевій хромосомі дрозофіли Г. Меллер розробив *метод CIB*, схема якого наведена на рис. 11.8.

Генетична структура лінії *CIB* відрізняється тим, що одна із X-хромосом самки маркована домінантним геном *Bar* (смугоподібні очі), а також містить протяжну інверсію (C). Ця інверсія запобігає кросинговеру і, крім того, спричиняє летальний ефект (*l*) у гомозиготному стані, тобто зиготи з двома такими хромосомами гинуть. Самці з хромосомою *CIB* теж не розвиваються, бо у них леталь знаходиться в гемізиготному стані. Таким чином, після схрещування досліджуваних мух (♂) з лінією *CIB* (♀) в F_1 зустрічаються самці лише з нормальними очима. Для подальшого аналізу самок F_1 з геном *Bar* індивідуально схрещують з самцями цього ж покоління (кожна пара окремо). Якщо самка F_1 отримала летальну мутацію з X-хромосомою досліджуваного батька, то в F_2 такої самиці не

виявляються самців, бо вони всі загинуть. Таким чином, розщеплення за статтю у цьому випадку не буде (рис. 11.8).

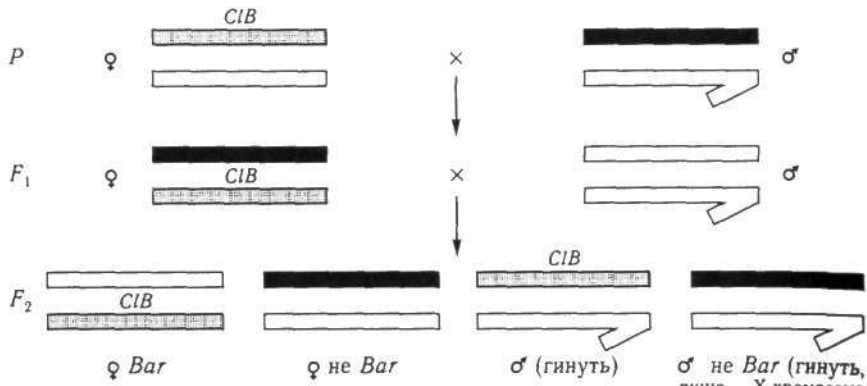


Рис. 11.8. Схема дослідження по вияву рецесивних летальних мутацій в X-хромосомах самців дрозофіли методом *CIB*

Сьогодні для аналізу частоти рецесивних летальних мутацій в X-хромосомі використовують інший метод — *Меллер-5* (або *М-5*) (рис. 11.9).

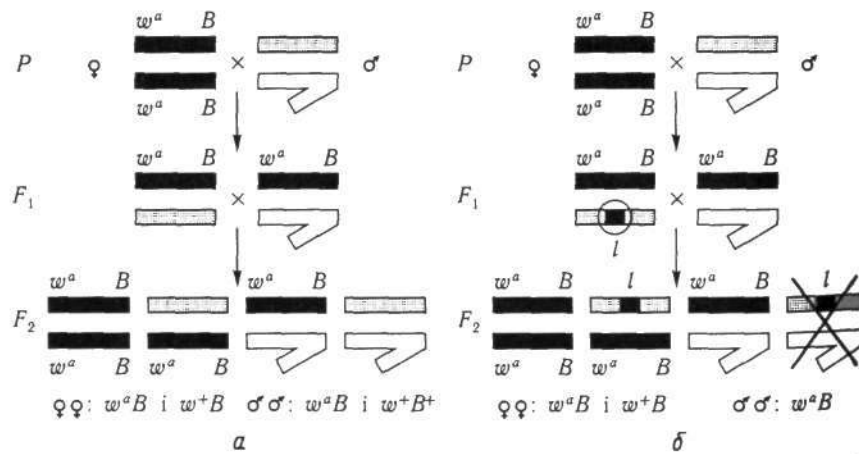


Рис. 11.9. Метод Меллер-5 (М-5) для вияву рецесивних летальних мутацій в X-хромосомах дрозофіли. Рецесивна летальна мутація (*l*):

a — відсутня, *б* — виникла

Обидві хромосоми самок лінії *M-5* утримують по дві нелетальні інверсії: *sc⁸* і *σ49*. Інверсія *sc⁸* займає майже всю X-хромосому, а *σ49* знаходиться в середині її. Наявність цих двох інверсій виключає можливість кросинговеру. Крім того, обидві хромосоми самки мають три маркери: два рецесивних — *sc⁸* (вкорочені щетинки), *w^a* — абрикосове забарвлення очей і один домінуючий — *Bar*. Самці лінії *M-5* життєздатні. Схрещуючи досліджуваного самця дикого типу з самкою *M-5*, в *F₂* отримують по два класи самок і самців. Якщо ж в X-хромосомі досліджуваного самця виникла рецесивна летальна мутація, то в *F₂* будуть самці одного класу *Bw^a*, а самців дикого типу не буде. Метод *Меллер-5* можна використати також для виявлення в X-хромосомі рецесивних мутацій, які не летальні, але мають видимий прояв, проте метод *double-yellow* у цих випадках більш зручний.

Існують методи, що дозволяють визначати рецесивні летальні мутації і мутації з видимим проявом в аутосомах. Наприклад, рецесивні летальні мутації в хромосомі 2 дрозофіли виявляють методом збалансованих леталей або методом *CyL/Pm* (рис. 11.10).

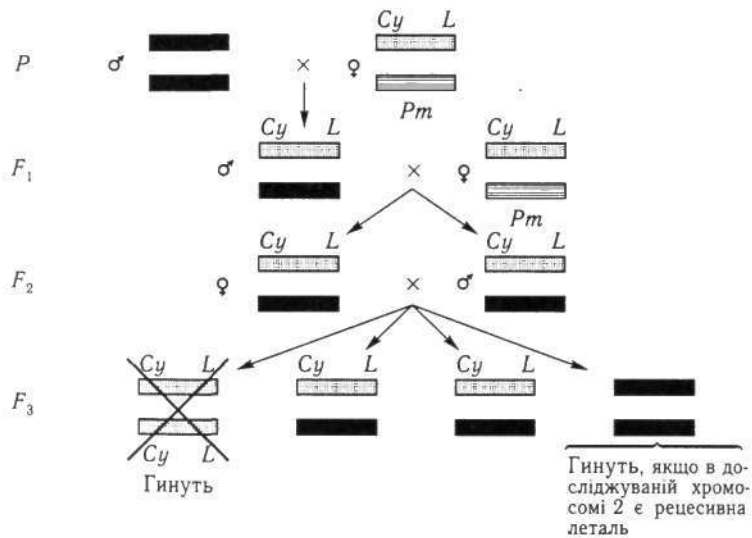


Рис. 11.10. Схема дослідження по врахуванню рецесивних летальних мутацій у хромосомі 2 *D. melanogaster* методом *CyL/Pm*

Для цього використовують спеціальну лінію мух, гетерозиготну по леталіям хромосоми 2. Одна хромосома цієї пари містить дві великі інверсії — по одній в кожному плечі, а також домінуючі

гени *Cy* (*Cyrlly* — загнуті крила) і *L* (*Lobe* — маленькі очі), кожний із яких у гомозиготному стані спричиняє летальний ефект. Гомологічна хромосома теж містить інверсію і маркована геном *Pm* (*Plum* — сливово-коричневий колір очей). Завдяки інверсіям, кросинговер у таких мух заблокований, а в зв'язку з летальним рецесивним ефектом мутацій *Cy*, *L* і *Pm* виживають лише гетерозиготи із зазначених генів. Для виявлення рецесивних летальних мутацій, а також інших рецесивних мутацій з видимим проявом досліджуваних самців схрещують з самками лінії *CyL/Pm*. У F_1 усі мухи *CyL* гетерозиготні по тій чи іншій хромосомі 2 досліджуваних мух. Із F_1 відбирають самців *CyL* і індивідуально схрещують з самками *CyL/Pm*. У F_2 (в індивідуальних культурах) схрещують між собою самців і самок з фенотипом *CyL* і аналізують F_3 . За відсутності рецесивної летальної мутації в хромосомі 2 вихідного досліджуваного самця відбувається розщеплення 2 *CyL*:1 *Cy⁺L⁺*, бо гомозиготи *CyL* не виживають. Якщо ж у досліджуваній хромосомі була рецесивна леталь, то в культурі F_3 будуть мухи одного фенотипу — *CyL*, а нормальні за фенотипом будуть гинути із-за гомозиготного стану цієї леталі. Аналогічним способом враховують в F_3 і нелетальні рецесивні мутації з видимим проявом.

11.5. Генні (точкові) мутації

Точкова або генна мутація — це зміна структури молекули генетичної ДНК або РНК на вузькій ділянці одного гена. Такі мутації виникають внаслідок перестановки, випадіння (делеції), вставки (інсерції) або заміни окремих нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюгу. В усіх цих випадках спостерігаються ті чи інші зміни в первинній структурі відповідних поліпептидів. Можлива заміна одної амінокислоти на іншу; втрата якої-небудь амінокислоти або додаткове включення зайвої; повне спотворення послідовності амінокислот у певному місці або майже по всій довжині поліпептиду; врешті повноцінний синтез останнього може взагалі не відбуватися, якщо він обривається в місці розташування одного із нонсенс-кодонів, які випадково виникають внаслідок точкових мутацій.

Сучасні методи клонування генів дали можливість безпосередньо визначати нуклеотидну послідовність ДНК. Раніше для з'ясування молекулярної природи генних мутацій доводилося визначати амінокислотні заміни в білках, а потім з допомогою таблиць генетичного коду судити про можливі порушення в нуклеотидній послі-

довності генетичної нуклеїнової кислоти. По характеру змін у послідовності нуклеотидів генні мутації поділяють на такі:

1. **Транзиції** — заміна однієї пуринової основи на іншу пуринову, або піримідинової — на іншу піримідинову ($A \rightleftharpoons G$; $T \rightleftharpoons C$);
2. **Трансверсії** — заміна в полінуклеотидному ланцюгу пуринової основи на піримідинову чи навпаки ($A \rightleftharpoons T$; $G \rightleftharpoons C$; $A \rightleftharpoons C$; $G \rightleftharpoons T$);
3. **Вставки** (інсерції) одного або декількох зайвих нуклеотидів;
4. **Випадіння** (делеції) одного або декількох нуклеотидів;
5. **Перестановки** сусідніх нуклеотидів.

Заміни одного нуклеотиду на інший в триплеті можна поділити на **нейтральні**, **місенс-мутації** і **нонсенс-мутації**. У випадку **нейтральних мутацій** смислове значення кодону не змінюється в зв'язку з виродженістю коду; завдяки йому одна і та ж амінокислота може кодуватися двома або й більшим числом триплетів. Так, наприклад, якщо в гені здійснюються перетворення $CUA \rightleftharpoons CUU \rightleftharpoons CUC \rightleftharpoons CUG \rightleftharpoons UUG \rightleftharpoons UUA$, то вони не супроводжуються амінокислотними замінами в білку, бо всі ці шість триплетів кодують одну і ту ж амінокислоту — лейцин. Деякі інші нуклеотидні заміни у складі ДНК фенотипово можуть не виявлятися тому, що нуклеотидний склад кодону в іРНК і антикодону в тРНК не обов'язково мають бути повністю комплементарними (гіпотеза Ф. Кріка про неоднозначну відповідність кодонів і антикодонів).

Місенс-мутації призводять до того, що зміст відповідного триплету (кодону) змінюється. В цьому випадку заміна в кодоні одного нуклеотиду на інший супроводжується амінокислотною заміною в поліпептидному ланцюгу. Ступінь фенотипового прояву такої мутації залежить від того, яка саме амінокислота стала на місце традиційної, якої вона полярності і в якому саме місці поліпептиду така заміна трапилася. Справа в тому, що не всі ділянки молекули білка в рівній мірі визначають його властивості. Існують ділянки, де взаємні заміни амінокислот (особливо такої ж полярності) не виявляють катастрофічного впливу на конформацію і функцію відповідного білка, а є так звані стратегічні ділянки поліпептиду, де будь-які амінокислотні заміни мало сумісні з функцією. Якщо структурні зміни білка не впливають на фенотип, то такі мутації вважають **нейтральними**. Прикладом місенс-мутацій, за яких амінокислотні заміни частково порушують функцію, але ці порушення сумісні з життєдіяльністю, є численні форми гемоглобінопатій — спадкових захворювань, причиною яких є зміна структури молекули гемоглобіну (Hb), внаслідок поодиноких замін амінокислот в поліпептидних ланцюгах цього білка. Структура молекули гемоглобіну здорової людини (Hb A) може бути записана формулою $\alpha_2\beta_2$, бо цей білок складається з двох α -ланцюгів і двох β -ланцюгів. У крові

дитини або дорослого, крім Hb A, є ще біля 3% Hb A2. В ньому замість β -ланцюга міститься δ (дельта)-ланцюг, його формула $\alpha_2\delta_2$. В період ембріогенезу обидві пари ланцюгів бувають дещо іншими, тому відомо чотири ембріональних гемоглобіни. У плода людини вони витісняються так званим фетальним гемоглобіном (Hb F), який складається з двох α - і двох γ -ланцюгів ($\alpha_2\gamma_2$). Існує два типи γ -ланцюгів, які відрізняються лише одним амінокислотним залишком. Встановлено, що кожний глобіновий ланцюг людини кодується окремим геном. Ген, що кодує будову α -ланцюга (Hb α), знаходиться в хромосомі 16, гени глобулінів β , δ і γ утворюють одну групу розташованих поруч генів у хромосомі 11. Більшу частину мутантних варіантів гемоглобіну людини складають поодинокі заміни амінокислот, в основі яких лежать заміни окремої азотистої основи іншою у складі триплету відповідного гена (рис. 11.11).

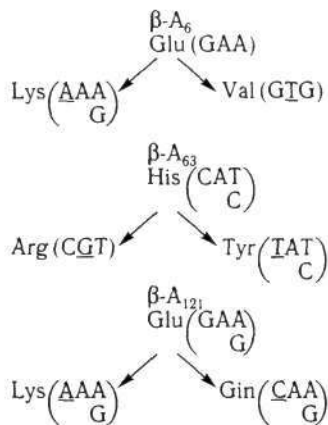


Рис. 11.11. Амінокислотні заміни, виявлені в шести різних мутантних β -ланцюгах гемоглобіну людини, і відповідні триплети:

Нуклеотидні заміни підкреслено. Цифри — порядкові номери амінокислот у поліпептиді

Nonсенс-мутації виникають тоді, коли заміна одного нуклеотиду в кодоні перетворює цей кодон в один із трьох можливих термінуючих (або нонсенс-) триплетів.

Ці некодуючі триплети (у складі іРНК — це UAG, UAA і UGA) звичайно локалізуються в кінці транскрипту і термінують трансляцію. Виникнення додаткових нонсенс-триплетів в інших місцях іРНК, що може бути наслідком нуклеотидних замін у ДНК, достроково термінує трансляцію і виключає можливість синтезу відповідних поліпептидів із повноцінною функцією. Отже, нонсенс-мутації несумісні з фенотипом дикого типу.

У випадку поліцистронних бактеріальних оперонів (наприклад, *Lac*-оперону) нонсенс-мутації часто виявляють **полярний ефект**. Суть його в тому, що мутація, яка виникла в першому після промотора структурному гені, блокує трансляцію іРНК всіх наступних генів, у той час як нонсенс-мутація в кінці оперона не впливає на реалізацію інформації, що знаходиться ближче до стартової точки. Відкриття подібних **полярних** мутацій у свій час зіграло важливу роль у розвитку концепції оперона.

Слід зазначити, що точкові мутації типу нуклеотидних замін (тобто транзиції і трансверсії) є важливим джерелом виникнення

нових алельних генів, що використовуються добром у процесі еволюції. Доказом цього є те, що гомологічні білки навіть досить віддалених видів інколи відрізняються лише однією амінокислотною заміною або відносно невеликою кількістю таких замін (інсулін, адренкортикотропний гормон, гемоглобін, цитохром С тощо).

Інші типи генних мутацій — **вставки** (інсерції) та **випадіння** (делеції) можуть призвести до **зсуву рамки зчитування**, внаслідок чого праворуч мутантного сайту змінюється зміст усіх кодонів. Це буває в тих випадках, коли кількість нуклеотидів, що додатково вставляються в певний сайт або втрачаються в ньому, не є кратною трьом (див. рис. 11.1).

Слід зазначити, що делеція нуклеотидів у гені в значній мірі може бути нівельована відповідною вставкою і навпаки. Ці взаємовідносини вставок і втрат нуклеотидів у межах одного гена слугують одним із прикладів внутрішньогенних супресорних мутацій, здатних трансформувати мутантний фенотип у дикий значно частіше, ніж істинні зворотні мутації. Ф. Крік і С. Бреннер з допомогою мутагенів отримували точкових мутантів *rII* фага T4, серед яких були і мутанти з порушенням рамки зчитування. З'ясовуючи особливості супресорних взаємовідносин між різними типами цих мутацій, автори задовго до відкриття іРНК сформулювали цілий ряд справедливих припущень відносно природи досліджуваних мутацій і загальних особливостей генетичного коду, а саме:

1. Зчитування нуклеотидної послідовності за транскрипції коду розпочинається у фіксованій точці гена і здійснюється послідовно кодон за кодоном. Тому вилучення або вставка одного нуклеотиду в полінуклеотидному ланцюгу автоматично призводить до зсуву рамки зчитування. Отже, між кодонами немає ніяких розділових знаків;

2. За синтезу поліпептидів азотисті основи нуклеїнових кислот зчитуються трійками, тобто кодони мають триплетну природу;

3. Код у дійсності є виродженим, тобто одну і ту ж амінокислоту може кодувати два і більше триплетів.

Вивчення *rII* мутантів фага T4 надало генетичні докази існування кодонів, які термінують синтез поліпептидного ланцюга. Десять амбер-мутацій, картованих в різних сайтах гена білка фагової голівки, достроково зупиняли трансляцію цього білка, причому довжина синтезованого фрагмента точно корелювала з положенням кожної з цих мутацій на карті відповідного гена. Результати цих дослідів вперше засвідчили, що нонсенс-мутації дійсно спричиняють термінацію трансляції і наглядно продемонстрували справедливість уявлень про **колінеарність** (тобто відповідність) генів і поліпептидів. Таким чином, з'ясування природи точкових мутацій зіграло важливу роль у розвитку молекулярної генетики. Крім того,

це підвело наукову основу під відомі класичні уявлення про множинний алелізм у популяціях, а відтак — про шляхи генетичної адаптації та еволюції.

Переважає більшість виникаючих генних мутацій за даних умов існування є рецесивними і шкідливими. Завдяки своїй рецесивності, вони зберігаються у складі гетерозигот, а за зміни умов існування можуть мати істотне адаптивне значення.

11.6. Хромосомні мутації

11.6.1. Загальна характеристика та класифікація

Зміни кількості, розміру і організації хромосом називають хромосомними мутаціями, хромосомними перебудовами або абераціями.

Дослідження хромосомних аберацій привело до поєднання можливостей цитологічного і генетичного методів, завдяки чому склався самостійний розділ генетики — **цитогенетика**. Ті чи інші структурні зміни у хромосомах зручно з'ясувати в профазі мейозу, коли відбувається кон'югація хромосом. Гомологічні хромосоми на стадії пахітени з'єднуються дуже точно — хромомер до хромомера, але аберації можуть порушити цей специфічний і дуже чіткий процес. Порушення синапсису, що виявляються цитологічно, можуть дати важливу інформацію про хромосомні перебудови. Ще зручніше такі дослідження провадити на гігантських (політенних) хромосомах, які постійно знаходяться у стані соматичної кон'югації.

Всі хромосомні аберації поділяють на **внутрішньохромосомні, міжхромосомні та геномні**. Під останніми розуміють зміни каріотипу, що полягають у збільшенні чи зменшенні кількості окремих хромосом або у кратній зміні кількості хромосомних наборів. Чітко розмежувати внутрішньохромосомні, міжхромосомні і геномні мутації не завжди вдається, бо деякі хромосомні перебудови можуть займати як одну, так і декілька хромосом, і нерідко це супроводжується змінами їх чисельності. З другого боку, кратні зміни кількості хромосомних наборів є цілком нормальним явищем у життєвому циклі більшості видів, і це не має відношення до мутаційного процесу. Виділення окремої групи «геномних» мутацій здається не дуже коректним ще й через те, що в принципі будь-яка мутація (навіть точкова) вносить істотний вклад у структурну і функціо-

нальну перебудову геному. Виходячи з цього, всі хромосомні мутації можна класифікувати таким чином:

1. Перебудови хромосом, що впливають на кількість інформації в геномі:

- а) **делеції або нестачі**. Втрачається певна ділянка хромосоми;
- б) **дуплікації**. Одна із ділянок хромосоми представлена у вигляді двох або значно більшої кількості копій.

2. Перебудови хромосом, що змінюють локалізацію генів:

- а) **інверсії**. В одній із ділянок хромосоми гени розташовані в зворотній послідовності;
- б) **транслокації** — реципрокні (тобто взаємні) обміни між негомологічними хромосомами;
- в) **транспозиції** — зміни положення ділянок хромосом без реципрокних обмінів.

3. Зміни кількості хромосом:

- а) **центричне злиття**. Дві негомологічні хромосоми зливаються в одну;
- б) **центричний поділ**. Одна хромосома поділяється на дві, при цьому обов'язково виникає одна нова центромера;
- в) **анеуплоїдія**. В хромосомному наборі відсутня одна чи декілька хромосом, або ж, навпаки, появляється одна або декілька додаткових;
- г) **поліплоїдія** — збільшення в клітині кількості хромосом, кратне гаплоїдному наборові;
- д) **гаплоїдія** (моноплоїдія) може вважатися геномною мутацією лише для організмів більш високої плідності.

Серед організмів, що в нормі моноплоїдні або поліплоїдні, мутантними слід вважати лише такі, у яких зміна плідності здійснюється випадково в зв'язку з тими чи іншими обставинами і призводить до стійкого відхилення від **нормальної (ортоплоїдної)** чисельності хромосомних наборів.

11.6.2. Перебудови хромосом, що впливають на кількість інформації в геномі

Внутрішньохромосомні перебудови, що супроводжуються збільшенням або зменшенням кількості інформації, поділяють на **делеції** та **дуплікації**. І ті, і інші можуть призводити до змін дози (кількості копій) алельних генів або незначущих послідовностей ДНК у геномі. Накопичення в клітині декількох доз одного і того ж гена може супроводжуватись як підсиленням, так і пригніченням його функції. До такого ж результату може призвести зміна дози мікросателіта.

Відносно недавно було з'ясовано, що чимало спадкових хвороб людини (синдром «крихкої» Х-хромосоми, міотонічна дистрофія, хорея Гентингтона та ін.) пов'язані із збільшенням кількості коротких (декілька нуклеотидів) послідовностей, які можуть повторюватись у геномі сотні і тисячі разів. Саме тому перебудови хромосом, що супроводжуються збільшенням або зменшенням протяжності їх ДНК, в останні роки привертають до себе особливу увагу генетиків.

Делеції

Делеції — це перебудови, які спричиняють втрату ділянки хромосоми з утворенням центричного (що містить центромери) і ацентричного (безцентромерного) фрагментів. Делеції бувають (рис. 11.12):

- **кінцеві (дефішенсі або нестачі)**, коли втрачається теломерна частина хромосоми разом із ділянкою, що прилягає до неї;
- **інтерстиційні**, які утворюються шляхом випетлювання та втрати внутрішньої ділянки хромосоми.

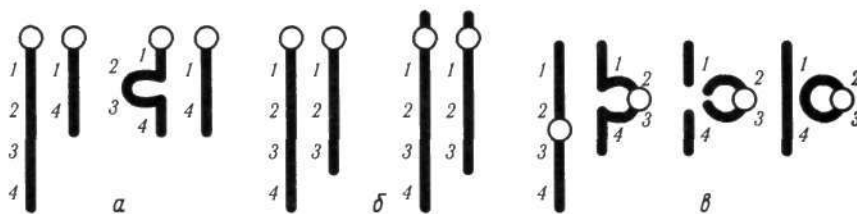


Рис. 11.12. Схема виникнення делецій трьох різних типів:

а — нестача інтерстиційного сегмента; *б* — нестача терминального сегмента; *в* — утворення кілець і ацентричних паличок за делецій. Цифрами позначено окремі ділянки хромосом

За делецій можуть втрачатись як великі, так і маленькі (декілька пар нуклеотидів) ділянки хромосоми. Залежно від цього вони можуть бути і внутрішньогенними, і хромосомними. Втрати незначної кількості нуклеотидів називають **мікроделеціями**. Цитологічно вони не завжди можуть бути виявлені.

За вилучення фрагмента хромосоми без центромери він, як правило, губиться і не передається нащадкам. Фрагмент, що містить центромеру, реплікується і його копії нормально розподіляються серед дочірніх клітин.

Розриви іноді здійснюються одночасно в обох плечах хромосоми, внаслідок чого елімінуються обидва теломерні фрагменти. Відкриті кінці хромосоми можуть з'єднатися, утворюючи в мейозі кіль-

цеву хромосому (рис. 11.12, в). Подібна кільцева структура може утворитись і за **інтерстиційних** делецій, за яких випадає внутрішня безцентромерна ділянка хромосоми. Хромосома у цьому випадку стає коротшою, а кінці досить великого фрагмента з'єднуються і утворюють кільце. Елімінація ацентричних фрагментів призводить до порушення балансу генів і дуже часто — до загибелі клітин. Якщо ж внутрішня делеція не супроводжується летальним ефектом, то вона передається нащадкам, як правило, в гетерозиготному стані. У таких гетерозигот проявляються рецесивні алелі, локалізовані в гомологічній хромосомі напроти існуючої делеції. Це явище відоме під назвою **псевдомініантності**.

Класичним прикладом нестач слугує домінантна мутація *Notch* у дрозофіли, яка в гетерозиготному стані спричиняє неглибокі вирізки на крилах мух. Мутація успадковується зчепно зі статтю, бо локалізована на лівому кінці X-хромосоми. Для самців, у яких ця мутація знаходиться в гемізиготному стані, вона є летальною. Генетичний аналіз показав, що мутації *Notch* властиве явище псевдомініантності. На рис. 11.13 показано, що за схрещування червоноокої (w^-) самки *Notch* з білоокою (w) самцем у половини дочок

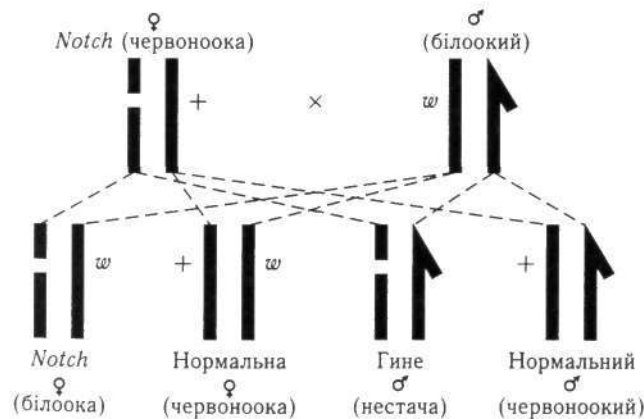


Рис. 11.13. Успадкування мутацій *Notch* і явище псевдомініантності у самок дрозофіли

Notch виявляється ознака білоокості, хоч ген цієї ознаки є рецесивним. За цих умов експресується також група інших рецесивних генів, що локалізована в гомологічній X-хромосомі напроти делеції *Notch*. Отже, зазначена мутація полягає у втраті цілої групи нормальних алелів в одній із X-хромосом, що й призводить до псевдомініантності.

Відносно недавно було з'ясовано, що чимало спадкових хвороб людини (синдром «крихкої» Х-хромосоми, міотонічна дистрофія, хорея Гентингтона та ін.) пов'язані із збільшенням кількості коротких (декілька нуклеотидів) послідовностей, які можуть повторюватись у геномі сотні і тисячі разів. Саме тому перебудови хромосом, що супроводжуються збільшенням або зменшенням протяжності їх ДНК, в останні роки привертають до себе особливу увагу генетиків.

Делеції

Делеції — це перебудови, які спричиняють втрату ділянки хромосоми з утворенням центричного (що містить центромери) і ацентричного (безцентромерного) фрагментів. Делеції бувають (рис. 11.12):

- **кінцеві (дефішенсі або нестачі)**, коли втрачається теломерна частина хромосоми разом із ділянкою, що прилягає до неї;
- **інтерстиційні**, які утворюються шляхом випетлювання та втрати внутрішньої ділянки хромосоми.

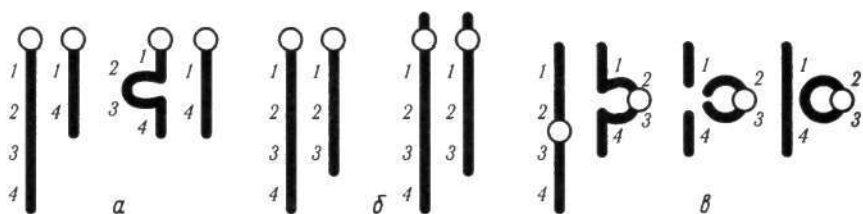


Рис. 11.12. Схема виникнення делецій трьох різних типів:

а — нестача інтерстиційного сегмента; *б* — нестача термінального сегмента; *в* — утворення кілець і ацентричних паличок за делеції. Цифрами позначено окремі ділянки хромосом

За делецій можуть втрачатись як великі, так і маленькі (декілька пар нуклеотидів) ділянки хромосоми. Залежно від цього вони можуть бути і внутрішньогенними, і хромосомними. Втрати незначної кількості нуклеотидів називають **мікроделеціями**. Цитологічно вони не завжди можуть бути виявлені.

За вилучення фрагмента хромосоми без центромери він, як правило, губиться і не передається нащадкам. Фрагмент, що містить центромеру, реплікується і його копії нормально розподіляються серед дочірніх клітин.

Розриви іноді здійснюються одночасно в обох плечах хромосоми, внаслідок чого елімінуються обидва теломерні фрагменти. Відкриті кінці хромосоми можуть з'єднатися, утворюючи в мейозі кіль-

цеву хромосому (рис. 11.12, *в*). Подібна кільцева структура може утворитись і за **інтерстиційних** делецій, за яких випадає внутрішня безцентромерна ділянка хромосоми. Хромосома у цьому випадку стає коротшою, а кінці досить великого фрагмента з'єднуються і утворюють кільце. Елімінація ацентричних фрагментів призводить до порушення балансу генів і дуже часто — до загибелі клітин. Якщо ж внутрішня делеція не супроводжується летальним ефектом, то вона передається нащадкам, як правило, в гетерозиготному стані. У таких гетерозигот проявляються рецесивні алелі, локалізовані в гомологічній хромосомі напроти існуючої делеції. Це явище відоме під назвою **псевдомінантності**.

Класичним прикладом нестач слугує доміантна мутація *Notch* у дрозофіли, яка в гетерозиготному стані спричиняє неглибокі вирізки на крилах мух. Мутація успадковується зчепно зі статтю, бо локалізована на лівому кінці X-хромосоми. Для самців, у яких ця мутація знаходиться в гемізиготному стані, вона є летальною. Генетичний аналіз показав, що мутації *Notch* властиве явище псевдомінантності. На рис. 11.13 показано, що за схрещування червоноокої (w^-) самки *Notch* з білооким (w) самцем у половини дочок

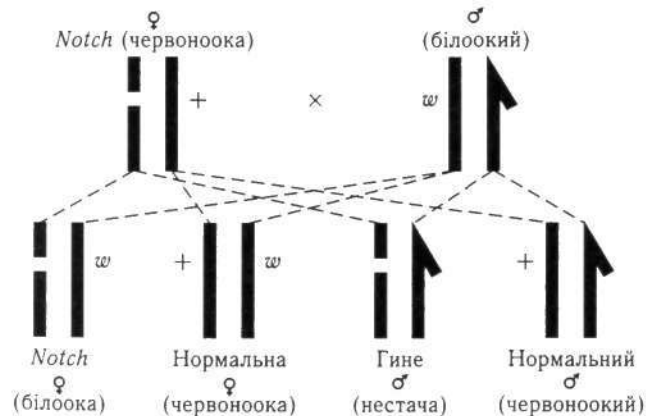


Рис. 11.13. Успадкування мутацій *Notch* і явище псевдомінантності у самок дрозофіли

Notch виявляється ознака білоокості, хоч ген цієї ознаки є рецесивним. За цих умов експресується також група інших рецесивних генів, що локалізована в гомологічній X-хромосомі напроти делеції *Notch*. Отже, зазначена мутація полягає у втраті цілої групи нормальних алелів в одній із X-хромосом, що й призводить до псевдомінантності.

домінування рецесивних генів гомологічної хромосоми. На політеничних хромосомах слинних залоз самок дрозофіли з мутацією *Notch* були проведені цікаві мікроскопічні спостереження. З'ясувалося, що за кон'югації гомологів нормальна X-хромосома утворює петлю із ділянки, яка гомологічна району делеції (рис. 11.14). Наявність таких петель є характерною цитологічною ознакою значних за розмірами делецій.

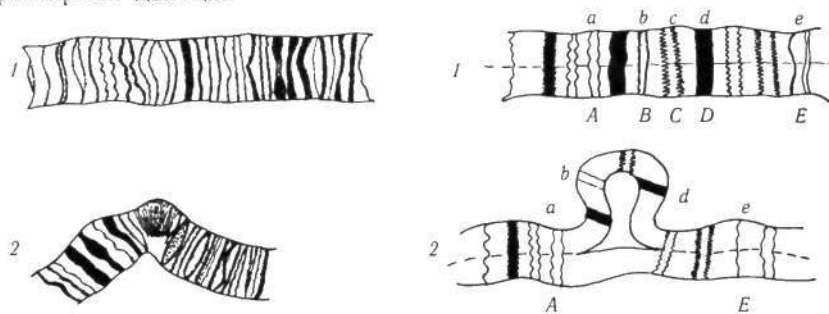


Рис. 11.14. Синапсис гомологічних хромосом за наявності нестачі в одній із них:

1 — нормальні хромосоми. 2 — в одній із хромосом виникла делеція генів *BCD*

Використовуючи нестачі різної довжини, вдалося локалізувати гени в окремих дисках гігантських хромосом. Це робиться методом використання різних делецій, які або повністю, або частково перекриваються.

Генетично знаходження досліджуваного рецесивного гена в районі делеції визначають за його проявом у гетерозиготи по делеції, тобто по наявності явища псевдомінантності. Щоб було зрозуміліше, розглянемо рис. 11.15, на якому показані різні за розмірами делеції, з допомогою яких були локалізовані гени в гігантських хромосомах дрозофіли. Делеція 258-11 включає в себе ділянку *3C*. За наявності цієї делеції у гетерозиготи виявляється псевдомінування по гену *w* (білі очі). До таких же наслідків призводить делеція 264-31, що локалізується в X-хромосомі значно правіше, але теж захоплює *3C*. В протилежність цьому, делеція 258-14 знаходиться за межами ділянки *3C*, і у гетерозиготи по цій делеції відсутня псевдомінантність рецесивного гена *w*. З цього видно, що ген *w* локалізується в ділянці *3C*.

Делеції порівняно невеликих розмірів передаються нащадкам через гетерозиготних особин; у гомозиготному стані вони, як правило, летальні. Однак у поліплоїдів нестачі компенсуються надлишковими геномами і фенотипово можуть не проявлятися. Так, на-

приклад, у тригеномного алополіплоїда — м'якої пшениці — виживають навіть ті рослини, у яких відсутні окремі хромосоми.

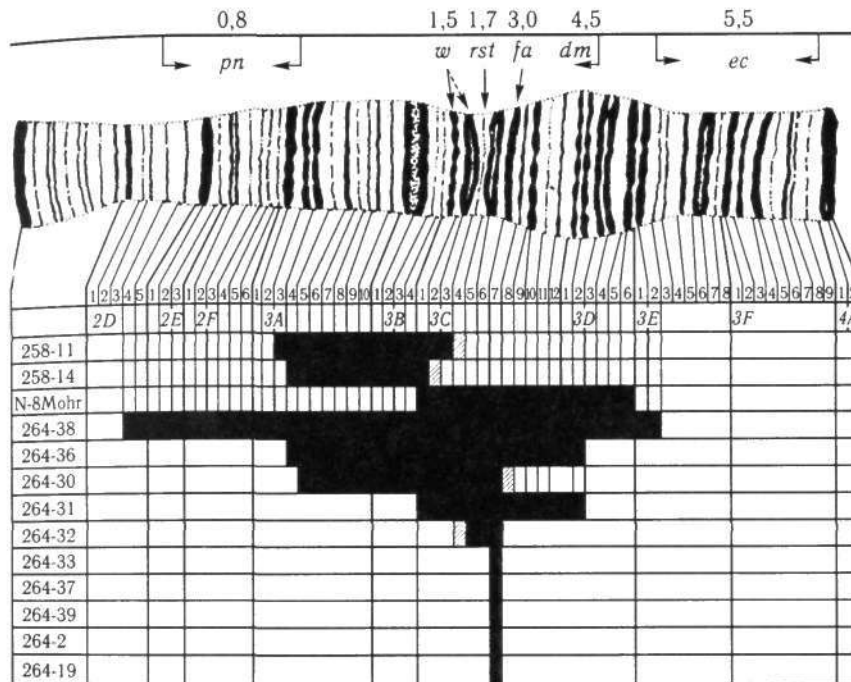


Рис. 11.15. Цитологічна і генетична карта однієї з ділянок лівого кінця X-хромосоми *D. melanogaster*:

Чорним позначено різні нестачі, з допомогою яких були локалізовані гени в дисках хромосом

Кінцеві нестачі або дефішенсії в зв'язку з їх термінальною локалізацією за кон'югації гомологічних хромосом не утворюють петель, але хромосома з делецією виявляється більш короткою. Такий тип делецій досить розповсюджений.

Слід зазначити, що делеції часто супроводжуються плеiotропним ефектом, що призводить до зниження загальної життєздатності особин.

Дуплікації

Прямою протилежністю нестачам слугують дуплікації окремих ділянок хромосом. Слово «дуплікація» буквально означає подвоєн-

ня, однак відомі випадки багаторазових повторів певної послідовності в одній хромосомі або в різних хромосомах. Це явище іноді називають мультиплікаціями або ампліфікаціями. Дупліковані ділянки часто утворюють тандем, тобто розташовуються одна за одною. Бувають обернені (або інвертовані) дуплікації, в цьому випадку послідовності нуклеотидів у сусідніх ділянках хромосоми прямо протилежні. Якщо дуплікація розташована на кінці хромосоми, то її називають кінцевою або термінальним повтором.

Класичним прикладом дуплікацій з фенотиповим виявом можна вважати мутацію *Bar* (*B*) в X-хромосомі *D. melanogaster*. Ця мутація виявляє неповне домінування, зменшуючи кількість фасеток ока. У самок, гетерозиготних по *Bar*, очі маленькі і щілевидної форми, у гомозигот і гемізигот по цій мутації очі ще менших розмірів. Мутація *Bar* виникає внаслідок дуплікації невеликого сегмента (57,0 сМ від кінця) X-хромосоми. Якщо цей сегмент (16 А) потроєно, то відповідне порушення називають *Double Bar* (подвійний *Bar*) або ультрабар (рис. 11.16).

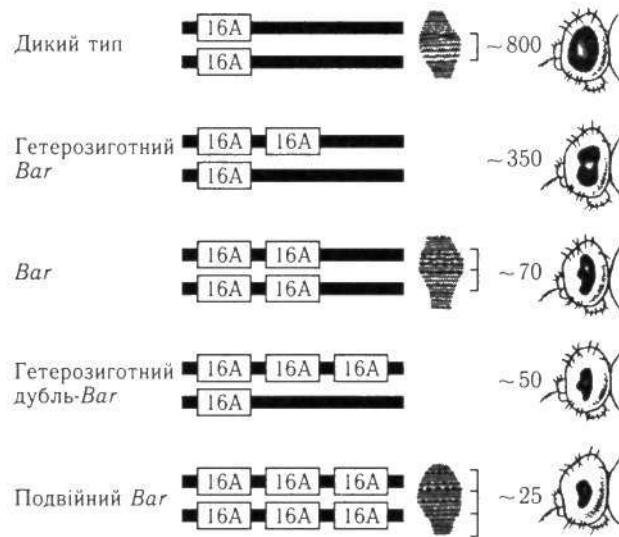


Рис. 11.16. Дуплікація ділянки 16 А в X-хромосомі *D. melanogaster* та розміри ока за різних генотипів *Bar*:

Цифрами зазначено кількість фасеток

На цитологічних препаратах гетерозиготність по дуплікаціях виявляється завдяки виникненню петель, аналогічних таким за де-

лецій (див. рис. 11.14). Зайві ділянки хромосоми, що утворюються внаслідок дуплікацій і не знаходять собі комплементарних ділянок у гомологічній хромосомі, за кон'югації випетлюються, що добре видно під час мейозу або в політенних хромосомах.

Дуплікації та інші повтори звичайно виявляють менш виразний негативний вплив на життєздатність особин у порівнянні з делеціями. Тому ідентичні або дуже подібні послідовності нуклеотидів можна знайти в хромосомах особин різних видів. Про наявність споріднених повторів у геномах різного походження і в негомологічних хромосомах свідчать факти комплементарного з'єднання певних ділянок гомологічних хромосом у міжвидових гібридів, а також наявність незначних ділянок синапсису в негомологічних хромосомах штучно отриманих гаплоїдних рослин. Це так звані **гомеологічні злучення хромосом**, наявність яких свідчить про широке розповсюдження в природі споріднених послідовностей ДНК. Останні в значній мірі пояснюються дуплікаціями, які створюють додатковий генетичний матеріал, що в подальшому змінюється шляхом мутацій та рекомбінацій.

Дуплікації порівняно незначних сегментів ДНК із декількох нуклеотидів, що входять до складу одного гена або сусідніх спейсерів, утворюються в процесі еволюції досить часто. Як вже зазначалося, повтори високої частоти, що складаються з олігонуклеотидних повторів, зосереджені головним чином у гетерохроматинових центромерних районах хромосом. Інші, більш довгі незначущі послідовності повторюються не так часто; вони розсіяні між унікальними послідовностями ДНК і транскрибуються разом з ними. Ділянки з високою і помірною повторністю нуклеотидів існують у генотипах багатьох представників тваринного і рослинного світу. Як відомо, у еукаріотів деякі структурні гени представлені в генотипі двома або й більшим числом однакових копій. Інші структурні гени виникли шляхом дуплікацій від спільного предкового гена, але в процесі еволюції накопичили деякі структурні відмінності і сьогодні кодують споріднені білки з різними функціями. Такі гени відносять до одного **сімейства генів**; прикладом можуть бути гени сімейства імуноглобулінів і глобінів. Отже, дуплікації грають істотну роль в еволюції геномів, бо вони причетні до створення додаткових ділянок генетичного апарату, функція яких може бути змінена мутаційним процесом і природним добром. Іншими словами, дуплікації та ампліфікації генетичного матеріалу — це один із шляхів еволюції генів. Шляхи еволюції деяких структурних генів у загальних рисах простежені. Як приклад наводимо схему генетичного визначення гемоглобінів людини (рис. 11.17) і гіпотетичний шлях філогенезу генів глобінів (рис. 11.18).

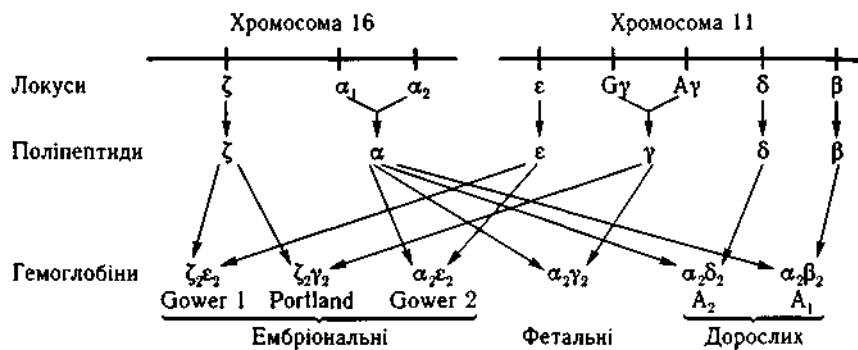


Рис. 11.17. Генетичне визначення гемоглобінів людини:
Грецькими літерами позначено гени глобінів і відповідні їм поліпептидні ланцюги

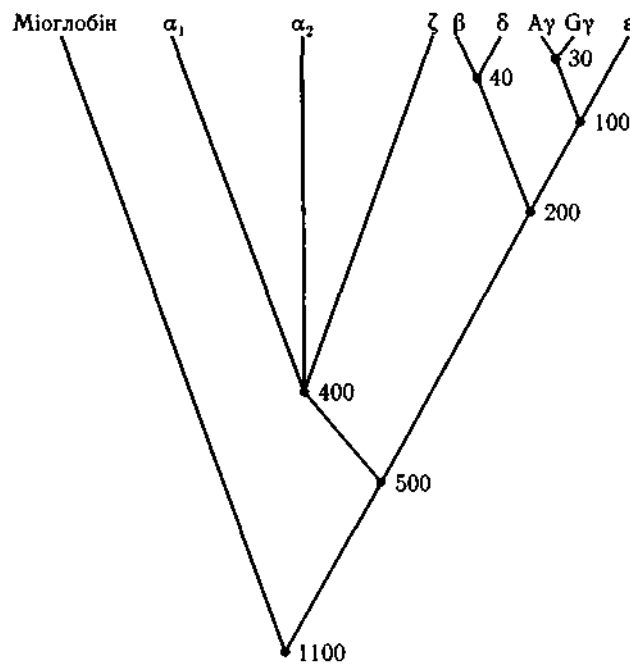


Рис. 11.18. Філогенетичне дерево генів глобінів:

Кружками позначено дуплікації предкових генів, що дали початок новим лініям еволюції. Цифрами позначено кількість мільйонів років, які сплинули з моменту дуплікації

Молекули гемоглобінів людини є тетрамерами, кожна молекула складається з двох поліпептидів одного типу і з двох — іншого. Поліпептиди одного з цих двох типів кодуються генами β -сімейства (хромосома 11), поліпептиди другого типу — генами α -сімейства (хромосома 16). Послідовність ДНК у цих генах і в проміжках між ними повністю розшифрована. Деякі гени утворюють пари, обидва члени яких у процесі еволюції стали практично ідентичними внаслідок конверсії: $\beta\gamma$ і $\alpha\gamma$ або α_1 і α_2 . Всі гени одного сімейства мають подібні послідовності ДНК і кодують схожі один на одного поліпептиди. Деяка подібність існує також між генами і поліпептидами різних сімейств, хоч вона і менша, ніж внутрішньосімейна. Проміжки між генами також містять дуже подібні послідовності ДНК. Все це переконує в тому, що гени глобінів є гомологічними, тобто вони виникли внаслідок послідовних дуплікацій одного предкового гена. Послідовність цих дуплікацій включає виникнення гена міоглобіну, хоч ступінь подібності між міоглобіном і гемоглобінами значно менша.

Зважаючи на дуже важливу роль дуплікацій у молекулярній еволюції, дуже актуальним є питання про можливі механізми дуплікацій та ампліфікацій генетичного матеріалу.

Чимало дуплікацій, як і делецій, виникає після локальних розривів хромосом. Причиною розривів можуть бути іонізуючі опромінення, дія деяких хімічних сполук та вірусів. Чимале значення при цьому мають деякі особливості будови і функціонування хромосом.

Дуплікації і делеції можуть бути наслідком хромосомних перебудов, що провокуються гетерозиготними інверсіями і транслокаціями, переміщенням у геномі мобільних генетичних елементів, факторів гібридного дисгенезу тощо. Такі ж порушення одночасно виникають за нерівного кросинговеру, основою для якого є наявність у хромосомах ідентичних повторів або дуже подібних нуклеотидних послідовностей. У цих випадках кон'югація гомологів у мейозі може відбутися неправильно, що спричиняє утворення гамет з дуплікаціями і делеціями. Саме таким способом (внаслідок нерівного кросинговеру) виникли у людини деякі форми гемоглобінів із численними замінами, серед яких — гемоглобіни Лепоре і анти-Лепоре.

Гемоглобін Лепоре є наслідком нерівного кросинговеру між поруч розташованими в хромосомі 11 генами для δ - і β -ланцюгів (рис. 11.19). Продукт новоутвореного гена — глобін з N-термінальною частиною δ - і C-термінальною частиною β -глобіну. Реципроним продуктом такої помилкової рекомбінації вважають знайдений у деяких хворих гемоглобін анти-Лепоре.

Ще одним способом збільшення кількості генних повторів у хромосомах вважають вибіркиму локальну реплікацію певних ділянок ДНК, що являються окремими репліконами.

Деякі повтори генів можуть виникати за межами ДНК хромосом. Суть явища полягає у тому, що частина генів вилучається із хромосоми в ядерний сік, замикається в кільце, і продовжує

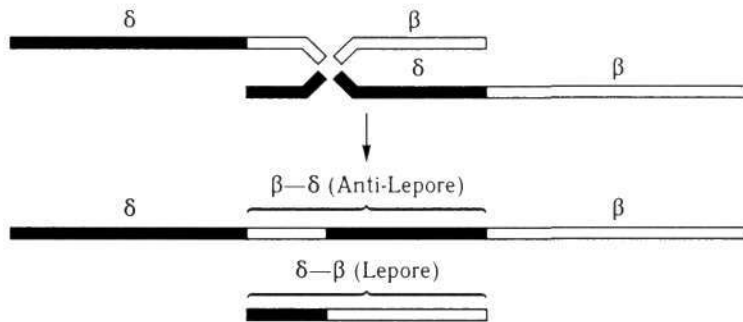


Рис. 11.19 Можливий механізм утворення гемоглобінів Lepore внаслідок нерівного кросинговеру

автономно реплікуватися по типу кільця, що котиться. Саме такий спосіб ампліфікації вперше був виявлений для генів рРНК ооцитів жаб, у яких кількість рибосом в яйцеклітині дуже велика — біля 10^{12} . У подальшому така позахромосомна ампліфікація рДНК була виявлена не тільки у земноводних, але й у двостулкових молюсків, комах, в регенеруючих тканинах тварин, в клітинах ростучої ацетабулярії тощо. Цікаво, що кільцеві молекули ДНК, що являють собою копії генів, після їх розмноження в ядерному соці або навіть у цитоплазмі, можуть вбудовуватись у ДНК хромосом шляхом кросинговеру, збільшуючи тим самим ступінь ампліфікації хромосомних генів. Вже зазначалося, що багаторазові повтори (кластери) генів рРНК, гістонів, тРНК та інших є нормальним явищем для еукаріотних організмів. Цікаво, що ампліфікація генів, як правило, супроводжується збільшенням частоти кросинговеру.

Багаторазові повтори (ампліфікації) деяких ділянок хромосом можна отримати штучно з допомогою колхіцину, метатрексату, іонів важких металів та ін. В цих випадках ампліфікуються гени, що підвищують стійкість до діючих токсичних речовин. За дії, наприклад, метатрексату як селективного агента кількість генів дигідрофолатредуктази, яка зв'язує метатрексат, може зростати в геномі тварин до декількох сотень і більше. Внаслідок цього стійкість до метатрексату може зрости у десятки тисяч разів. У відсутність селективного агента такі численні повтори виявляються нестабільними і набута резистентність до даної отрути швидко втрачається. Таким чином, дуплікації грають важливу роль не тільки в еволюції

генів. — вони дуже важливі як один із механізмів онтогенетичної адаптації.

11.6.3. *Перебудови хромосом, що змінюють локалізацію генів*

До цієї групи відносять хромосомні мутації, що призводять до зміни локалізації окремих генів та порядку їх розташування (зчеплення) в хромосомах. Серед них важливе місце займають інверсії, транслокації, транспозиції. Ці хромосомні перебудови супроводжуються переміщенням генів у геномі, внаслідок чого гени попадають у зовсім інше оточення. Зміни фенотипу, що виникають у відповідь на зміну генного оточення кодуєчого гена, називають **ефектом положення**. Останній у першу чергу впливає на вияви взаємодії генів, наприклад, на явище домінування.

Ефект положення може бути стабільним і нестабільним або мозаїчним. Якщо, наприклад, у дрозофіли нормальний алель w^+ із Х-хромосоми перенести в гетерохроматинну ділянку іншої хромосоми, то у гетерозигот w^+/w алель w^+ проявляється не в усіх фасетках і очі стають мозаїчними.

До стабільного ефекту положення відносять такий ефект, за якого нормальний алель у зміненому геномному оточенні стабільно зберігає свій зовнішній вияв. Прикладом може бути зміна домінування гена *ci* (*cubitus interruptus*), який знаходиться в 4-й хромосомі дрозофіли. Рецесивний алель цього гена в гомозиготному стані викликає переривчастість кубітальної жилки крила. Якщо ж у 4-й хромосомі безпосередньо біля нормального домінантного алеля ci^+ здійснюється розрив і обмін фрагментами з іншою хромосомою (транслокація), то цей домінантний алель не спрацьовує, і всі гетерозиготи ci^+/ci мають рецесивний фенотип (перервану кубітальну жилку).

Підвищену мутабільність деяких генів можна пояснити особливостями їх локалізації у хромосомі. Доведено, що чимало мутантних фенотипів, у тому числі і людини, є наслідком незначних хромосомних порушень (мікроінверсій, мікроделецій, мікродуплікацій), які відбуваються поруч з відповідним нормальним геном. Ще більш виразним ефект положення може бути за більш серйозних хромосомних перебудов — інверсій, транслокацій і транспозицій.

Інверсії

Інверсії — це перебудови хромосом, в основі яких лежить утворення петлі з наступним її поворотом на 180° і з відповідною

зміною порядку розташування генів. При цьому ні кількість хромосом, ні кількість генів у кожній хромосомі не змінюються. Якщо послідовність генів у вихідній хромосомі позначити як $ABCDEF$, то після інверсії сегмента BCD у тій же хромосомі гени будуть розташовані в порядку $ADCBEF$. Коли в інвертовану послідовність входить центромера, то таку інверсію називають **перичентричною**, якщо ж центромера не входить в інвертовану ділянку, то це — **парацентрична** інверсія.

Обидва типи перебудов призводять до характерних цитологічних і генетичних порушень. Вони особливо виразні, коли інверсія знаходиться в гетерозиготному стані. В цьому випадку для синапсису гомологічних хромосом необхідно утворення петлі, яка утримує взаємно інвертовані послідовності (рис. 11.20). Якщо за аналізу цитологічних препаратів на стадії пахітени виявляються згадані пет-

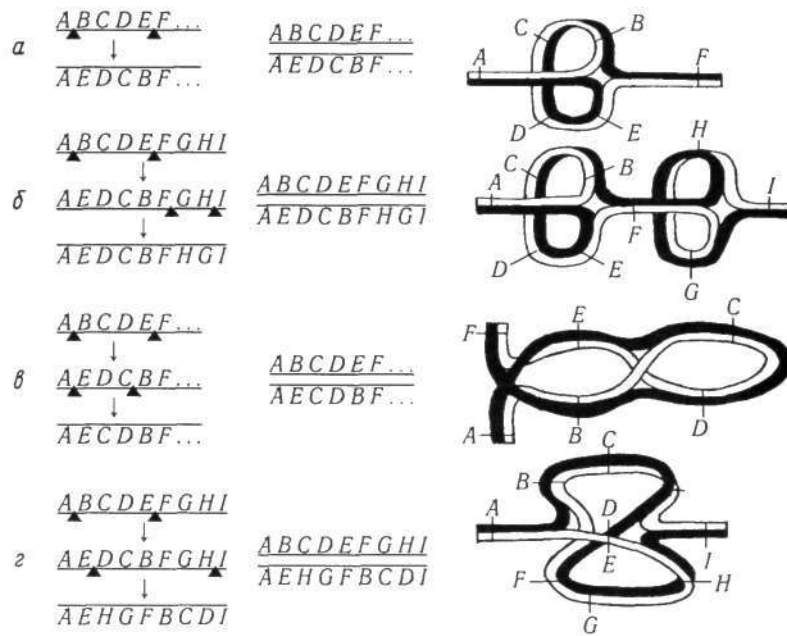


Рис. 11.20. Можливі типи інверсій:

a — однакова інверсія; *б* — інверсії «низкою»; *в* — повністю перекриті інверсії; *з* — частково перекриті інверсії

лі, то це свідчить про гетерозиготність по інверсіях. Подібні структури спостерігаються також у політенних хромосомах (рис. 11.21).

Наявність інверсій можна визначити і генетично, бо в стані гетерозиготності вони сильно пригнічують або повністю подавляють генетичну рекомбінацію. Слід зазначити, що парацентричні і перичентричні інверсії по-різному проявляють себе в процесі кросинговеру.

У випадку парацентричної інверсії за одиночного кросинговеру в мейозі утворюється чотири хроматиди, із яких одна буде з двома центромерами (дицентрик), одна — зовсім без центромери (фрагмент), а дві будуть батьківськими — це ті, яких кросинговер не зачепив (рис. 11.22).

Хроматидний дицентрик або випадає з анафази мейозу, або одночасно розтягується до протилежних полюсів (клітинних центрів), утворюючи характерну цитологічну



Рис. 11.21. Ділянка політенної хромосоми третьої пари у личинки *D. pseudoobscura*, гетерозиготної по парацентричній інверсії (за Айала, Кайгер)

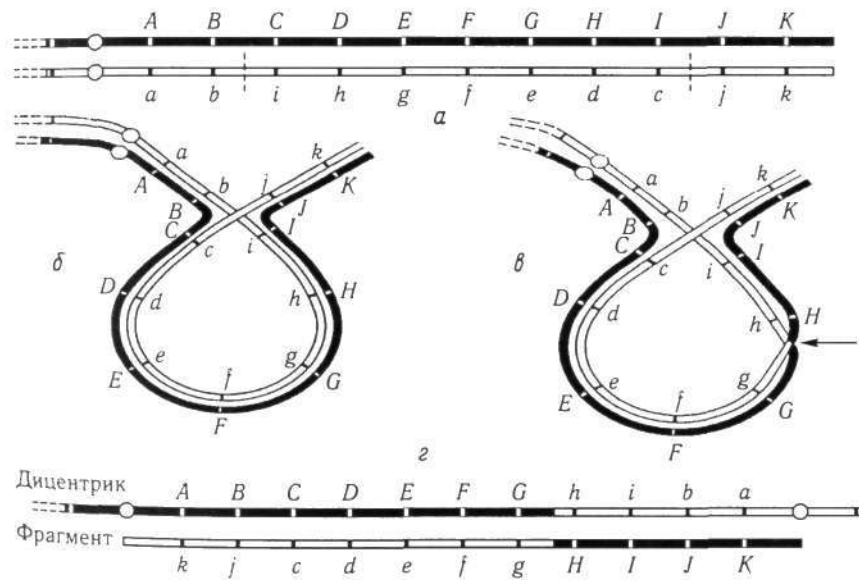


Рис. 11.22. Схема кон'югації нормальної хромосоми з її гомологом, що містить парацентричну інверсію:

a — нормальна хромосома і гомолог з інверсією; *b* — кон'югація між ними; *в* — кросинговер між ними (місце перехрестя позначено стрілкою); *z* — кросоверні хромосоми. Буквами позначено умовні гени

структуру — «міст», який врешті рещт розривається. Шматки розірваного дицентрика попадають у дочірні ядра і разом з усіма іншими хромосомами репродукуються. З'ясувалося, що увесь цей час місця розривів дицентрика зберігають здатність до воз'єднання з іншими фрагментами. Тому в дочірніх клітинах після подвоєння хромосом ці неповноцінні сестринські хроматиди можуть об'єднуватися і утворювати новий дицентрик, а в подальшому — «міст».

Інший реципроний продукт рекомбінації — безцентромерний фрагмент — у процесі мейозу втрачається. В результаті із чотирьох хроматид повноцінними будуть лише дві — ті, що не вступали в рекомбінацію.

До іншого результату одиночний кросинговер приводить у випадку гетерозигот по перичентричній інверсії (рис. 11.23). У цьому випадку із чотирьох хромосом, що виникають внаслідок мейотичних

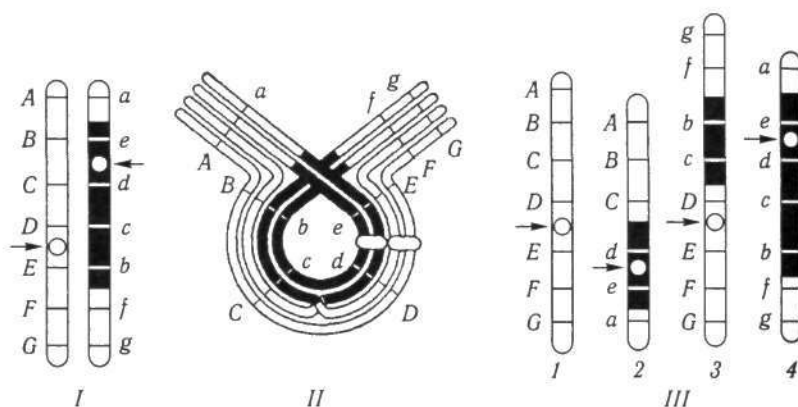


Рис. 11.23. Кросинговер з утворенням петлі у гетерозиготі по перичентричній інверсії:

I — структура гетерозиготі по інверсії (інвертована ділянка — чорна); *II* — кон'югація гомологів і кросинговер на стадії чотирьох хроматид; *III* — утворення хромосом: *1, 4* — некросоверні хромосоми (батьківський тип); *2, 3* — кросоверні хромосоми з дуплікаціями і нестачами

поділів, дві також можуть залишитися поза кросинговером, а дві інші містити делеції одних генів і дуплікації інших. В протилежність парацентричним інверсіям перичентричні ніколи не дають дицентромерних та ацентромерних хромосом, а, отже, мостів і фрагментів. Зате перичентричні інверсії спричиняють утворення хроматид з дуплікаціями і нестачами. Отже, особини, гетерозиготні з парацентричних чи з перичентричних інверсій, повноцінних реком-

біантних хромосом не утворюють. Виняток з цього складають випадки з подвійними кросоверами, бо якщо в середині інвертованої ділянки трапляється подвійний обмін, то в дочірніх хромосомах зберігається повний набір генів без делецій і дуплікацій. Життєздатність гамет і виникаючих із них зигот може зберігатись і тоді, коли втрачені або дупліковані під час кросинговеру ділянки хромосом дуже малі і не грають життєво важливої ролі.

Гетерозиготні по інверсіях організми, як правило, бувають напівстерильними, бо половина виникаючих внаслідок кросинговеру хромосом, а, отже, й гамет, не життєздатні. Існують, однак, і винятки. У самців дрозофіли у мейозі кросинговер не відбувається. Тому плодючість гетерозиготних по інверсіях самців цілком нормальна. У самок дрозофіли аномальні хромосоми елімуються в полярних тільцях. Тому наявність у самок парацентричних інверсій у гетерозиготному стані не впливає на їх фертильність. У інших представників двокрилих, наприклад у *Chiromonus*, сперматозоїди з дефектними хромосомами не приймають участі у заплідненні, тому чисельність нащадків у гетерозиготних по інверсіях самців не падає.

Інверсіям часто властивий рецесивний летальний ефект, тому вони рідко зберігаються в гомозиготному стані, і звичайно їх виявляють у гетерозиготі. Проте зустрічаються і такі інверсії, які не пов'язані з летальним ефектом. У особин, гомозиготних по нелетальних інверсіях, змінюється послідовність зчеплення генів, але кон'югація хромосом і наступна рекомбінація здійснюються нормально. Однак схрещування таких гомозигот з представниками дикого типу може привести до гетерозиготності по інверсіях з усіма її негативними наслідками. Вважають, що інверсії можуть слугувати факторами ізоляції і сприяти еволюційній дивергенції нових форм у межах даного виду. Все це може бути передумовою подальшої перебудови морфології хромосом.

За перицентричних гомозиготних інверсій конфігурація хромосоми істотно змінюється, якщо кінці інвертованої ділянки мають різні лінійні розміри по обидві сторони від центромери. Як крайність метацентрична хромосома може перетворитися в акроцентричну і навпаки (рис. 11.24). Не виключено, що перицентричні інверсії є причиною деяких змін у конфігурації хромосом, що трапилися за еволюції. Так, наприклад, у людини 17-та хромосома акроцентрична, тоді як відповідна хромосома у шимпанзе — метацентрична. Деякі інші хромосоми людини (2, 4, 5, 12) також відрізняються від хромосом шимпанзе перицентричними інверсіями.

Хромосома може містити не одну інверсію, але й декілька, які можуть не перекриватись або перекриватись повністю чи частково

(див. рис. 11.20). Всі ці варіанти можна диференціювати цитологічно під час мейозу.

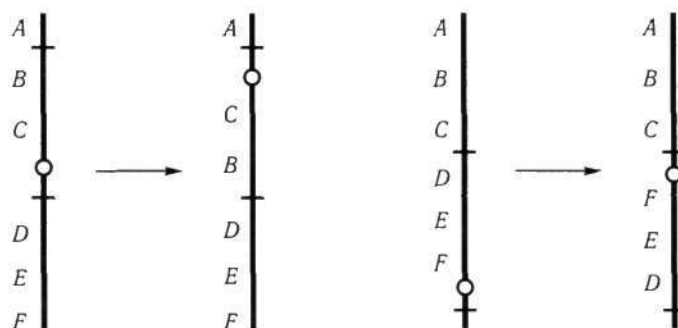


Рис. 11.24. Зміна конфігурації хромосом за перичентричних інверсій:

Горизонтальними рисами виділено ділянку хромосоми, яка інвертується

Важливим генетичним наслідком інверсій є їх здатність пригнічувати кросинговер, якщо інверсії гетерозиготні і досить значні. Цю властивість інверсій використовують для створення збалансованих ліній, гетерозиготних по летальних мутаціях. У цих ліній відсутній кросинговер між певними хромосомами, що дає можливість використовувати ці лінії в наукових дослідженнях. Хромосому, яка утримує декілька інверсій, що перекриваються і запобігають рекомбінації з гомологічною хромосомою, і, крім того, містить маркерну домінуючу мутацію, називають **балансуючою**. Вже зазначалося (розділ 11.4.2), що збалансовані лінії дрозофіли (*CyL/Pm*, Мелер-5) використовують для з'ясування наявності деяких рецесивних мутацій у X-хромосомах та аутозомах досліджуваних дрозофіл. Крім того, з допомогою подібних збалансованих ліній можна синтезувати нові генотипи з пересадженими від інших мух хромосомами.

Інверсії часто зустрічаються в природних популяціях і можуть бути отримані експериментально внаслідок впливу іонізуючих опромінь та хімічних сполук. Вважають, що інверсії грають важливу роль у дивергенції видів. Порівняльне вивчення структури політенних хромосом роду *Drosophila* показало, що окремі раси одного виду і особливо різні види дрозофіл утримують чимало інверсій, як таких, що перекриваються, так і таких, що локалізуються в різних місцях хромосом. Цим підтвержується думка про те, що інверсії є факторами біологічної ізоляції і еволюційної дивергенції у природі.

Транслокації

Крім розглянутих внутрішньохромосомних перебудов, існують і такі, що одночасно охоплюють дві або й більшу кількість негомологічних хромосом. До таких перебудов відносяться **транслокації** — *реципрокні обміни між негомологічними хромосомами*. В результаті такого обміну у гомозигот по транслокаціях у порівнянні з вихідними хромосомами змінюється структура хромосоми: гени, що були у вихідних хромосомах зчепленими, виявляються незчепленими і навпаки. Якщо позначити послідовність генів у двох негомологічних хромосомах як *ABCDEF* і *GHIJKL*, то після акту реципрокної транслокації двох кінцевих генів ці послідовності можуть змінитися на *ABCDKL* і *GHIJEF*.

Залежно від того, які за будовою хромосоми вступають у реципрокні обміни і якими ділянками вони обмінюються, розрізняють дві найбільш типові різновидності транслокацій:

1. **Симетричні**, за яких центромерна ділянка однієї хромосоми з'єднується з ацентромерною ділянкою іншої. В цьому випадку кожна транслокована хромосома утримує одну центромеру і новий варіант зчеплених генів.

2. **Асиметричні**, коли з'єднуються центромерні або ацентромерні ділянки негомологічних хромосом, внаслідок чого утворюються дицентрики, трицентрики тощо, а також ацентромерні фрагменти, які згодом елімінуються.

Отже, за транслокацій, незалежно від їх характеру, змінюється склад груп зчеплення генів, але не буває кількісних порушень генетичної інформації, що властиве делеціям і дуплікаціям. Реципрокні обміни можуть відбуватися як між двома негомологічними хромосомами, так і більшою їх кількістю. В усіх цих випадках спостерігаються досить характерні цитологічні та генетичні порушення, наявність яких дає змогу розпізнати ту чи іншу транслокацію. *Якщо одна з хромосом гомологічної пари є транслокованою, а друга зберігає звичайну послідовність генів, то це — гетерозигота по транслокації*. Якщо ж структура гомологічних хромосом однакова після реципрокних обмінів, то має місце гомозиготність по транслокаціях. Транслокації, які щойно виникли, в гомозиготному стані часто супроводжуються летальним ефектом; в інших випадках у зв'язку із змінами в групах зчеплення вони можуть істотно впливати на вияви тих чи інших ознак. У гетерозигот по транслокаціях гени обох транслокованих негомологічних хромосом успадковуються як гени однієї групи зчеплення, і лише за таких умов можуть утворитися життєздатні спори і гамети з повним батьківським набором генів.

На цитологічних препаратах у гетерозигот по транслокаціях у профазі I мейозу можна спостерігати характерну структуру — хрест. Її поява пов'язана з тим, що гомологічні ділянки транслокованих хромосом взаємно притягуються в зиготені (рис. 11.25).

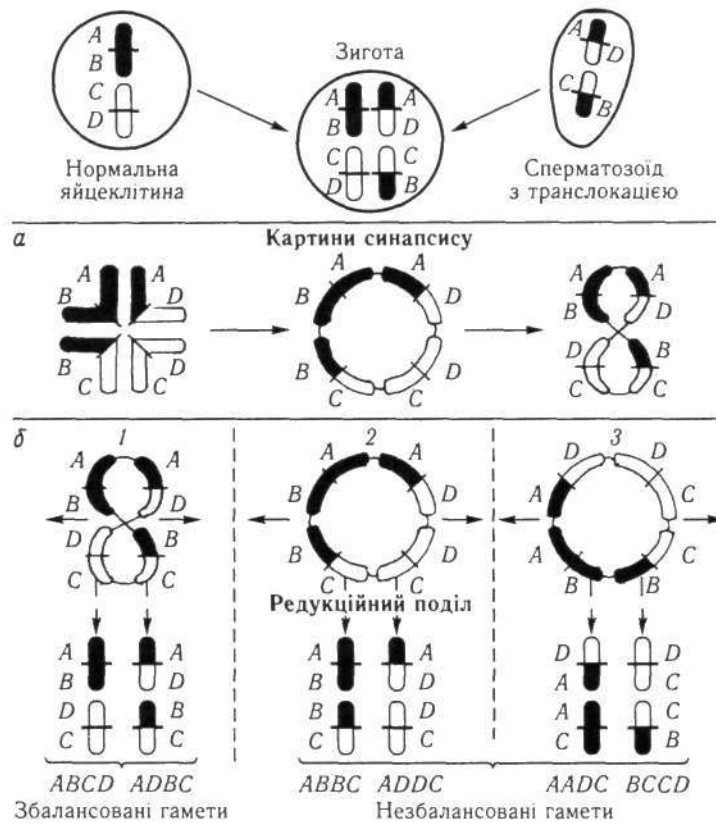


Рис. 11.25. Картини синапсису хромосом і продукти мейозу за гетерозиготних транслокацій:

1 — утворення збалансованих гамет у випадку розташування хромосом у мейозі у вигляді вісімки; 2 і 3 — утворення незбалансованих гамет у випадку розташування хромосом у вигляді кільця. Стрілками показані послідовність цитологічних змін (а) та напрямки розходження хромосом (б)

Замість бівалентів, тобто пари кон'югуючих хромосом, виникають квадриваленти, що складаються з чотирьох частково гомологічних хромосом — двох незмінених і двох транслокованих. В діакінезі

хіазми «сповзають» від центромер до кінців хромосом і хрест перетворюється в кільце. Іноді кільце перекручується і виникає фігура типу вісімки. Саме такий тип розташування хромосом сприяє утворенню життєздатних збалансованих гамет (рис. 11.25), бо в цьому випадку до одного полюса відходять або обидві змінені хромосоми, або обидві незмінені. Якщо ж хромосоми утворюють просте неперекручене кільце, то незалежно від напрямку їх розходження в діакінезі гамети матимуть незбалансовані геноми: в них одні гени повторюються, інші із них відсутні (дуплікації та нестачі). Таким чином, із шести можливих типів гамет, зображених на рис. 11.25, тільки два (вони на ристунку зліва) утримують компоненти вихідного набору хромосом у повному складі, що і є умовою їх збалансованості і життєздатності.

Реципрокні обміни можуть займати дві і більше пар хромосом. У метафазі утворюється кільце з чотирьох елементів внаслідок одної транслокації, кільце із шести елементів, якщо трапилося дві транслокації між трьома парами хромосом, і восьмичленне кільце — за транслокацій між чотирма групами зчеплення (рис. 11.26).

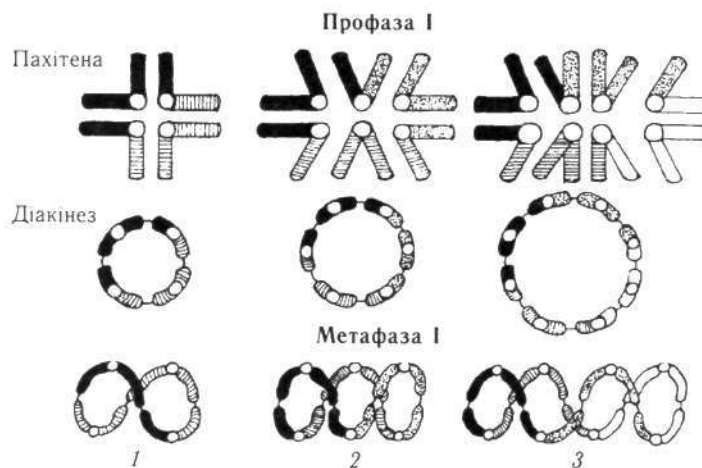


Рис. 11.26. Синапсис хромосом у *Oenothera* за наявності транслокацій:

1 — утворення кільця за однієї транслокації, 2 — за двох транслокацій; 3 — за трьох транслокацій

У багатьох рас *Oenothera* утворюються кільцеві комплекси із чотирьох і більшої кількості хромосом. Так, наприклад, у *Oenothera lamarckiana* в мейозі одночасно кон'югують 12 хромосом, що несуть реципрокні транслокації, і лише одна пара нетранслокованих хро-

мосом утворює бівалент. Із-за утворення таких складних комплексів порушується вільне комбінування хромосом за редукційного поділу, і тому розщеплення нащадків за фенотипом відрізняється від менделівського.

Слід зазначити, що гетерозиготи по транслокаціях серед тварин зустрічаються не часто, проте вони дуже розповсюджені у рослинному світі, для багатьох представників якого вони є нормою. Ступінь стерильності гетерозигот по транслокаціях дуже різний. За однакової ймовірності всіх трьох типів розходження хромосом у мейозі (рис. 11.25) із шести різних сортів гамет, що утворюються у гетерозигот по одній транслокації, тільки $\frac{1}{3}$ гамет, тобто два їх типи, виявляються життєздатними. Однак у багатьох рослин, гетерозиготних по транслокаціях, ступінь фертильності значно вищий, що пояснюється особливостями орієнтації кільцевих хромосомних комплексів на веретені в метафазі I. У кукурудзи орієнтація хромосом у вигляді вісімок трапляється з частотою біля 50%, що забезпечує утворення 50% фертильних гамет. Ще більш висока фертильність гетерозигот по транслокаціях у дурману, пшениці, ячменю, томатів. Для енотери, півонії, дурману та інших рослин наявність у генотипі гетерозиготних транслокацій є нормою. Досить часто транслокації виявляються також у деяких представників тваринного світу — наприклад, у коників і скорпіонів.

Вважають, що, подібно інверсіям, транслокації сприяють ізоляції нових форм і дивергенції в межах виду.

Вивчення транслокацій має не тільки теоретичне, але й практичне значення. Відомі приклади використання транслокацій для раннього розпізнавання статі у тутового шовкопряда, для отримання цитологічних доказів явища кросинговеру (розділ 8.2.2). Слід зважити і на те, що отримання шкідливих комах із штучно визваними транслокаціями за умови масового випуску мутантів у природні комплекси може бути ефективним засобом боротьби з шкідниками (О. С. Серебровський), бо схрещування мутантних і диких форм цього шкідника у природі дає нежиттєздатних нащадків із-за порушень мейозу у гібридних форм.

Транспозиції. Загальна характеристика

Транспозицією називається нереципрокне переміщення генетичного матеріалу в межах однієї хромосоми або між хромосомами. Транспозиції можуть бути спрямованими, за яких переміщення генетичного матеріалу здійснюється лише в певні місця геному, і неспрямованими, коли такі переміщення можливі в будь-які за будовою ділянки хромосом. Неспрямовані транспозиції відбува-

ються
руючих
локалізацію

(),

Краще

ДНК-копії

RecA-залежних

RecABC,

(10^{-4} 10^{-7})
()

інсерції

в
них інсерцією

Порушення
являють
ся

транспозиції істотно відрізняються від точкових мутацій гена. Переміщення МГЕ може супроводжуватися численними перебудовами хромосом — інверсіями, розривами, делеціями сегментів, транслокаціями, актами рекомбінацій у сайтах розташування гомологічних МГЕ тощо. Саме такі численні порушення відбуваються під час «мутаційного вибуху», що характеризує гібридний дисгенез у дрозофіли.

Існує багато типів транспозибельних елементів як у прокаріотів, так і у еукаріотів, однак певні риси будови і поведінки для них є спільними. Серед них:

1. Більшість МГЕ являє собою автономні генетичні одиниці, які кодуєть білки, необхідні для транспозиції (фермент транспозазу та ін.). Деякі з МГЕ (наприклад, складні транспозони бактерій) можуть містити також гени резистентності до антибіотиків та інші гени.

2. На кінцях кожного МГЕ локалізовані короткі (у прокаріотів) або більш значні (у еукаріотів) інвертовані або прямі нуклеотидні повтори, що мають повну або часткову гомологію. Завдяки останній, деякі МГЕ, принаймні у еукаріотів, здатні переміщуватись за допомогою рекомбінаційних механізмів.

3. МГЕ можуть містити по декілька сигналів початку і кінця транскрипції і трансляції, що призводить до синтезу декількох транскриптів і поліпептидів. Функція останніх не завжди з'ясована.

4. Кожний МГЕ зліва і справа обмежений (фланкований) великим прямим повтором від 4 до 9 п. н. Ця дуплікація не є частиною транспозибельного елемента, а являє собою повтор сайтамішені, в який вбудовується цей елемент.

5. Більшість МГЕ мають декілька або безліч сайтів-мішеней в геномі. Деякі віддають перевагу так званім «гарячим» точкам. Хоч сайти інсерцій можуть вибиратися випадково, все ж є ділянки геному, в які МГЕ вбудовуються частіше. Ця регіональна специфічність ще не знайшла переконливого пояснення. Важливо, що на молекулярному рівні вибір мішені, як правило, не залежить від нуклеотидної послідовності.

Наявність рухомих генетичних елементів є загальною властивістю всіх організмів. Виникає питання, чи можуть вони виконувати корисні для організмів функції. Одна із гіпотез полягає в тому, що принаймні деякі МГЕ представляють «егоїстичну» ДНК, яка забезпечує лише своє власне розмноження без будь-якої корисної функції для свого носія. Однак є чимало даних, що рухомі генетичні елементи сприяють залученню в геном нових генів. Так, наприклад, інтеграція *F*-плазмиди в хромосому кишкової палички здійснюється завдяки *RecA*-залежній рекомбінації, яка відбувається

між кільцевими ДНК в сайтах розташування однакових *IS*-елементів (рис. 11.27). Подібна рекомбінація між плазмідними і геномними ДНК може мати суттєве значення для розповсюдження генів

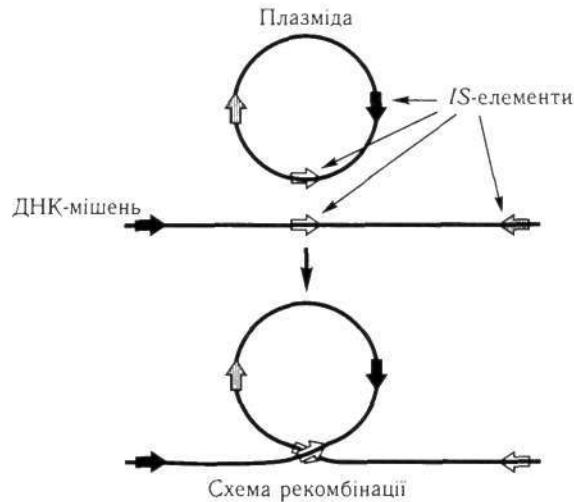


Рис. 11.27. Механізм інтеграції деяких плазмід:

Гомологічна рекомбінація між однаковими *IS*-елементами плазмиди і хромосоми призводить до вбудовування плазмиди у хромосому. Зазначений процес є зворотним

резистентності до антибіотиків, сульфаніламідів і т. п. Інша можлива функція МГЕ може бути пов'язана з їх здатністю провокувати найрізноманітніші хромосомні перебудови, наприклад сусідні делеції та інверсії. Це може бути важливим механізмом виникнення внутрішньовидової мінливості хромосомних структур. Геноми клітин або фагів іноді використовують МГЕ як елемент регуляції. В цьому випадку МГЕ стає стабільним, однак приймає участь у специфічних подіях, подібних транспозиції. Регуляція деяких процесів (наприклад, зміна типів флагеліну джгутиків у салмонел, поверхневих антигенів у деяких бактерій, здібності фага *Mu* до вибору клітин хазяїна) полягає в інверсії специфічного сегмента ДНК, який здійснюється рекомбінаційним механізмом, пов'язаним з транспозицією. Таким чином, транспозиції приймають участь у цілому ряді подій — від з'єднання негомологічних послідовностей ДНК до забезпечення специфічних рекомбінаційних процесів.

Щодо механізмів переміщення різних типів МГЕ по хромосомах, то можливі такі варіанти:

1. **Реплікативна** транспозиція — транспозибельний елемент реплікується і копія його переноситься на нове місце. Цей механізм найбільш розповсюджений.

2. **Нереплікативна** (консервативна) транспозиція — МГЕ виризається і переноситься в новий сайт.

3. **РНК-опосередкована** транспозиція, за якої в хромосому вбудовується копія МГЕ або інший сегмент ДНК, що синтезується шляхом зворотної транскрипції на РНК-матрицях.

Молекулярна організація, а також механізми транспозиції МГЕ прокаріотів і еукаріотів, крім спільних рис, мають і свої особливості, в зв'язку з чим з ними краще познайомитись окремо.

Мігруючі генетичні елементи (МГЕ) прокаріотів

Хоч деякі автори всі МГЕ, незалежно від їх походження і будови, називають транспозуючими елементами або **транспозонами**, значно частіше цей термін вживають у відношенні прокаріотів. Транспозони бактерій поділяють на типи незалежно від їх будови. Група найпростіших транспозонів, що утримують лише гени, необхідні для транспозиції, отримала назву інсерційних послідовностей або **IS-елементів** (від англ. *insertion sequences* — послідовності-вставки). Розміри цих елементів — від 200 до 5700 п. н. На їх кінцях розташовані, як правило, інвертовані повтори, необхідні для транспозиції (рис. 11.28). У різних IS-елементів довжина кінцевих повторів коливається від 8 до 40 п. н. Повтори можуть бути повністю ідентичними (**досконалими**) або не зовсім ідентичними (**недосконалими**).

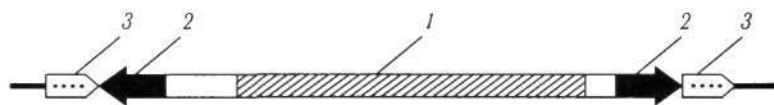


Рис. 11.28. Загальна структура IS-елемента:

1 — ген (або гени), що кодує транспозазу, необхідну для переміщення IS; 2 — короткі кінцеві інвертовані повтори; 3 — дублікація ДНК-мішені, яка виникає за вбудування IS-елемента

ми). Вбудовуючись у нову ділянку локалізації, IS-елементи спричиняють незначну дуплікацію ДНК-мішені — часто 5 або 9 п. н. Ці дупліковані послідовності хромосоми-мішені є прямими і оточують IS-елемент на новому місці. IS-елементи різних типів позначають номерами: IS1, IS2 і т. п. Ці елементи є нормальними компонентами бактеріальних хромосом і плазмід. Наприклад, один із стандартних штамів кишкової палички містить вісім копій IS1 і п'ять

копій *IS2*. В *F*-факторі цієї бактерії знайдено два *IS3*, один *IS2* і ще один елемент — $\gamma\delta$. Саме по сайтах знаходження цих мігруючих елементів і здійснюється рекомбінація, коли *F*-фактор інтегрується з хромосоною *E. coli*, утворюючи *Hfr*-штами. Залежно від того, які елементи хромосоми і *F*-плазмиди взаємодіють за процесу рекомбінації, виникають різні *Hfr*-штами з неоднаковою локалізацією у хромосомі інтегрованого *F*-фактора. Переважна більшість *IS*-елементів містить одну протяжну кодуєчу область (для транспозази та інших білків транспозиції), яка починається посеред одного інвертованого повтору і закінчується перед іншим (або в середині його). Іноді існують кодуєчі ділянки і в протилежному ланцюгу ДНК, в цьому випадку інформація зчитується у зворотному напрямку.

Деякі транспозони, крім генів, пов'язаних з транспозицією, несуть також гени лікарської стійкості та інші гени. Такі транспозони називають **складними** і позначають як Tn з відповідними номерами (Tn3, Tn5, Tn9 і т. п.).

Один клас транспозонів, що має досить великі розміри, містить центральну область, де, крім іншого, є ген лікарської стійкості, і довгі кінцеві повтори (LTR) або плечі з обох боків, де локалізовані гени білків транспозиції. Плечі можуть мати одну і ту ж або (частіше) інвертовану орієнтацію. Отже, такий складний транспозон за своєю будовою відповідає одній із представлених на рис. 11.29, а схем.

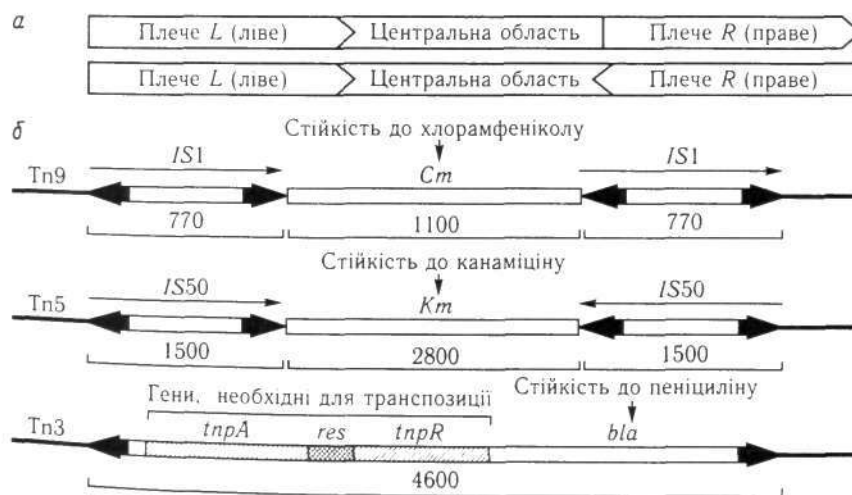


Рис. 11.29. Загальні принципи будови складних бактеріальних транспозонів (а) та схеми структурної організації деяких із них (б)

Іноді плечі являють собою ідентичні *IS*-елементи (рис. 11.29, б). Так, наприклад, Tn9 на кожному із кінців утримує прямі повтори *IS1*-елементів. В інших випадках плечі складного транспозону нагадують *IS*-елементи, але у вигляді самостійних структур у геномі не зустрічаються. Їх називають *IS*-подібними елементами. Якщо *IS*- або *IS*-подібні елементи є частинами складних транспозонів, то вони називаються *IS*- або *IS*-подібними модулями. Деякі складні транспозони мають іншу будову і нагадують *IS*-елементи, що одночасно несуть гени білків транспозиції і інші, додаткові гени. Прикладом може бути Tn3 (рис. 11.29, б).

Вважають, що два *IS*-елементи здатні перемістити будь-яку послідовність нуклеотидів, що міститься між ними, а також свої власні послідовності. Ця особливість *IS*-елементів показана на рис. 11.30, із якого видно, що два модулі (*IS10L* і *IS10R* — лівий і правий) у складі кільцевої ДНК фланкують з одного боку ген *tet^r*

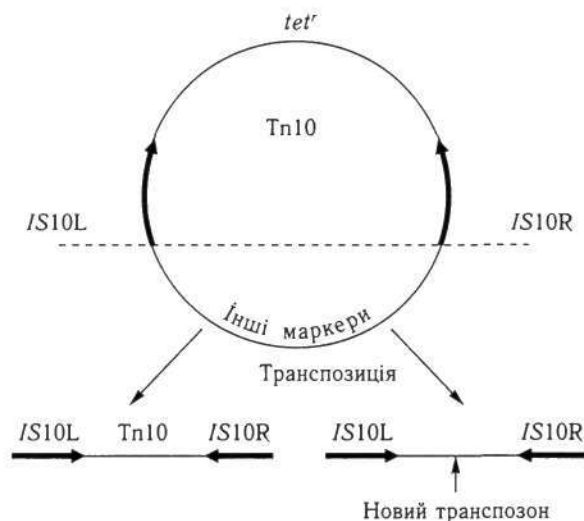


Рис. 11.30. Модулі *IS10* здатні забезпечити транспозицію будь-якої послідовності ДНК, що знаходиться поміж ними

вихідного транспозону Tn10, а з другого — інші послідовності цієї кільцевої ДНК. В акт транспозиції може втягуватись як Tn10, так і протилежний транспозон «навиворіт». Частота транспозиції тим менша, чим більша відстань між модулями. Дуже важливою є здатність мобільних елементів бактерій призводити до зливання

двох і більшої кількості репліконів в один, внаслідок чого утворюються **коінтегра́ти** (рис. 11.31).

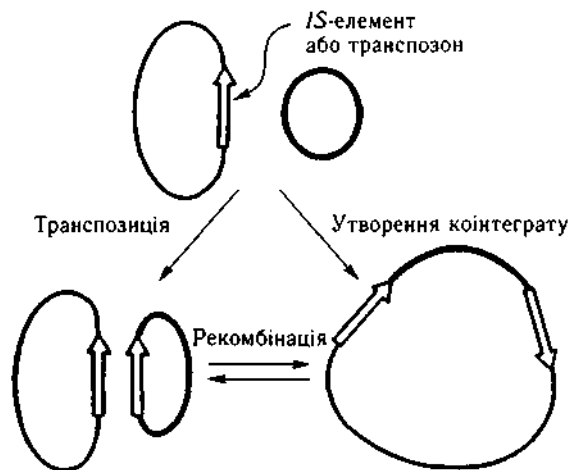


Рис. 11.31. Дві основні реакції, які здійснюються *IS*- та *Tn*-елементами (мобільні елементи не тільки переміщуються з реплікону на реплікон, але й обумовлюють злиття репліконів, утворюючи коінтегра́т двох кільцевих молекул ДНК)

Молекулярний механізм транспозиції може бути різним у МГЕ різних типів, тому його краще розглянути на конкретних прикладах.

Досить добре в цьому відношенні вивчений фаг *Mu*, який можна розглядати як дещо незвичайний транспозон. Цей помірний бактеріофаг вбудовується в будь-який сайт хромосоми бактерії-хазяїна. За індукції фага він розмножується, не вирізаючись із хромосоми, шляхом повторних актів **реплікативної транспозиції**. Вирізання фагової ДНК здійснюється лише на стадії її пакування у фагові частинки. Встановлено, що для реплікації-транспозиції фага *Mu* необхідні активні продукти його генів *A* і *B*, а також інтактні кінці фагової ДНК. Продукти вказаних генів утворюють фермент, який грає центральну роль у транспозиції, — **транспозазу**. Продукт гена *A* специфічно взаємодіє з кінцями фагової ДНК і саме тут здійснює односторонній розтин — по одному на кожний протилежний ланцюг, але, як показано на рис. 11.32, з різних сторін інтегрованого фага (транспозону). Молекули *A*-білка зв'язуються з обома кінцями транспозону, утворюючи комплекс, який взаємодіє

з ДНК-мішенню і В-білком. Білки А і В (транспозаза) вносять у ДНК-мішень уступчатий розтин: комплементарні ланцюги розриваються на віддалі 5 п. н. один від одного. В подальшому ланцюги ДНК-мішені, що містять зазначені уступи, приєднуються до протилежних кінців транспозону в місцях розривів його ДНК, що відбулися раніше. В результаті виникає структура, яка являє собою не що інше, як дві реплікативні вилки, направлені назустріч одна одній. Реплікація йде за рахунок реплікативного апарату клітини і приводить до подвоєння транспозону і дуплікації послідовності ДНК-мішені довжиною 5 п. н.

Деякі великі (біля 5000—8000 п. н.) транспозони, наприклад Тn1, Тn3 та інші своєю поведінкою нагадують фаг Мu. Їх транспозази також спричиняють утворення коінтегратів та дуплікацію 5 п. н. ДНК-мішені після реплікації. При цьому у складі коінтеграта одна копія дуплікованої ділянки межує з однією копією транспозону, а друга — з іншою (рис. 11.32). Як видно з рис. 11.29, Тn3

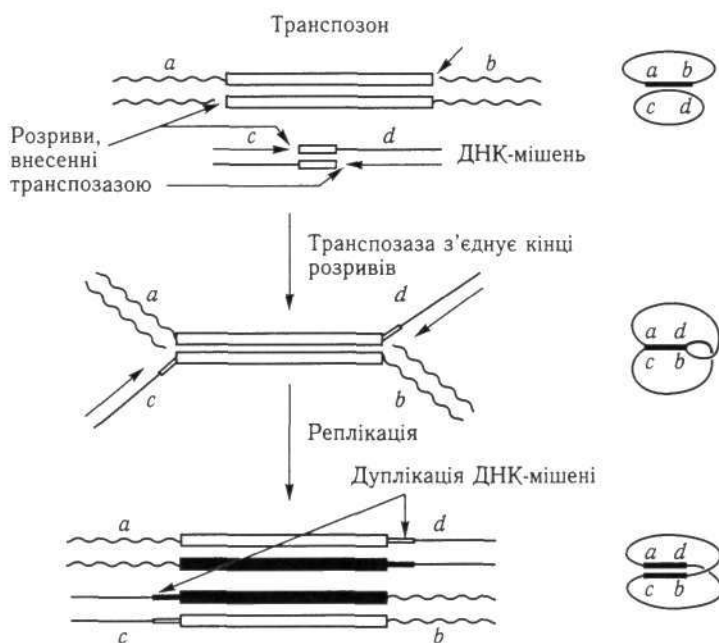


Рис. 11.32. Механізм реплікативної транспозиції

має два гени, необхідні для його переміщення. Це гени *tnpA* і *tnpR*, перший з яких кодує транспозазу, яка нагадує аналогічний фер-

мент фага *Mu*. Продукт гена *tnpR* — фермент **резолваза** (від англ. *resolution*) — необхідний для поділу виникаючого коінтеграта на вихідні реплікони. Цей фермент здійснює реакцію сайт-специфічної рекомбінації по певних (*res*) послідовностях транспозону, якщо вони знаходяться в прямій орієнтації одна до одної (рис. 11.33). Якщо послідовність *res* відсутня, реакція розрешення коінтеграта (його поділу на реплікони) може бути замінена *RecA*-залежною рекомбінацією, але остання менш ефективна.

Зазначений механізм транспозиції властивий не всім транспозонам. Складні транспозони, що мають *IS*-модулі (*Tn5*, *Tn10* та ін.), а також самі *IS*-елементи можуть переміщуватися без проміжної стадії коінтеграта. Вони, як вважають, вирізаються транспозазами з місця старої локалізації і вбудовуються в інше місце того ж або іншого реплікону. Такий механізм називається **нереплікативним** або **консервативним**. В принципі консервативна реплікація може здійснюватися за вже знайомою нам схемою, але з деякими відмінностями (рис. 11.34).



Рис. 11.33. Роль сайт-специфічної рекомбінації в транспозиції

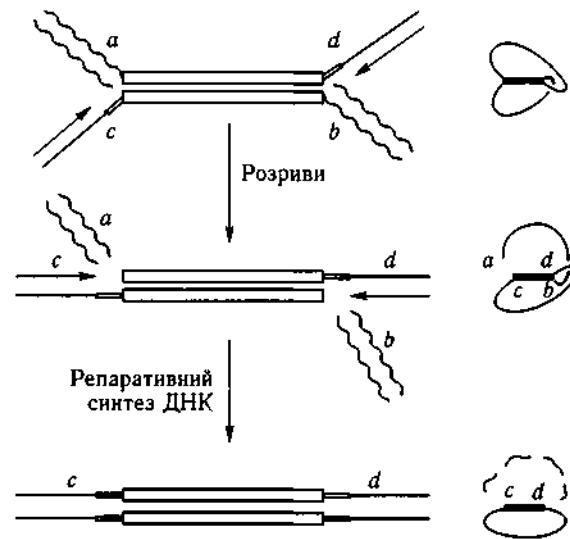


Рис. 11.34. Консервативний механізм переміщення транспозонів

Після перших двох одноланцюгових розтинів ДНК-донора з обох сторін транспозону і приєднання до нього уступчасто розрізаних ланцюгів ДНК-мішені транспозаза здійснює ще два розрізи

в ланцюгах, що зв'язують транспозон з місцем старої локалізації. Після цього транспозон виявляється вирізаним із одного місця ДНК і вбудованим в інше місце. Процес закінчується незначним (5—9 п. н.) репаративним синтезом ДНК-мішені, наслідком якого є повтор цієї короткої послідовності з обох сторін транспозону. Цікаво, що переміщення бактеріальних транспозонів за консервативним механізмом не обов'язково супроводжується його зникненням у місці старої локалізації. Є дані, що МГЕ вирізається головним чином із напівметильованої (тобто щойно реплікованої) молекули ДНК, причому вирізання здійснюється лише із одного (ще не метильованого) ланцюга. Це забезпечує зберігання однієї копії мобільного елемента на старому місці.

Мігруючі генетичні елементи (МГЕ) еукаріотів

Молекулярні механізми транспозицій МГЕ еукаріотів ще не до кінця з'ясовані, однак є багато доказів певної аналогії будови і способів переміщення цих елементів з бактеріальними транспозонами.

Мобільні елементи, найбільш близькі за своїми властивостями до бактеріальних транспозонів, знайдені у *S. cerevisiae* і *D. melanogaster*. Вони мають невеликі розміри, містять кінцеві повтори і знайдені в різних ділянках геномів. До складу багатьох цих елементів входять гени, продукти яких необхідні для транспозиції.

Розрізняють ряд класів рухомих елементів еукаріотів, виходячи із відмінностей їх молекулярної будови і особливостей переміщення. Деякі з них втратили здатність до самостійної транспозиції, однак зберегли ряд характерних ознак МГЕ (локалізація на флангах нуклеотидних повторів, здатність до переміщення в присутності інших МГЕ та інше). Властивість багатьох мобільних елементів автономно реплікуватися, вступати в акти транспозицій і рекомбінацій сприяє їх розповсюдженню в геномі у вигляді численних ідентичних або спотворених копій. Не дивно, що значну частину геномів еукаріотів (10—20%) складають різноманітні повтори, більшу частину яких представляють різні типи МГЕ. Мобільні елементи еукаріотів у значній мірі визначають мінливість геномів і можуть грати важливу роль в їх еволюції. Наявність прямих повторів ДНК-мішені поруч з МГЕ у еукаріотів дає можливість вважати, що еукаріоти використовують механізм транспозиції, подібний до такого у бактерій, у яких «генералізована» транспозиція може здійснюватись у будь-які випадкові сайти.

Інший тип переміщення являє собою «спрямована» транспозиція. Так, наприклад, у хлібних дріжджів за перших поділів аскоспори спостерігається односпрямований перенос копій генів, які

визначають тип спаровування (a або α), із «мовчазних» («касетних») локусів в єдиний адаптивний реципієнтний локус (МАТ) (розділ 12.1.5). Такий спрямований перенос інформації нагадує транспозицію у бактерій, за якої донорний локус залишається інтактним, а реципієнтний змінюється.

Значне місце серед МГЕ еукаріотів займають елементи геному, що є продуктами зворотної транскрипції клітинних РНК (**ретропозони** та **ретротранспозони**). Отже, мігруючі елементи еукаріотів істотно відрізняються між собою як будовою, так і способом переміщення в геномі, чому варто розглянути деякі з цих елементів окремо.

В ДНК дріжджів виявлено ціле сімейство роз'єднаних між собою елементів *Ty* (від англ. *transposon yeast*, тобто транспозон дріжджів). Кожен *Ty*-елемент за будовою нагадує складний транспозон бактерій (рис. 11.35): він має серцевинну послідовність або «тіло» довжиною 6,3 кб і довгі прямі повтори на обох кінцях —

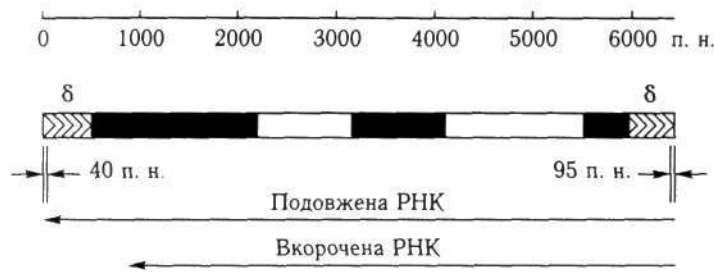


Рис. 11.35. Структурна організація *Ty*-елементів *S. cerevisiae*.

□ — ділянки, що відрізняються у різних *Ty*-елементів, ■ — ділянки, спільні для основних класів *Ty*-елементів

ДКП або LTR (від англ. *long terminal repeats*). Кожен кінцевий повтор елемента *Ty* нараховує 330 п. н., його називають δ (дельта). Крім тих, що входять до складу *Ty*-елементів, в звичайних лабораторних культурах дріжджів зустрічається близько 100 незалежних елементів δ , яких називають поодинокими. Це дуже нагадує IS-елементи бактерій, які теж зустрічаються або у вигляді незалежних структур, або слугують модулями складних бактеріальних транспозонів. В різних штаммах *S. cerevisiae* кількість *Ty*-елементів неоднакова — вона коливається в межах 30—35. Спостерігається значна дивергенція між окремими *Ty*-елементами. Окремі *Ty*-елементи кожного класу можуть відрізнитись від свого прототипу одним або декількома нуклеотидами, вставками або делеціями.

Значна гетерогенність властива також δ -послідовностям різних класів *Tu*-елементів. Однак δ -послідовності у складі *Tu*-елементів, виявляють значно більший консерватизм, ніж окремі (поодинокі) δ -елементи. Це дає змогу вважати, що процес транспозиції *Tu*-елементів, як і процес переміщення транспозонів бактерій, дуже залежить від пізнавання кінцевих повторів. Транспозиція *Tu*-елементів, так само як і бактеріальна транспозиція, супроводжується утворенням дуплікацій із п'яти основ з обох кінців шойно вбудованого елемента. Присутність у геномі *Tu*-елементів забезпечує наявність областей часткової гомології, де можуть відбуватися рекомбінаційні події. Останні можуть призводити до індукції делецій або інверсій у хромосомі (шляхом рекомбінації між двома *Tu*-елементами однієї хромосоми) і до більш істотних змін, наприклад транслокацій, якщо рекомбінують *Tu*-елементи різних хромосом. Рекомбінація між *Tu*-елементами може відбуватися по типу «вибуху»: здійснення одного акту рекомбінації стимулює інший.

Tu-елементи здатні вирізатись із хромосом шляхом гомологічної рекомбінації між прямими повторами δ -послідовностей, що спричиняє реверсію деяких мутацій до дикого типу. *Tu*-елемент транскрибується в два види полі(А)-РНК. Як видно з рисунка 11.35, синтезуються більш довгі і більш короткі молекули РНК. Синтез більш довгих молекул розпочинається і закінчується в межах δ -повторів, і тому ці РНК теж мають гомологічні повтори на своїх кінцях.

Сьогодні відомо, що не тільки дріжджі, але й геноми інших еукаріотів утримують чимало сімейств рухомих елементів з довгими кінцевими повторами (ДКП), які містять біля 300—400 п. н., орієнтованих у певному напрямку. На краях цих послідовностей знаходяться короткі прямі повтори ДНК-мішені, довжина яких (кілька нуклеотидних пар) характерна для кожного елемента. Елементи з подібною будовою знайдені у різних дріжджів, дрозофіли, хребетних і рослин. Звичайно вони поводять себе як стабільні гени, однак певні впливи навколишнього середовища можуть індукувати їх переміщення.

В геномі *D. melanogaster* є декілька типів мобільних елементів (рис. 11.36), серед яких довгі кінцеві повтори мають елементи *copia* і *FB*. Елементи сімейства *copia* краще вивчені. Інші елементи (*copia*-подібні) за структурою і властивостями дуже близькі до *copia*, але мають відмінні нуклеотидні послідовності. Взяті разом, *copia*-подібні сімейства складають біля 1% ДНК дрозофіли. Кількість копій цих елементів залежно від лінії мухи — від 20 до 60. Методом гібридизації з політенними хромосомами, а також з допомогою рестрикційного аналізу переконливо показана варіабельність локалізації елементів *copia* у геномі. Будова елементів типу *copia*

показана на рис. 11.36: довжина елемента — 5000 п. н., він має ідентичні прямі кінцеві повтори довжиною 276 п. н. Кожний з пря-

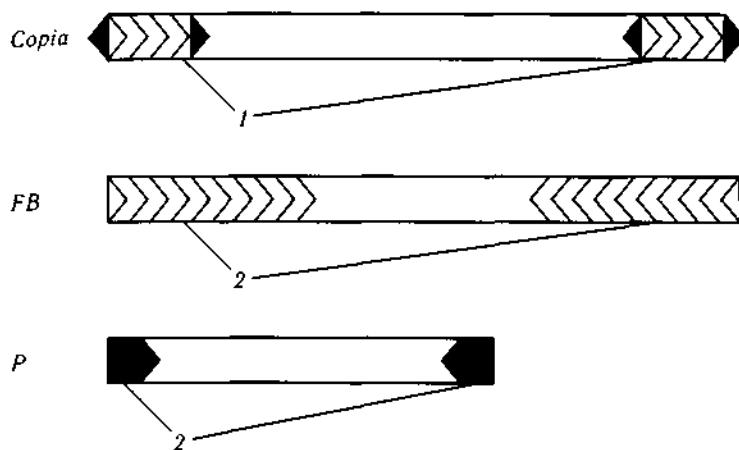


Рис. 11.36. Три типи мобільних елементів у *D. melanogaster*:

1 — прямі повтори; 2 — інвертовані повтори

мих повторів закінчується короткими інвертованими повторами. В сайті інтеграції утворюється прямий повтор із п'яти пар основ ДНК-мішені. Іноді елементи *copia* існують у вигляді вільних кільцевих молекул ДНК, що відрізняє їх від бактеріальних транспозонів, які не існують за межами геному. Транскрипти *copia* являють собою численні полі(А)⁺-іРНК, серед яких є як повні, так і неповні транскрипти. Оскільки довгі кінцеві повтори (ДКП) у елементів *copia* ідентичні, не виключено, що вони обидва функціонують як промотори, один із яких використовується для зчитування інформації в послідовності *copia*, а другий — для транскрипції генів у сусідній з елементом *copia* ділянці ДНК (такі ж особливості властиві ретровірусам).

Існує чимало *copia*-подібних елементів, які зараз вивчаються — це *mgd1*, *mgd3*, *B104*, *412*, *297* і *gypsy*. Кількість копій цих елементів складає від 10 до 1000 на геном, їх довжина — 5500—8500 п. н., довжина прямих повторів — від 269 до 571. Розмір повторів ДНК-мішені — 4—5 нуклеотидів.

Члени іншого сімейства мобільних елементів — елементи *FB* (від англ. *foldback*) — утримують інвертовані кінцеві повтори різної довжини, які за будовою нагадують сателітну ДНК. Відомо, що два (неідентичних) *FB*-елементи кооперуються і переносять вели-

кий сегмент ДНК, розташований між ними. В цьому випадку можна провести аналогію із складними бактеріальними транспозонами, хоч довжина послідовності між двома *FB*-елементами може бути значно більшою, ніж довжина транспозону бактерії.

Ретротранспозони та ретропозони

Один із способів переміщення елементів з довгими кінцевими повтори — це зворотна транскрипція на матрицях їх процесованих транскриптів, тобто зрілих РНК. Внаслідок цього процесу відтворюються ДНК-копії зазначених мігруючих елементів, які потім вбудовуються в геному ДНК і стають їх складовою (інтегральною) частиною. Як відомо, вперше подібний механізм інтеграції був описаний для ретровірусів, в геномі яких є ген, що кодує **зворотну транскриптазу** (ревертазу). Вбудована в геном клітини-хазяїна ДНК-копія ретровірусу отримала назву **проретровірусу**. Вважають, що її інтеграція з хромосоною інфікованої клітини відбувається шляхом транспозиції.

Оскільки рухомі елементи еукаріотів, що мають довгі кінцеві повтори, теж здатні використовувати зворотну транскрипцію як проміжний етап транспозиції, то їх часто називають **ретротранспозонами**. Останні транскрибуються за допомогою РНК-полімерази II. Сигнали ініціації (промотори), поліаденілювання і термінації транскрипції розташовані в довгих кінцевих повторах — в лівому або правому. Елементи, що кодуєть білки «ретропозиції», тобто ревертазу та інші, здатні забезпечувати переміщення інших подібних елементів цього сімейства, які втратили власну інформацію про білки «ретротранспозиції».

Елементи, обмежені ДКП, здатні також переміщуватись за допомогою рекомбінаційних механізмів. Внаслідок гомологічної рекомбінації між ДКП елемент вирізається із хромосоми, при цьому в її ДНК зберігається один ДКП, який може забезпечити повторну інтеграцію одного із елементів даного гетерогенного сімейства ретротранспозонів.

Ретропозони — це продукти зворотної транскрипції клітинних РНК еукаріотів.

У геномах ссавців, птахів, амфібій і комах знайдено немало елементів, що являють собою вбудовані ДНК-копії, синтезовані на матрицях різних типів клітинної РНК. Їх називають **ретропозонами**. У ссавців ретропозони складають не менше 10% всієї ДНК, отже потік інформації від РНК до ДНК може бути досить значним.

Розрізняють різні типи ретропозонів. В геномах ссавців разом з генами, що мають інтрони і активно транскрибуються РНК-поліме-

разою II, виявляються так звані **псевдогени**, що є зіпсованими копіями цих генів. Вони позбавлені інтронів і мають на 3'-кінці послідовність поліdA-полідT. Це свідчить про те, що матрицею для їх копіювання могла бути зріла (процесована) поліаденілована іРНК. Псевдогени отримали таку назву тому, що рамки їх трансляції часто зіпсовані нонсенс-кодонами і делеціями. Псевдогени представлені в геномі різним числом копій — від одної до декількох десятків. Вони, як і проретровіруси і ретропозони, обмежені короткими прямими повторами ДНК-мішені, характерними для транспозицій. Як правило, ретропозони не мають власних промоторів, бо промоторна ділянка для РНК-полімерази II локалізована перед стартом транскрипції. Однак іноді ретропозон вбудовується в місце знаходження чужого промотора і може транскрибуватися. Такі функціонуючі ретропозони називають **ретрогенами**. Прикладом останніх може бути ген I препроінсуліну у мишей і шурів, який у протилежність гену II втратив один (великий) інтрон і, крім того, має з обох сторін невеликі прямі повтори — свідчення можливої транспозиції в далекому минулому.

Псевдогени, збудовані на матрицях іРНК відомих білків, складають лише незначну частину геномних ретропозонів. Основна доля повторів у складі ДНК хребетних (кількість копій — від десятків до сотень тисяч) — це результат ретропозицій ДНК-копій клітинних РНК, але таких, що або кодуєть невідомі білки, або є аномально процесованими транскриптами тРНК, 7S-РНК, УРНК та ін. Особливо багаті такими повторами геноми вищих еукаріотів — ссавців, у яких знайдено короткі (70—300 п. н.) та довгі (6—7 тис. п. н.) повтори із структурними ознаками ретропозонів. Сімейства таких повторів часто носять назви рестриктаз, якими ці послідовності розрізаються (наприклад, короткі *Alu*-повтори або довгі *Kpn*-повтори в геномі людини). Кількість копій довгих повторів у ссавців — $3 \cdot 10^4$, тобто 10% всієї ДНК. Серед цих повторів виявлені досить протяжні відкриті рамки зчитування, де існує помітна гомологія до нуклеотидної послідовності гена ревертази ретровірусів. Кількість копій коротких повторів, включаючи найбільш вивчені повтори *Alu*-сімейства у людини, складає приблизно $3 \cdot 10^5$ або 5—6% маси ДНК клітини.

Функції коротких і довгих повторів, виникнення яких пов'язують з явищем ретропозиції, ще не з'ясовані. Слід підкреслити, що значення ретропозицій в утворенні коротких та довгих повторів у еукаріотів різними авторами оцінюється неоднозначно. Існує думка, що ретропозиції у еукаріотів — явище не дуже часте, і тому більшість повторів у геномах — це наслідок дуплікацій і ампліфікацій, що здійснюються переважно іншими механізмами.

Мобільні елементи з обмеженими інвертованими повторами

Окрему групу мобільних елементів еукаріотів складають елементи з обмеженими інвертованими повторами. Прикладом можуть бути ***P*-елементи** дрозофіли (див. рис. 11.36) і ***Ac*-елементи** кукурудзи. В геномах нараховується по 30—50 копій таких елементів. Повні копії містять відкриті рамки трансляції, що кодують фермент транспозазу. Частина копій дефектна, має внутрішні делеції, і їх транспозиція здійснюється транспозазами повноцінних копій. У *P*-елемента виявлено чотири відкриті рамки трансляції (чотири екзони), які внаслідок сплайсингу об'єднуються в одну іРНК транспозази. Транскрипт *Ac*-елемента після вилучення чотирьох інтронів також утворює іРНК для транспозази.

Слід зазначити, що фактично транспозицію *Ac*-елементів спостерігала багато років тому Мак Клінток, вивчаючи мінливість антоціанового забарвлення соматичних клітин кукурудзи під час їх поділу. Було з'ясовано, що зміни в геномі у цьому випадку стимулюються переміщенням у ньому так званих **контролюючих елементів**. Останні сьогодні ідентифіковані як МГЕ, які, вбудовуючись у хромосому, призводять до нестабільності відповідних генів. Геном кукурудзи утримує декілька сімейств контролюючих елементів. Члени кожного сімейства можна поділити на два класи: 1) **автономні** елементи, здатні до транспозицій за допомогою власної транспозази; 2) **неавтономні** елементи, які не мають гена транспозази і здатні до транспозиції лише за наявності автономного члена цього сімейства. Якщо *Ac*-елемент є цілком автономним, то інший — *DS*-елемент — неавтономний, але він активується *Ac*-елементом. В останньому випадку *DS*-елемент може або переміститися в інший сайт, або спричинити розрив хромосоми. Транспозиція супроводжується вилученням *DS* із донорного сайту, внаслідок чого нестабільний алель перетворюється в стабільний, однак не завжди дикого типу. Поки *DS*-елемент присутній у локусі, він може впливати на рівень експресії гена; більше того, він здатний змінювати час експресії певних генів у процесі розвитку. Це встановлено за дослідження впливу *DS*-елемента на експресію алельних генів локуса *Sh*. Алелі *Sh* кодують синтетазу сахарози, відсутність якої призводить до фенотипу «зморшкуватого» зерна. Локуси *Sh-m*, в яких присутній *DS*-елемент, відрізняються рестрикційною картою в 5'-області гена, а також особливостями експресії у різних мутантів.

Як видно з рис. 11.37, *Ac*-елементи утримують три відкриті рамки читування; *DS*-елементи мають внутрішні делеції, що й обумов-

лює їх неавтономність. *DS*-елементи своєю поведінкою нагадують дефектні *P*-елементи *D. melanogaster*. Однак, якщо транспозиції

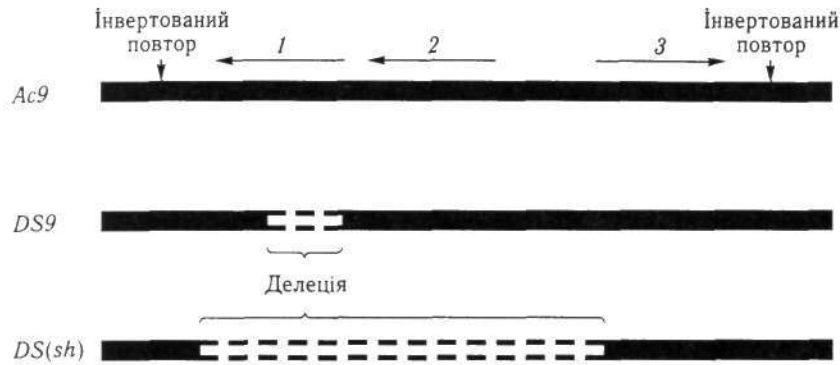


Рис. 11.37. Структурна організація *Ac*- і *DS*-елементів кукурудзи:

1, 2, 3 — відкриті рамки зчитування

P-елемента дрозофіли обмежуються лише зародковими генеративними клітинами (із-за особливостей сплайсингу іРНК транспозази), то переміщення *Ac*-елементів у кукурудзи здійснюється і в соматичних клітинах. Виризання *Ac*-елементів у рослин може бути неточним — у сайті вилучення може виникнути дуплікація, делеція або вставка декількох нуклеотидів, внаслідок чого можуть змінитися властивості закодованого білка або характер експресії гена.

Гібридний дисгенез

З переміщенням МГЕ пов'язане цікаве явище, відоме під назвою гібридного дисгенезу. **Гібридний дисгенез** — це комплекс генетичних аномалій — таких, як мутації, хромосомні аберації, порушення розходження хромосом у мейозі, стерильність та інше, — у деяких гібридних форм. У *D. melanogaster* ідентифіковано дві генетичні системи, що обумовлюють гібридний дисгенез. Мухи першої системи поділяються на типи *I* (*inducer*) і *R* (*reactive*). За схрещування самців *I* з самками *R* зменшується плодючість, чого не буває за реципрокного схрещування. Мухи другої системи складаються з типів *P* (*paternal contributing*) і *M* (*maternal contributing*). Схрещування між самцями *P* і самками *M* викликає гібридний дисгенез; у реципрокному схрещуванні цього ефекту немає. Явище гібридного дисгенезу у дрозофіли проявляється головним чином у зародко-

; ┌
 , ┌
 (♀ M ♂) M-типу F₁
 , ┌
 , ┌
 gaster, M-типу, 30—40 *D. melano-*
 , 10—30 ,
 , ┌
 M-типу (M-цитотип). , ┌
 , ┌
 , з'я-
 , ┌
 M-цитотипі. ┌
 , ┌
 , ┌
 , ┌
 Дисгенетичні P-M F₁
 , МГЕ, , ┌
 , ┌
 M-цитоплазми, ┌
 , ┌
 , ┌
 10 ┌
 , ┌
 , ┌

11.7. Перебудови, що змінюють кількість хромосом

Зміна числа хромосом у клітині є одним із важливих джерел мінливості в процесі еволюції і широко використовується людиною в селекції рослин. Найчастіше причиною змін хромосомного складу клітин еукаріотів є порушення механізмів каріокінезу. В основі цих порушень можуть лежати: 1) нерівномірне розходження хромосом в анафазі мейозу або мітозу, 2) поділ ядра без наступного поділу клітини (без цитокінезу), 3) множення хромосом без наступного їх розходження (ендомітоз), 4) злиття соматичних клітин та їх ядер, 5) інші причини.

Нерозходження хромосом трапляється як у соматичних, так і в статевих клітинах. Нерозходження всіх хромосом у мітозі спричиняє поліплоїдію відповідного клону клітин, інші клони за кількістю хромосом можуть бути нормальними. Якщо ж повне нерозходження хромосом трапиться у мейозі, то це може призвести до утворення гамет з нередукованою кількістю хромосом. Такі гамети містять подвоєну кількість хромосомних наборів, і участь їх у заплідненні може спричинити появу організмів з трьома або чотирма наборами хромосом. Виникнення поліплоїдних зигот внаслідок злиття **нередукованих гамет** або нередукованих гамет з нормальними М. Ю. Лобашов назвав **мейотичною поліплоїдією**. У випадку запліднення диплоїдної (нередукованої) яйцеклітини гаплоїдним спермієм утворюється зигота з трьома наборами хромосом ($2n + 1n$). Якщо зливаються дві нередуковані диплоїдні гамети, то зигота отримає чотири геноми ($2n + 2n$) і буде тетраплоїдною. За такими ж або подібними механізмами виникають клітини і організми з іншими значеннями плоїдності — пентаплоїди, гексаплоїди і т. п.

Крім кратних гаплоїдному набору змін числа хромосом, порушення мітозу і мейозу можуть спричинити і некратні зміни, тобто відхилення в кількості лише окремих хромосом (явище **анеуплоїдії**). Головною причиною нерозходження однієї або декількох пар гомологічних хромосом у мейозі є різні хромосомні перебудови, які утруднюють кон'югацію і розходження хромосом. За розмаїття перебудов, що впливають на кількість хромосом у клітині, одні з них (злиття і поділи хромосом) загальний об'єм спадкового матеріалу залишають незмінним, а інші (анеуплоїдія, моноплоїдія і поліплоїдія) істотно змінюють.

11.7.1. Злиття та поділи хромосом

Центричне злиття хромосом супроводжується втратою однієї центромери і з'єднанням двох негомологічних акроцентричних хромосом в одну мета- або субметацентричну. Протилежне явище — **центричний поділ**, за якого одна хромосома поділяється на дві, кожна з яких має свою центромеру.

Центричне злиття і центричні поділи ще називають **робертсонівськими перебудовами** за ім'ям Вільяма Робертсона, який злиттям хромосом спробував пояснити зменшення їх числа в хромосомних наборах деяких видів. Вважають, що злиття хромосом трапляється набагато частіше, ніж поділи, і що воно властиве численним групам рослин і тварин. Завдяки цьому кількість хромосом може бути різною навіть у видів, дуже близьких в еволюційному плані. Прикладом можуть бути хромосоми людини і трьох її найближчих родичів: шимпанзе, горили і орангутана. У людини 23 пари хромосом, а у людиноподібних мавп — 24. Два плеча хромосоми 2 людини відповідають двом різним хромосомам мавп (це хромосоми 12 і 13 шимпанзе і 13 і 14 горили та орангутана). Таким чином, можна вважати, що в процесі еволюції приматів трапилася по меншій мірі одна робертсонівська перебудова. За всіма ознаками це було злиття хромосом в еволюційній лінії, що привела до виникнення людини.

11.7.2. Анеуплоїдія

Анеуплоїдія або **гетероплоїдія** — це зміна числа хромосом, але не кратна гаплоїдному наборові. Кількість хромосом певної пари або декількох пар може бути зменшена або, навпаки, збільшена в порівнянні з їх нормальною кількістю. У диплоїдних організмів загальна кількість хромосом у наборі — $2n$. Якщо обидві хромосоми якоїсь пари втрачаються, то загальна кількість хромосом у такого організму (**нулісоміка**) складе $2n - 2$. У **моносоміків** відсутня одна із хромосом пари, і загальна їх кількість — $2n - 1$. У **полісоміків** одна із хромосом представлена трьома (трисоміки), чотирма (тетрасоміки) або й більшою кількістю екземплярів. Загальна кількість хромосом у трисоміків — $2n + 1$, у тетрасоміків — $2n + 2$ і т. ін.

Анеуплоїдія може виникати внаслідок неправильного розходження хромосом у мейозі. Вперше анеуплоїдія була виявлена К. Бріджесом у 1916 р., коли він відкрив нерозходження хромосом у дрозофіли. У деяких (виключних) самок було виявлено дві хромосоми X і ще одна Y, а у деяких самців була відсутня Y-хромосома.

За анеуплоїдії змінюється в клітині загальна кількість генетичного матеріалу, а також співвідношення доз окремих генів, тому полісомія і моносомія можуть мати самостійний фенотиповий вияв. Так, наприклад, у дурману *Datura stramonium* за морфологічними ознаками можна визначити всі 12 трисомних варіантів рослин, бо всі вони відрізняються одна від одної специфічними змінами форми насінної коробочки та багато чим іншим. Часто, особливо у тварин і людини, зайва хромосома обумовлює депресію розвитку і летальність. Причина, із-за якої у людини та інших організмів не спостерігається трисомії по деяких хромосомах, може полягати в тому, що такі трисоміки нежиттєздатні і гинуть на ранніх стадіях розвитку. У людини відомі спадкові хвороби, що пов'язані з трисомією окремих хромосом, наприклад 13-ї (синдром Патау), 18-ї (синдром Едвардса), 21-ї (синдром Дауна) та ін. (розділ 17.6).

Моносоміки, а тим більше нулісоміки, часто нежиттєздатні, але серед поліплоїдних рослин вони зустрічаються. Наприклад, рослини звичайного тютюну *Nicotiana tabacum* — це тетраплоїди з 24 парами хромосом; існують фенотипово відмінні всі 24 варіанти моносоміків. Пшениця *Triticum aestivum* — гексаплоїд з 21 парою хромосом; отримані всі можливі варіанти нулісоміків, які сьогодні використовуються як для генетичних досліджень, так і для практичного отримання нових ліній із заміщеними хромосомами. Можливість отримання життєздатних моносоміків і нулісоміків серед алополіплоїдів пояснюється гомеологією (частковою гомологією) хромосом різних наборів у таких рослин. У диплоїдних вищих рослин і тварин моносомія, як правило, летальна, але й тут можливі виключення. Так, наприклад, у *D. melanogaster* моносомія по 4-й хромосомі (гапло-4) сумісна з життям, однак ці мухи мають менші розміри і інші відхилення від дикого типу. Більшість інших варіантів моносомій для дрозофіли летальні. Можливо, життєздатність гапло-4 пояснюється відсутністю в хромосомі 4 мух життєво важливих генів.

В процесі мейозу гени хромосом анеуплоїдів розподіляються по гаметах у відповідності з розщепленням або хромосом (хромосомне розщеплення) або хроматид (хроматидне розщеплення). За повного зчеплення гена і центромери відбувається хромосомне розщеплення, якщо ж на ділянці ген-центромера можливий кросинговер, то розходження генів у гамети відповідає особливостям хроматидного розщеплення, яке більш детально буде розглянуто в розділі 11.7.3. Як за хромосомного, так і за хроматидного розщеплення гетерозиготні полісоміки утворюють значно більше класів гамет, ніж нормальні диплоїдні організми. В цьому легко переконатися на простому прикладі — розглянувши типи можливих гамет

у гетерозиготного трисоміка AAa за звичайного хромосомного розщеплення в мейозі (щоб розрізнити хромосоми, які несуть домінантний алель, одна із них позначена зірочкою):



Отже, співвідношення класів гамет у трисоміка AAa складатиме:

$$1AA : 2Aa : 2A : 1a.$$

Легко переконатися, що у трисоміка Aaa теж утвориться чотири класи гамет, але з іншим вмістом домінантних і рецесивних алелів: $2Aa : 1aa : 1A : 2a$. Цілком зрозуміло, що наслідки аналізуючих схрещувань за дослідження трисоміків і нормальних диплоїдів будуть різними.

Слід зазначити, що пилокві зерна з зайвою хромосомою, як правило, не функціонують, в той час як мегаспори і яйцеклітини цілком життєздатні. Тому реципрокні схрещування трисоміків і нормальних диплоїдних рослин можуть призводити до різних результатів.

Анеуплоїди широко використовуються в генетичних дослідженнях, наприклад, для з'ясування локалізації генів у певних хромосомах рослин. Для цього необхідно мати набір трисоміків по окремих хромосомах, кожного з яких схрещують з нормальною диплоїдною рослиною, гомозиготною по рецесивному алелю (aa). Наслідки схрещувань в F_1 , в F_2 і за повторного схрещування з aa будуть різними залежно від того, в якій із хромосом трисоміка локалізується досліджуваний ген — чи то в тій, що має, як звичайно, дві копії, чи в тій, що має надлишок копій.

Для з'ясування локалізації генів у хромосомах можна скористатися так званим **моносомним аналізом**, який, крім того, дає змогу визначити роль окремої хромосоми в онтогенезі рослини. Для моносомного аналізу спершу отримують серію моносомних (або нулісомних) рослин-алополіплоїдів даного виду. Моносоміка (або нулісоміка) по певній хромосомі гібридизують з рослиною досліджуваного сорту, після чого моносоміків F_1 зворотно схрещують з тим же сортом і такі зворотні схрещування моносоміків повторюють протягом щонайменше шести поколінь. В результаті всі хромосоми вихідного моносоміка виявляються замінені на хромосоми досліджуваного сорту. Самозапиленням моносоміків від останнього зворотного схрещування (або їх взаємним схрещуванням) отримують

мують нащадків, які будуть складатися із дисомиків, моносомиків і нулісомиків по одній певній хромосомі (рис. 11.38). Порівняльне визначення морфології, фізіології і біохімії цих рослин дозволяє з'ясувати генетичну роль досліджуваної хромосоми.

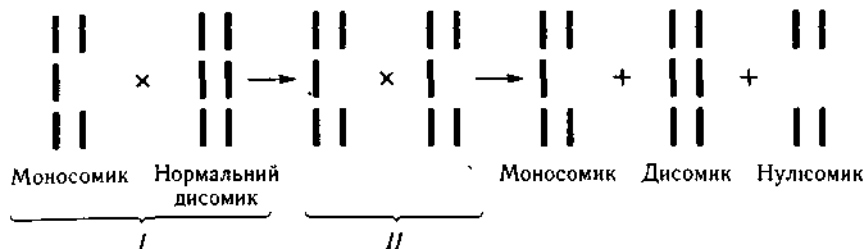


Рис. 11.38. Схема проведення моносомного аналізу на прикладі 3-х пар хромосом алополіплоїда

I — багаторазові зворотні схрещування. *II* — схрещування моносомиків від останнього зворотнього схрещування

Аналогічним способом можна ввести певну хромосому одного виду або сорту в хромосомний набір іншого виду або сорту. Для цієї мети рослину — донора хромосоми — схрещують з нулісомиком, що не має відповідної групи зчеплення. У випадку пшениці в цій ролі можна, наприклад, використати сорт Чайніз Спрінг, для якого колекція нулісомиків була отримана вперше. Моносомних нащадків від цього схрещування 6—12 разів схрещують з нулісомною лінією. Після цього проводять самозапилення отриманих моносомиків, внаслідок якого отримують диплоїдних рослин з заміщеною парою хромосом.

Надлишок хромосом у рослин і деяких тварин (лисиці, миші, ящірки, комахи) може створювати поява так званих додаткових або В-хромосом, що в нормі не властиві даному виду. Вони повністю складаються із гетерохроматину і негативно впливають на розвиток організму. Тому особини, що накопичили значну кількість В-хромосом, бракуються природним добром. Рослини різних популяцій дуже різняться кількістю В-хромосом, яка може коливатись у широких межах. Генетичне значення цього явища не з'ясоване.

11.7.3. Поліплоїдія

Як уже зазначалося, в клітинах диплоїдних організмів міститься два набори хромосом ($2n$), а в клітинах гаплоїдних — лише один (n). Ця нормальна або ортоплоїдна кількість наборів хромосом за

так званих геномних мутацій може змінюватися. Так, серед особин диплоїдного виду можуть зустрічатися гаплоїдні або ж поліплоїдні форми. Розрізняють триплоїди ($3n$), тетраплоїди ($4n$), пентаплоїди ($5n$) тощо. У гаплоїдних видів ($1n$) геномними мутантами можна вважати форми $2n$, $3n$ та інші.

Поліплоїди поділяють на **автополіплоїди**, у яких декілька разів повторюється один і той же набір хромосом, і **алополіплоїди**, які виникають внаслідок міжвидових схрещувань і тому містять повтори двох (або більшої кількості) різних геномів. Залежно від алельного складу досліджуваного локуса автополіплоїди поділяють на гомозиготні та гетерозиготні. Так, наприклад, автотетраплоїди $AAAA$ або $aaaa$ є гомозиготними, а наявність у генотипах водночас домінантних (A) і рецесивних (a) алелей властиве гетерозиготним формам. Залежно від кількості домінантних алелей у тетраплоїда їх називають: $AAAA$ — квадриплекс, $AAAa$ — триплекс, $AAaa$ — дуплекс, $Aaaa$ — симплекс, $aaaa$ — нуліплекс. Поліплоїди з парним числом хромосомних наборів називаються **збалансованими**. У них під час мейозу гомологічні хромосоми кон'югують, утворюючи або з'єднані пари (біваленти) або поліваленти (якщо кон'югує відразу декілька хромосом). У **незбалансованих** поліплоїдів, тобто таких, що мають непарну кількість наборів, мейоз завжди дуже порушений, тому що за кон'югації непарної кількості гомологічних партнерів їх розподіл між дочірніми клітинами здійснюється випадково і нерівномірно.

Поліплоїдія рідко зустрічається у тварин, але досить розповсюджена у рослинному світі. У тварин поліплоїди відомі головним чином серед гермафродитів, наприклад, у земляних черв'яків, і у видів з **апоміктичним** типом розмноження, за якого організми розвиваються із статевих клітин, але без акту запліднення (**партогенез**, **андрогенез**, **гіногенез** і т. ін.). Партеногенетичні самки (тобто самки, що дають життєздатних нащадків без запліднення) і поліплоїдні форми відомі у деяких жуків, метеликів, клопів, риб, саламандр, раковидних. Біля 47% усіх квіткових рослин — це поліплоїди. Доля поліплоїдних видів зростає з півдня на північ, що можна пояснити більш значною в порівнянні з диплоїдами генетичною мінливістю і кращою адаптивністю поліплоїдів.

Внаслідок спонтанної поліплоїдизації соматичних клітин (**соматичної поліплоїдизації**) можуть виникати **мозаїки** або **химери** — організми, що містять диплоїдні і поліплоїдні клітини. Вегетативним розмноженням поліплоїдних частин рослини-мозаїка можна отримувати поліплоїдні організми, чим часто користуються в селекції. Для соматичної (мітотичної) поліплоїдизації характерним є збільшення в окремих клітинах числа хромосом, кратне диплоїдному

наборів. Якщо така поліплоїдизація трапляється за першого митозичного поділу зиготи, то всі клітини зародка виявляються поліплоїдними, тобто мозаїцизму в цих випадках не буває. Це явище називають **зиготичною поліплоїдією**.

Автополіплоїдія

Автополіплоїдія, тобто надмірне повторення в клітині одного і того ж геному, нерівномірно розповсюджена у природі і найчастіше буває у покритонасінних рослин. Відомі поліплоїдні еукаріотні мікроорганізми — гриби і водорості, високий ступінь плоїдності властивий макронуклеусам більшості найпростіших. У тварин часто зустрічається **ендополіплоїдія** деяких тканин, наприклад печінки у ссавців, а також кишечника, слинних залоз, мальпігєвих судин у цілого ряду комах. Ступінь розповсюдження поліплоїдів серед різних груп організмів певною мірою можна пов'язати з тими обмеженнями, які створюються, особливо у тварин, хромосомним механізмом визначення статі, бо за поліплоїдні може істотно порушуватися баланс між генами аутосом і статевих хромосом.

У природних умовах автополіплоїди виникають серед рослин з будь-яким способом розмноження, але краще зберігаються у самоzapильних рослин, а також за умов безстатевого (вегетативного) розмноження. Розмаїття автополіплоїдів у процесі еволюції зростає внаслідок мутацій і хромосомних перебудов, серед яких є і такі, що не сумісні з життям, якщо вони виникають у диплоїдів. Оскільки мейоз у автополіплоїдів часто дуже утруднений, їх плодючість у більшості випадків коливається в межах від 95 до 5%. Тому практично цінними є ті форми, які розмножуються апоміктичним або вегетативним шляхом.

Практичний інтерес до поліплоїдів, особливо збалансованих, пояснюється тим, що вони нерідко відрізняються від своїх диплоїдних попередників більшою могутністю: мають крупніші листя, квіти, насіння, більш могутні стебла і т. д. Клітини і їх ядра у поліплоїдів теж більші за розмірами, хоч їх менше на одиницю маси тканини. Це явище, відоме під назвою **гігантизму**, властиве не всім поліплоїдам. У самоzapильних рослин, наприклад у томатів, гігантизму не буває. Гігантизм супроводжується зміною ряду фізіологічних і біохімічних властивостей клітин, що забезпечує більш високу стійкість поліплоїдів до несприятливих умов, захворювань тощо. Стійкість поліплоїдів до негативних впливів середовища пояснюється тим, що в їх клітинах кожен ген має декілька копій і тому ймовірність прояву рецесивних мутацій значно менша, ніж у диплоїдів. Крім того, поліплоїдам у переважній більшості властива гетерозис-

готність, яка забезпечує високі адаптаційні здібності. Можливо, саме тому деякі реліктові рослини (представники древніх рослинних груп) як правило, поліплоїдні. Так, у папоротників чисельність хромосом досягає 500, велика кількість хромосом у соматичних клітинах деяких видів хвощів і плавунів. Отже, є підстави вважати, що поліплоїдія слугувала адаптивним механізмом збереження цих древніх форм рослинного світу.

В деяких випадках поліплоїдія перешкоджає схрещуваності нових форм з вихідним диплоїдом і виконує роль ізолюючого фактора. Так, за сумісного висіву диплоїдних і тетраплоїдних рослин гречки або жита урожайність насіння падає, бо триплоїдні зародки, що утворюються внаслідок перезапилення, нежиттєздатні. Інколи ж, навпаки, триплоїдні зародки розвиваються в досить потужні, але повністю стерильні рослини (триплоїдні кавуни, буряки та ін.). Існують мутації, які позитивно впливають на плодючість поліплоїдів. Це дає можливість вести селекцію на отримання поліплоїдних форм з підвищеною плодючістю. Вперше це показали дослідники А. Мюнтцинга, В. В. Сахарова, А. Р. Жебрака та інших дослідників.

Слід зауважити, що поліплоїдні форми рослин можна отримувати штучно з допомогою хімічних сполук, що блокують розходження подвоєних хромосом. Для цієї мети широко використовується алкалоїд **колхіцин**, який зв'язується з мономерами білка тубуліну і зашкоджує утворенню в клітині ахроматинових волокон веретина, що складаються із полімерного (фібрилярного) **тубуліну**. Цим самим колхіцин, вінбластин та інші мітозні отрути блокують розходження хромосом і спричиняють поліплоїдизацію. Камфора аналогічно впливає на клітини дріжджів, на які колхіцин практично не діє. Інший шлях штучного отримання автополіплоїдів у рослин — це злиття нередукованих мікро- і макроспор. Останні можуть утворюватись за дії на рослини тепла або холоду, наркотичних речовин тощо.

Автополіплоїдію можна штучно спровокувати і у деяких тварин, а саме у амфібій. Якщо шойно запліднені яйця тритона піддати впливу високої або низької температури, то іноді з них розвиваються триплоїдні організми, які, щоправда, досить рано гинуть. Поліплоїдні форми шовкопряда *Bombix mori* отримав Б. Л. Астауров. Після дії високої температури на яйця шовкопряда останні отримують здатність до партеногенетичного розвитку. При цьому інколи виникають тетраплоїдні самки.

Мейоз у автополіплоїдів має свої особливості. Утворення у випадку високої плоїдності в профазі мейозу не тільки бівалентів, але й тривалентів, тетравалентів, полівалентів і унівалентів істотно впливає на генетичну структуру та життєздатність різних класів гамет і на фенотипи можливих нащадків. Співвідношення типів га-

мет, які продукуються автополіплоїдами, перш за все визначається тривкістю зчеплення між окремими генами і центромерою. За повного зчеплення гена і центромери спостерігається так зване **хромосомне розщеплення**, тобто у цьому випадку в мейозі комбінуються гомологічні хромосоми. Інший варіант — так зване **хроматидне розщеплення**, коли ген виявляє неповне зчеплення з центромерою, і в процесі мейозу комбінуються не хромосоми, а хроматиди. В останньому випадку іноді можлива **подвійна редукція** — досить складний процес з участю рекомбінаційних механізмів, завдяки якому, наприклад, у триплекса $AAAa$ утворюються гамети aa (рис. 11.39). Попадання двох хроматид з рецесивним алелем a в одну і ту ж гамету забезпечується актом генетичної рекомбінації між несестринськими хроматидами, а також двома наступними мейотичними поділами, чому це явище і отримало назву «подвійної редукції». Слід зазначити, що суцільно хромосомне розщеплення спостерігається дуже рідко. Виключно хроматидне розщеплення теж обмежене у зв'язку з частковим зчепленням генів із центромерою, різними типами кон'югації гомологічних хромосом (мультивалентна чи бівалентна), особливостями їх розходження в анафазі I та іншими причинами. Для того, щоб здійснювалась подвійна редукція, крім інших умов, необхідна кон'югація хромосом квадριвалентами і одночасний відхід рекомбінантних хроматид до одного полюса (рис. 11.39). Величина подвійної редукції дуже змінюється залежно від частоти кросинговеру, генотипу досліджуваного об'єкта та факторів середовища.

Чисто хромосомне або чисто хроматидне розщеплення слід розглядати лише як крайні, теоретично можливі варіанти. Як правило, вони в мейозі поліплоїдів поєднуються, що вносить значні корективи в теоретично розраховані формули згаданих розщеплень. Співставляючи реальне розщеплення за моногібридного схрещування поліплоїдів з теоретично можливим за хромосомного чи хроматидного розщеплення, можна визначити ступінь зчеплення генів з центромерами. Співвідношення різних типів гамет у тетраплоїдів за хромосомного чи хроматидного (без подвійної редукції) розщеплення наведено в табл. 11.2.

Щоб переконатись у правильності наведених у таблиці співвідношень типів гамет, слід перебрати всі комбінації (в варіантах по дві) із наявних хромосом (іх 4) або хроматид (іх 8). Подвійна редукція збільшує долю гамет, що утримують рецесивний алель у гомозиготному стані. Так, співвідношення гамет, утворюваних триплексом ($AAAa$) за хроматидного розщеплення складає $15AA : 12Aa : 1aa$, а з урахуванням максимальної подвійної редукції — $13AA : 10Aa : 1aa$.

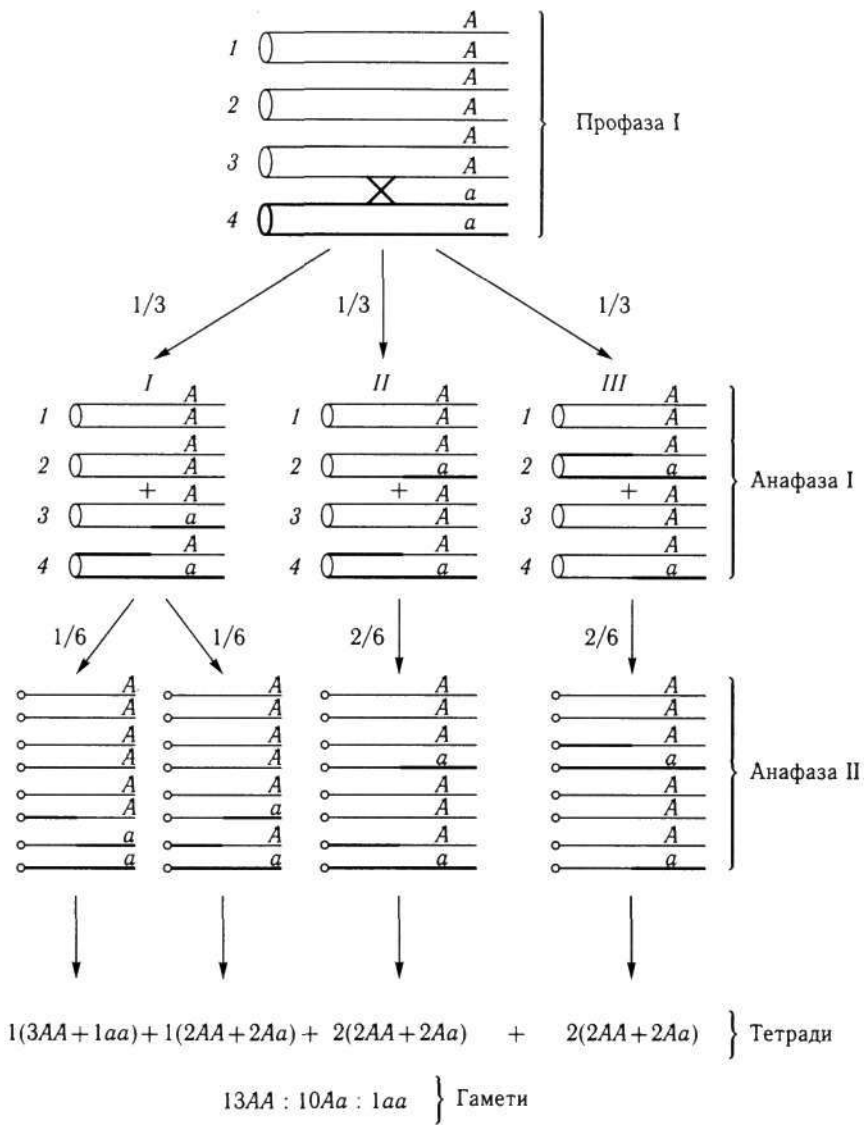


Рис. 11.39. Утворення гамет у тетраполіплоїда триплекса $AAAa$ за максимальної подвійної редукції:

Вірогідність кросинговеру (x) на ділянці ген-центромера дорівнює 1. 1—4 — номери центромер. I, II, III — типи розходження центромер в анафазі I

Таблиця 112

Типи гамет у тетраплоїдів за рівномірного (2:2) розходження хромосом і хроматид

Тетраплоїд	Генотип	Співвідношення типів гамет за	
		хромосомного розщеплення	хроматидного розщеплення
Квадриплекс	AAAA	AA	AA
Триплекс	AAAa	1AA 1Aa	15AA 12Aa 1aa
Дуплекс	AAaa	1AA 4Aa 1aa	3AA 8Aa 3aa
Симплекс	Aaaa	1Aa 1aa	1AA 12Aa 15aa
Нуліплекс	aaaa	aa	aa

Розглядаючи хромосомне та хроматидне розщеплення у автотетраплоїдів, ми виходили з того, що хромосоми і хроматиди рівномірно (порівну) розходяться в анафазі мейозу. Проте можливі і інші ситуації. За редукційного поділу автотетраплоїда *AAaa* розходження гомологічних хромосом до полюсів можливе не тільки у співвідношенні 2:2, але й 3:1, 1:3, 4:0, 0:4. За правильного (2:2) розходження хромосом тетраплоїд *AAaa* продукує гамети у співвідношенні 1AA:4Aa:1aa; в F_2 розщеплення по фенотипу складає 35:1, тобто істотно відрізняється від розщеплення у диплоїда (3:1). Таким чином, поява гомозиготних рецесивних форм у автотетраплоїдів у багато разів менш імовірна, ніж у диплоїдів. З цього виходить, що:

- 1) поліплоїдність краще підтримує гетерозиготність у порівнянні з диплоїдністю і тим самим сприяє збереженню гетерозису;
- 2) поліплоїдність утруднює процес переходу гетерозиготних форм у гомозиготні;
- 3) добір по окремих маркованих генах краще вести на низькому рівні плоїдності.

За нерівномірного розходження хромосом у автотетраплоїда *AAaa* можуть виникнути гамети зовсім іншого типу, а саме *AAa* і *a*, *Aaa* і *A*, *AAaa* і *O*. Частина таких гамет нежиттєздатна, інші, будучи неповноцінними, можуть утворювати нежиттєздатні зиготи.

У незбалансованих автополіплоїдів мейоз завжди дуже порушений, оскільки за кон'югації непарної кількості гомологів їх розподіл між дочірніми клітинами є непрогнозованим. Так, у триплоїда ($3n$) дві хромосоми із кожної трійки гомологів відходять до одного полюса, а третя — до іншого, у пентаплоїда ($5n$) гомологи можуть розходитись у таких варіантах: 4 + 1, 3 + 2, 5 + 0. Тому більшість гамет (або спор) незбалансованих поліплоїдів нежиттєздатні і такі

поліплоїди мають дуже низьку плодючість або зовсім не здатні давати насіння (триплоїдні кавуни, триплоїдна осина, триплоїдний буряк).

Все зазначене щодо особливостей мейозу у автополіплоїдів свідчить про те, що порушення гаметогенезу є, очевидно, головною причиною їх низької фертильності. Плодючість автополіплоїдів вдається підвищити лише після додаткової селекції.

Алополіплоїдія

Алополіплоїди виникають внаслідок схрещувань різних видів і об'єднують різні геноми. Міжвидові гібриди, які мають суму наборів хромосом батьківських форм, М. С. Навашин назвав **амфідиплоїдами**. Отже, якщо міжвидовий гібрид поєднує геноми *A* і *B* в одиничних копіях (*AB*), то це **амфігаплоїд** (алодиплоїд), а гібрид з подвоєними геномами (*AABB*) — **амфідиплоїд** (алотетраплоїд). Незбалансований набір генотипів різних видів типу *ABB* або *AAB* називають **сесквіполіплоїдом**. Гібриди від схрещувань різних видів і родів називають **віддаленими гібридами**. Хромосомні набори алополіплоїда різняться не тільки числом хромосом, але й їх генетичним складом. Однак деякі хромосоми із різних генотипів можуть мати часткову (локальну) гомологію і вступати в неповну кон'югацію під час мейозу, що може порушити його нормальний хід. Такі хромосоми, на відміну від гомологічних хромосом, називають **гомеологічними**.

Кон'югація в мейозі гомеологічних хромосом (**алосиндез**) свідчить про те, що геноми, поєднані у складі алополіплоїда, в далекому минулому могли мати спільного предка. Іноді кон'югація хромосом і утворення бівалентів трапляється навіть у межах гаплоїдного набору хромосом. Алосиндез може істотно впливати на хід мейозу, порушуючи нормальну кон'югацію гомологічних хромосом, тобто **автосиндез**. Це може бути серйозною причиною генетичної нестабільності деяких штучно отриманих алополіплоїдів, наприклад вже нам відомого тритикале.

Гібриди F_1 від схрещування двох різних видів виявляються безплідними (гібриди жита з пшеницею, редьки з капустою, кобили з ослом тощо). Причиною цього явища є неможливість нормального мейозу із-за відсутності нормальних гомологів у амфігаплоїда. Так, наприклад, амфігаплоїд редьки (*Raphanus sativus*) і капусти (*Brassica oleracea*) містить лише по одному набору хромосом цих батьків. Однак у наборі хромосом капусти немає гомологів для хромосом редьки і навпаки, тому кожна із хромосом поводить себе в мейозі цілком незалежно — як унівалент. В анафазі редуційного

поділу ці уніваленти (їх всього 18) розходяться до полюсів неупорядковано, випадково, і утворюються гамети з різною кількістю хромосом — від 0 до 18. Отже, у такого гібриду нормального розвитку гамет не відбувається, і він є стерильним. Лише деяка частина гамет випадково отримує всі 18 хромосом гібриду (9 хромосом редьки і 9 хромосом капусти). Злиття таких нередукованих гамет забезпечує наявність у зиготи подвоєних наборів хромосом редьки ($2R$) і капусти ($2B$). Це створює умови для нормального мейозу, бо кожна хромосома може кон'югувати із своїм гомологом, а рівномірне розходження хромосом в анафазі мейозу забезпечує утворення фертильних гамет. Останні містять по одному повноцінному геному редьки і капусти ($R + B$). Ця нова форма рослини була синтезована Г. Д. Карпеченко на початку 20-х років і була названа рафанобрасикою (від родових назв батьківських форм). У цього амфідиплоїда ($2R + 2B$) стручок виявився комбінованим — верхня частина від редьки, а основа стручка — від капусти (рис. 11.40). На жаль, гича

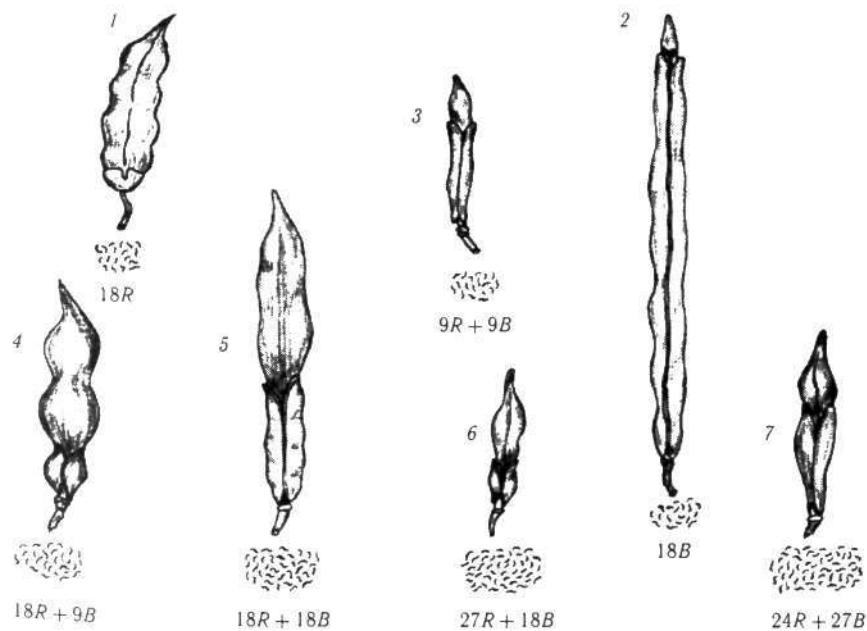


Рис. 11.40. Плоди і хромосомні набори *Raphanus*, *Brassica* і їх гібридів:

1 — *Raphanus*; 2 — *Brassica*; 3 — гібрид F_1 ; 4 — гібридний триплоїд; 5 — гібридний тетраплоїд; 6 — гібридний пентаплоїд; 7 — гібридний гіпогексаплоїд. R — хромосоми редьки, B — хромосоми капусти.

цієї рослини нагадує редьку, а корені більш подібні до капустяних, тому практичного застосування цей вперше штучно синтезований плідний алополіплоїд не знайшов. Незважаючи на це, дослід Г. Д. Карпеченко мав величезне наукове значення.

Було експериментально доведено, що подвоєння хромосомних наборів у міжвидових і міжродових гібридів може призвести до отримання плідних алополіплоїдних форм. У подальшому плідні алополіплоїди були отримані для тютюну та сотень інших рослин.

У подібних дослідах був з'ясований ще один надзвичайно важливий факт: виявилось, що генетичні відмінності в плодючості алополіплоїдів можуть визначатися, крім усього іншого, сумісністю або несумісністю геномів з цитоплазмою. У рафанобрасики цитоплазма належить редьці. Для визначення ролі цитоплазми Г. Д. Карпеченко провів зворотні схрещування цього амфідиплоїда з обома диплоїдними батьківськими формами: рафанобрасика \times редька і рафанобрасика \times капуста. З'ясувалося, що за останнього бекросу нормальних гамет не утворюється, а за першого, коли хромосоми редьки пилком вносяться в «свою» цитоплазму, рослина виявляється частково плідною. Отже, цитоплазма в гаметогенезі у алополіплоїдів грає істотну роль.

Як за внутрішньовидових, так і за міжвидових схрещувань можна вивести **лінії з заміщеними хромосомами**. Створення таких та **доповнених по хромосомах ліній** має велике значення для селекції і для наукових досліджень по з'ясуванню гомології генів, їх взаємодії і ступеня гомеології хромосом різних видів. Прикладом таких досліджень може бути отримання житньо-пшеничних гібридів та введення хромосом жита в геном пшениці. Схрещуванням жита ($2n = 14$) з м'якою пшеницею ($2n = 42$) вдалося отримати міжвидовий гібрид з $2n = 28$. Подвоєння кількості його хромосом за допомогою колхіцину привело до утворення форми, яка отримала назву *Triticale*. Схрещуванням *Triticale* ($2n = 56$) з м'якою пшеницею ($2n = 42$) отримали рослини ($2n = 49$), що мали диплоїдний набір хромосом пшениці і гаплоїдний набір хромосом жита ($2n = 42 + 7$). Якщо цих рослин далі схрещувати з пшеницею, то із-за випадкового розходження в мейозі неспарених житніх хромосом можуть появилися нащадки з числом хромосом від 42 до 49. Форми з набором хромосом $2n = 43$ на додаток до повного набору хромосом пшениці містять одну хромосому жита. Самозапиленням цих 43-хромосомних моносомиків можна отримати нащадків з 42, 43 і 44 хромосомами. Рослини з $2n = 44$ — це дисомики по одній парі хромосом жита, що доповнює повний диплоїдний набір пшениці ($2n = 42 + 2$). Подібним способом отримують лінії пшениці з додатковими хромосомами інших злаків. Незважаючи на трудоемкість цього методич-

ного підходу, він і сьогодні, за можливостей генної інженерії, не втратив свого значення.

Серед тваринного світу міжвидова гібридизація з подальшим утворенням стабільних і плодючих алополіплоїдів не розповсюджена, але й повністю виключити її значення для еволюції не можна. Є чимало прикладів створення нових порід та гібридів тварин за допомогою міжвидових схрещувань. Гібридизацією звичайної великої рогатої худоби з зебу в Техасі (США) і на Ямайці виведені породи, що добре переносять жаркий клімат і мало приваблюють кліщів-переносників піроплазмозу. Отримано (в колишньому СРСР) плідних гібридів білуги і стерляді («бестери»), тонкорунних овець і дикого гірського барана (нова порода — архаро-мериноси). Цінними в господарському відношенні є гібриди коропа і карася, великої рогатої худоби з яками і т. п.

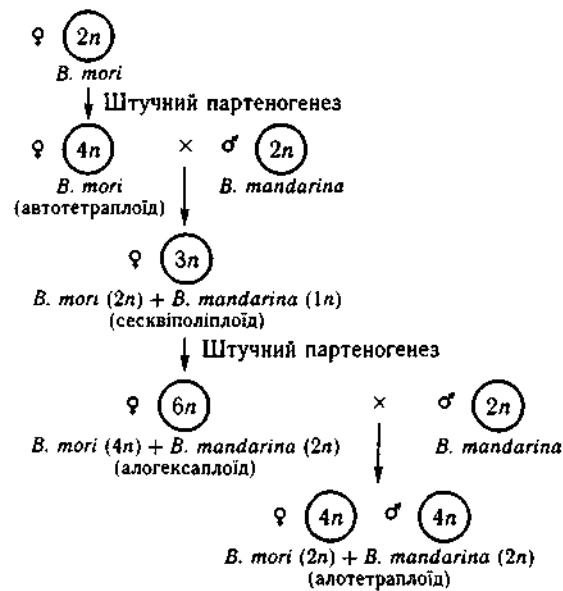


Рис 11.41 Схема отримання алотетраплоїда у *Bombix*

Однак плідні алополіплоїди у тварин є досить рідким явищем. Б. Л. Астаурову вдалося штучно створити перший плідний алополіплоїд від міжвидового гібриду шовкопрядів *Bombix mori* × *Bombix mandarina*. Схема отримання амфідиплоїдного шовкопряда по Б. Л. Астаурову наведена на рис. 11.41.

Поліплоїдія і еволюція

Зважаючи на широке розповсюдження поліплоїдів у рослинному світі, є підстави вважати, що поліплоїдизація геномів — один із найважливіших шляхів виникнення нових форм рослин, а потім і видів. Є чимало груп споріднених видів рослин, які відрізняються один від одного кратним збільшенням так званого основного числа хромосом, яке, можливо, складало геном спільного для всіх цих видів предка. Групу таких споріднених видів називають **поліплоїдним рядом**. **Основне число** хромосом x — це найменше гаплоїдне число в поліплоїдному ряду. Відомі роди рослин з одним або кількома поліплоїдними рядами видів. Наприклад, рід роза (*Rosa*) складається із багатьох видів, що мають відповідно 14, 21, 28, 42 і 56 хромосом. Основним числом цього ряду є 7 хромосом. Рід вика (*Vicia*) має два поліплоїдних ряди. Основне число хромосом у різних поліплоїдних рядів неоднакове, що залежить від гаплоїдного числа хромосом у вихідного виду або його предка.

Щодо тварин, у яких поліплоїдія зустрічається рідко, то поліплоїдні ряди видів відомі лише у аскарид, земляних черв'яків, амфібій і деяких інших, які є або гермафродитами, або розмножуються партеногенетично. Найчастіше поліплоїдні ряди у тварин є двочленими ($2n$ і $4n$). Вони знайдені у деяких комах і амфібій. Отримано чимало автополіплоїдних особин тутового шовкопряда, тритона і навіть деяких ссавців (миша, кролик). У автотетраплоїдів шовкопряда *Bombix mori* самки плодючі, а самці стерильні. Пояснюється це тим, що у гомогаметної статі (самців шовкопряда) в профазі мейозу утворюються поліваленти і виникають гамети з анеуплоїдним числом хромосом. Отже, у тварин, які розмножуються статевим шляхом, порушення гаметогенезу обмежує можливість розповсюдження поліплоїдних форм.

В протилежність тваринам, багато рослин являють собою автополіплоїди або алополіплоїди. Згідно з теорією О. Вінге (1917), алополіплоїдні ряди у природі виникають шляхом гібридизації видів і наступного подвоєння обох батьківських хромосомних наборів. Близку підтвердження ця теорія знайшла в роботах шведського генетика А. Мюнтцинга та інших авторів. Схрещуючи два види жабрію (у кожного $2n = 16$), Мюнтцинг спершу отримав амфігаплоїд ($8A + 8B$), а потім із нього — амфідиплоїд з $2n = 32$. Останній виявився майже ідентичним третьому виду цієї рослини, що реально існує в природі і має назву жабрій звичайний (*Galeopsis tetrahit*). Болгарський вчений Д. Костов ресинтезував вид тютюну *Nicotiana tabacum*, а В. А. Рибіним ресинтезована культурна слива (*Prunus domestica*) схрещуванням терну *P. spinosa* ($2n = 32$) з аличою

P. divaricata ($2n = 16$). Ця ресинтезована форма мала $2n = 48$, як і культурна слива. Крім того, за фенотипом вона була дуже схожа на культурну сливу і легко з нею схрещувалась.

Сьогодні немає сумнівів у тому, що численні види рослин являють собою алополіплоїди. Немало серед них і культурних рослин, які виникли внаслідок міжвидової гібридизації з наступним подвоєнням хромосомного складу гібридів. Пшениця-однозернянка *Triticum monosocum* має один геном ($n = 7$), який позначається буквою *A*. Геномна формула цієї диплоїдної пшениці — *AA* ($2n = 14$). Схрещування цієї пшениці з диким злаком *Aegilops speltoides* (*BB*, $2n = 14$) з наступним подвоєнням хромосом у гібриду привело до виникнення нового виду — твердої пшениці. Її геномна формула — *AABB* ($2n = 28$), тобто вона є алотетраплоїдом. Гібридизація твердої пшениці з іншим диким злаком *Aegilops squarrosa* (геномна формула *DD*, $2n = 14$) призвела до утворення алогексаплоїдного виду — м'якої пшениці (геномна формула — *AABBDD*, $2n = 42$). Цей шлях еволюції пшениць був підтверджений штучним ресинтезом їх методом відповідних схрещувань.

Такі дослідження, доповнені цитологічними методами — вивченням мейозу і кон'югації хромосом, являють собою окремий розділ генетики — **геномний аналіз**. Його мета полягає не тільки у визначенні геномних формул диких і культурних рослин, але й у з'ясуванні подібностей і відмінностей як самих геномів, так і окремих хромосом у алополіплоїдів. Тим самим відтворюється можливий шлях еволюційного розвитку виду на рівні геному.

Порівняльне вивчення структури геномів різних видів, включаючи і сучасні молекулярногенетичні підходи, свідчить про те, що поліплоїдія являє собою важливе джерело спадкової мінливості, яке збільшує можливості добору і дивергенції видів. В еволюції рослин-самоzapильників і у тварин, які розмножуються безстатевим способом, більше значення, можливо, мала автополіплоїдія, а у перехресноzapильних рослин — алополіплоїдія. Однак, враховуючи все сказане, можна вважати, що в еволюції тварин першорядне значення належить все-таки не поліплоїдії, а міжхромосомним та внутрішньохромосомним перебудовам.

11.7.4. Гаплоїдія

Гаплоїдом або **моноплоїдом** називають організм, що утримує в соматичних клітинах гаплоїдний набір негомологічних хромосом. Гаплоїдія може бути природною і визваною штучно. Для численних організмів (одноклітинних і багатоклітинних) гаплоїдний стан

клітин є природним явищем. Серед них — гриби, водорості, самці деяких комах — бджіл, мурашок, їздців та ін. Природна гаплоїдія зустрічається в життєвому циклі більшості еукаріотів. Тому гаплоїдію, як і інші зміни плідності, не завжди слід рахувати мутантним станом. Однак, якщо гаплоїдними виявляються організми, які в нормі мають хромосомні набори більш високої плідності, то гаплоїдність слід розглядати як мутацію.

Вперше гаплоїд у вищих рослин був виявлений у дурману в 1921 р. З тих пір гаплоїдія на стадії спорофіта описана для численних представників рослинного світу: томату, тютюну, пшениці, кукурудзи та ін. У тварин гаплоїдія трапляється рідко.

Фенотип гаплоїдів має ряд особливостей, які відрізняють його від диплоїдної форми:

1. Гаплоїд, як правило, фенотипово подібний до відповідного диплоїда, але має менші розміри.

2. У гаплоїдів проявляються як домінуючі, так і рецесивні гени із-за відсутності альтернативних алелей.

3. Клітини гаплоїдів мають менші розміри, ніж клітини відповідних диплоїдів, що може пояснюватися меншою дозою генів.

4. Гаплоїди майже завжди безплідні, бо із-за відсутності гомологічних хромосом мейоз у них проходить дуже аномально.

5. В дуже нечастих випадках у гаплоїдів утворюються нередуковані гамети, здатні до запліднення. Злиття таких гамет за самозапилення призводить до утворення диплоїда, гомозиготного по всіх генах.

Крім гаплоїдів, які виникають у диплоїдних видів, існують так звані **полігаплоїди**, яких можна отримати від збалансованих алополіплоїдів. Поліплоїдні клітини утримують два або більшу кількість різних геномів, серед яких можуть бути еволюційно дуже споріднені. В цьому випадку мейоз у полігаплоїдів може проходити з утворенням бівалентів і фертильних гамет. Прикладом слугує мейоз у полігаплоїдів тимофіївки ($2n = 42$), яка є алогексаплоїдом.

Гаплоїдія являє значний інтерес для генетиків і селекціонерів, які працюють з вищими рослинами. Це пояснюється тим, що у гаплоїдів легко виявити шкідливі і корисні рецесивні гени, а гаплоїдну форму рослини, позбавлену шкідливих мутацій, можна перевести в диплоїдну. Тим самим скорочується час генетичного аналізу, і створюються умови для досить точного визначення селекційної цінності батьківських форм і гібридів. Саме таким шляхом, тобто перетворенням перспективних гаплоїдів у диплоїди, отримано нові форми томату, тютюну, бавовника та інших рослин.

Спонтанно гаплоїди у рослин виникають рідко і є, як правило, результатом апоміктичного розвитку зародка. У пшениці це явище

спостерігається з частотою 4 на 1000 рослин, у кукурудзи — 1 на 2000 рослин і т. ін. Існують, однак, лінії, що дають значно вищий процент спонтанної гаплоїдизації.

Штучно гаплоїдні форми можна отримати декількома способами:

1. Запиленням пилом іншого виду.
2. Запиленням пилом, що має зруйновані ядра внаслідок дії опромінення або інших чинників.
3. Затримкою запилення, внаслідок чого яйцеклітина може поділитися без запліднення.
4. Близнюковим методом — у деяких рослин із одного насіння розвивається два або більше зародків, один із яких може бути гаплоїдним.
5. Методом культури пильників на штучному середовищі (саме так для багатьох видів рослин можна отримати гаплоїдні форми-регенеранти).

Перетворення гаплоїдів у диплоїди можна добитися самозапиленням рослин, враховуючи можливу наявність у них нередукованих спор, а також диплоїдизацією з допомогою колхіцину та інших мітотичних отрут.

11.8. Механізми спонтанного та індукованого мутагенезу

11.8.1. Передмутаційні зміни генетичного матеріалу. Фізіологічна теорія мутагенезу

У відповідності з фізіологічною гіпотезою мутаційного процесу М. Ю. Лобашова мутації слід розглядати як наслідок випадкових помилок або індукованих порушень нормальних процесів клітинної фізіології і в першу чергу так званих «трьох Р»: реплікації, репарації і рекомбінації. Ферменти цих найважливіших генетичних процесів сумісно забезпечують функціонування в клітині численних систем захисту структури ДНК. Завдяки наявності таких захисних механізмів не всякі зміни молекулярної організації генетичного матеріалу можна вважати мутаціями. Більшість цих змін усувається системами захисту ДНК, отже не успадковується і не є мутаціями. Такі тимчасові порушення структури ДНК називають **потенційними** або **передмутаційними** змінами генетичного матеріалу. Зазна-

чені зміни можуть виникати внаслідок внутрішніх причин — тих чи інших помилок у функціонуванні ферментів реплікації, рекомбінації та інших, а можуть індукуватися чинниками зовнішнього середовища. Значно зростає кількість мутацій за SOS-репарації, яка йде з помилками, завдяки експресії генів *umuC*, *umuD* та інших. Механізм впливу генів-мутаторів на процес мутабельності сьогодні в загальних рисах з'ясований. Суть полягає в тому, що продукти деяких генів можуть модифікувати дію ДНК-полімераз та інших ферментів реплікації, репарації та рекомбінації, дозволяючи їм працювати з помилками. Останнє, як вже зазначалося, лежить в основі як спонтанних, так і індукованих мутацій.

Основною причиною природного та індукованого мутування слід вважати біохімічні зміни в клітині, що спричиняють порушення основних матричних процесів. Фактори зовнішнього середовища (ультрафіолет, іонізуючі опромінення, хімічні мутагени та ін.) значно модифікують інтенсивність мутаційного процесу за рахунок збільшення кількості передмутаційних змін у ДНК або шляхом впливу на ефективність генетико-біохімічних систем репродукції і захисту спадкового матеріалу. В протилежність цьому все, що сприяє зменшенню потенційних змін у ДНК або збільшує можливості репараційних процесів, буде виявляти антимутагенний ефект, який сьогодні відомий у численних хімічних сполук — **антимутагенів**.

Відомо, що частина помилок реплікації залежить від співвідношення полімеразної і 3' → 5'-екзонуклеазної активності ДНК-полімераза. Цей факт пояснюється тим, що 3' → 5'-екзонуклеазна активність ДНК-полімераза виконує коректорську функцію, вилучаючи щойно вбудовані в ДНК помилкові нуклеотиди. Співвідношення полімеразної та екзонуклеазної активностей зменшується в ряду мутатор — дикий тип — антимутатор. Прикладом можуть бути деякі мутанти по гену 43 фага T4, які відрізняються збільшеною або зменшеною частотою спонтанних мутацій в інших генах. З'ясувалося, що ген 43 у фага T4 кодує реплікативну ДНК-полімеразу. У окремих мутантів цей фермент відрізняється високим співвідношенням 5' → 3'-полімеразної до 3' → 5'-екзонуклеазної активності. Мутанти по локусу *rII* з такою ДНК-полімеразою в 2000 разів частіше, ніж звичайно, виявляли реверсію до дикого типу, тобто наявний у цих мутантів алель гена 43 виявляє властивості мутатора. Інші мутанти фага T4 по гену 43 в порівнянні з диким типом мали значно нижчий рівень як спонтанної, так і індукованої мутабельності, що вдалося пояснити особливими властивостями їх ДНК-полімерази. Ген 43 у цьому випадку виступає як антимутатор.

Мутаторну і антимутаторну активність виявляють також деякі мутантні алелі ДНК-полімераза у бактерій і еукаріотів. Відповідний

фермент з високою мутагенною активністю знайдено, наприклад, у людей, хворих лейкемією. Всі ці факти підтверджують думку про те, що виникнення мутацій у клітині — процес фізіологічний, який вимагає певного часу і участі в ньому ферментів.

Важлива роль ферментів репарації і рекомбінації в процесах мутагенезу добре з'ясована в дослідках на кишковій паличці. Саме ці ферменти мають першорядне значення в перетворенні передмутаційних змін ДНК у мутації. Відомо, що структурні зміни генів *lexA* і *recA* впливають на ефективність рекомбінації, репарації і можуть призвести до часткового або повного пригнічення мутаційного процесу в умовах ультрафіолетового або іонізуючого опромінення, а також за дії деяких хімічних мутагенів. Мутації в генах *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD* підвищують частоту мутацій, визваних дією на клітину ультрафіолетового опромінення. Мутації в гені *uvrE*, який контролює ліквідацію односторонніх розривів у ДНК після ультрафіолетового опромінення, збільшує кількість транзицій АТ → ГС у 350—400 разів, а транзицій ГС → АТ у 150—200 разів. Кореляція високої спонтанної мутабельності з дефектами систем репарації у дріжджів-сахароміцетів була виявлена в 1968 р. І. А. Захаровим (СРСР) і Р. фон Борстелом (США).

Відомі факти залежності процесів мутабельності від генетичних систем репарації і рекомбінації у еукаріотів. Ген-мутатор *tu* у дрозофіли спричиняє підвищення мутабельності в умовах дії ренгівського опромінення або мутагену метилметансульфонату. Порушення генів темної репарації у людини призводить до декількох форм спадкового захворювання *Xeroderma pigmentosa*, що супроводжується високою чутливістю шкіри до ультрафіолетового опромінення.

Безпосередню участь рекомбінації в мутаційних процесах засвідчує те, що змінені за структурою гени часто локалізуються там, де відбуваються обміни гомологічних послідовностей хромосом за рекомбінації. У дріжджів *S. cerevisiae* описано так званий **мейотичний ефект**, суть якого полягає в тому, що деякі типи спонтанних мутацій значно частіше виникають у мейозі. Це відноситься як до вставок, так і до делецій окремих пар азотистих основ, які можуть бути наслідком не зовсім точної рекомбінації. Однак вклад рекомбінації у мутаційний процес не обмежується тільки локальними помилками. Цілий ряд мутацій може виникати внаслідок реципрокних і нерципрокних перемішень ділянок ДНК, що супроводжують інверсії, транслокації, транспозиції та інші перебудови хромосом. Крім того, ферменти рекомбінації необхідні для постреплікативної репарації, яка в свою чергу визначає подальшу долю передмутаційних змін у ДНК.

11.8.2. Мутагенні чинники і ДНК

Мутагенними називають фізичні та хімічні чинники, що спричиняють структурні зміни генетичного матеріалу. Серед фізичних чинників найбільший інтерес викликають ультрафіолетові та радіаційні опромінення, які часто використовуються для **індукованого мутагенезу**. З цією ж метою можна скористатися сотнями хімічних мутагенів, особливості мутагенного впливу яких визначаються типом їх взаємодії з ДНК. Хоч механізми виникнення мутацій в загальних рисах є спільними, кожний мутагенний агент виявляє ряд особливостей в процесі ушкодження ДНК.

Мутагенний ефект ультрафіолетового опромінення виявляється лише в клітинних моношарах, таких як мікроорганізми, пилкок, спори, поверхневі клітини шкіри і т. п. Це пояснюється низькою проникливістю тканини для ультрафіолетового проміння. Найбільш мутагенним виявилось опромінення з довжиною хвилі близько 260 нм, бо воно поглинається молекулами ДНК. Фотони ультрафіолетового світла мають малу енергію (3–5 eV), яка не може спричинити іонізації молекул. Під їх дією виникає лише збудження молекул, що в подальшому призводить до хімічних змін: утворення димерів тиміну, гідратації цитозину і урацилу, розриву водневих зв'язків і зшиванню ДНК з білками.

Під впливом ультрафіолетового опромінення виникають як генні мутації, так і перебудови хромосом. В межах зростання відносно невеликих доз опромінення частота мутацій зростає прямо пропорційно, а в межах високих доз кількість мутацій на одиницю затраченої енергії зменшується.

Серед димерів піримідинів циклобутанового типу, що утворюються за впливу ультрафіолетового опромінення на ДНК, найчастіше виникають димери тиміну (рис. 11.42), на долю яких випадає

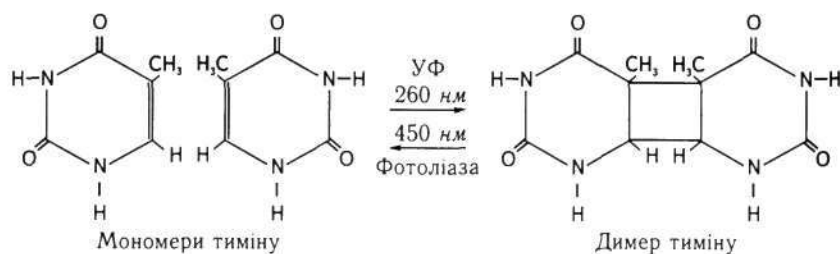


Рис. 11.42. Утворення димеру тиміну за УФ-опромінення і розрізання димеру за світлової репарації

до 40% всього числа димерів. Димери ТС (тимін-цитозин) і СС (цитозин-цитозин) зустрічаються дещо рідше. За досить високої інтенсивності опромінення настає момент, коли ДНК насичується димерами (в останні включається до 15% усіх азотистих основ). Тоді одночасно з утворенням нових димерів відбувається їх розщеплення, і ці протилежні процеси врівноважуються. Вважають, що за дії ультрафіолетового світла *in vivo* виникнення тимінових димерів є найбільш типовою і найбільш розповсюдженою зміною будови ДНК. Підраховано, що кожний такий димер викликає затримку реплікації ДНК на 10—15 с, і за відсутності репаративних процесів накопичення згаданих змін могло б привести до дуже серйозних наслідків. Однак, завдяки репарації, ці ушкодження ДНК частково або повністю усуваються і тому можуть розглядатися лише як передмутаційні зміни.

Мутагенний ефект іонізуючих опромінь був відкритий Г. А. Надсоном і Г. С. Філіповим у 1925 р. після обробки клітин дріжджів «променями радію». В 1927 р. Г. Меллер встановив мутагенну дію рентгенівського опромінення. В наші дні радіаційна генетика виросла в одну із головних наук сучасності, мета якої — оцінити і захистити спадковість людини від дії іонізуючих опромінь.

Для країн, що зазнали лиха від Чорнобильської аварії, і в першу чергу для України, вирішення проблем радіаційної генетики має першорядне значення.

Існуючі опромінення, як електромагнітні (рентгенівські і гамма-промені), так і корпускулярні (бета-частки, протони, нейтрони, альфа-частки), проходячи через клітину, виривають із зовнішньої оболонки атомів і молекул електрони, які, в свою чергу, продовжують цей процес. Втративши енергію, вільні електрони приєднуються до інших атомів і молекул. Відрив електронів від зовнішньої оболонки атомів (молекул) веде до появи позитивних, а приєднання — до негативних іонів. Вважають, що саме так у тканинах із елементів води утворюються вільні активні радикали, які можуть ушкоджувати інші молекули.

Одиницю дози іонізуючих випромінювань складає *рад*, що відповідає поглинанню 100 *ergiv* енергії одним грамом речовини. В повітрі і в м'яких тканинах організму 1 *рад* дорівнює 1,07 рентгена. Сьогодні використовується інша одиниця дози опромінення, яка (за ім'ям англійського вченого С. Грея) отримала назву *грей (Гр)*. Один *грей* дорівнює 100 *рад* — це енергія в 1 Дж будь-якого іонізуючого випромінювання, яка поглинається масою в 1 кг.

Різні види випромінювань за однакових значень енергії, поглиненої тканинами, виявляють різний генетичний ефект. Якщо прий-

...етичну ефективність гама-випромінювань за одиницю, то повільні нейтрони ефективніші у 5 разів, α -частки і швидкі нейтрони — в 10, а важкі іони — в 20 разів. Однак для різних організмів, різних тканин і різних типів мутацій генетична ефективність окремих видів випромінювань може бути ще більш відмінною. Так, наприклад, деякі типи мутацій у рослин за дії швидких нейтронів виникають у 100 разів частіше, ніж за гама-опромінювання.

Генетичні ефекти радіації залежать як від їх **прямої дії** на компоненти клітини (**теорія мішені**), так і від **непрямого впливу** на генетичний апарат, опосередкованого згаданими активними радикалами, перекисним окисленням макромолекул та іншими порушеннями обміну речовин.

Частота індукованих проникаючою радіацією генних мутацій пропорційна дозі випромінювання. Криві «доза — ефект» відображують не підсилення ураження із зростанням дози, а збільшення його ймовірності. Навіть найменші дози іонізуючої радіації можуть привести до виникнення мутацій, в тому числі й летальних. Із збільшенням дози (незалежно від часу і способу її надання) зростає лише частота мутацій. Характерним для деяких радіаційних уражень є так званий кисневий ефект: за наявності кисню в клітині радіобіологічний ефект γ -опромінювання (але не α -часток) зростає.

Щодо природи можливих ушкоджень ДНК в умовах дії іонізуючих випромінювань, то ці ушкодження можуть бути дуже різноманітними: розрив водневих зв'язків у подвійній спіралі ДНК, одно- і дволанцюгові розриви, зшивки між двома ланцюгами ДНК, між ДНК і білками тощо.

Згідно з теорією мішені виникнення генних порушень по типу модифікацій азотистих основ, незначних делецій і поодиноких розривів хромосом є наслідком одиничних попадань іонізуючих часток, тобто одного акту іонізації певного об'єму мішені. Частота вказаних змін у структурі ДНК лінійно залежить від дози і не залежить від її потужності.

В протилежність генним ушкодженням, частота перебудов хромосом, таких як симетричні і асиметричні обміни, кінцеві нехватки, парацентричні і перичцентричні інверсії, часто виявляється пропорційною квадрату дози, що свідчить про двоударний механізм ушкодження. Однак аналіз дозової залежності перебудов хромосом в умовах рентгенівського опромінювання показав, що пряма залежність їх частоти від квадрату дози спостерігається не завжди. Отримано докази того, що в дійсності виникає суміш перебудов, в основі яких лежать як одноударні, так і двоударні механізми. На відміну від рентгенівських і гамма-променів, нейтрони і альфа-частинки дають щільну іонізацію в межах одного трека і ймовірність

виникнення двох розривів у хромосомі внаслідок одного «удару» за цих умов збільшується.

Пошкодження, що виникають в ДНК хромосом внаслідок прямої чи непрямой дії випромінювання, слід розглядати як такі, що потенційно здатні фіксуватися як мутації. Показано, що поява мутацій — це складні молекулярно-генетичні перетворення в хромосомах, які залежать від загального стану метаболізму і можуть бути модифіковані різними зовнішніми умовами (наявність кисню, температурні умови, інші чинники). Поява спадкових змін з цієї точки зору можлива лише через деякий час після перетворення потенційних змін у генні мутації та хромосомні перебудови. Вважають, що існує два класи потенційних змін, що виникають під впливом іонізуючих випромінювань. Перший призводить до мутацій, що фіксуються у фазі G1. До другого відносяться такі передмутаційні ушкодження, які перетворюються в мутації лише у фазі синтезу ДНК. Максимальний вихід мутацій із таких ушкоджень спостерігається тоді, коли опромінення проводиться як можна ближче до S-фази клітинного циклу. З подовженням строку між опроміненням і синтезом ДНК більша частина цих потенційних змін зникає і тому вихід мутацій зменшується.

Мутагенні ефекти хімічних сполук (хімічний мутагенез) сьогодні знаходяться в центрі уваги генетичних досліджень як такі, що мають дуже велике значення для екології, народного господарства і медицини.

Перші хімічні мутагени були відкриті в 30-х рр. В. В. Сахаровим, М. Ю. Лобашовим і С. М. Гершензоном, а через деякий час ці дослідження досягли широкого розмаху завдяки дослідженням І. А. Рапопорта (СРСР) і Ш. Ауербах (Великобританія), які вперше виявили 100-процентний мутагенний ефект у окремих хімічних сполук — **супермутагенів**. Сьогодні відомо дев'ять основних класів хімічних сполук, здатних спричиняти передмутаційні зміни в ДНК, які можуть згодом фіксуватись як мутації:

1. Алкілюючі сполуки.
2. Перекиси.
3. Альдегіди.
4. Гідроксиламіни.
5. Азотиста кислота та її похідні.
6. Антиметаболіти, в тому числі аналоги азотистих основ.
7. Солі важких металів.
8. Акридинові барвники.
9. Ряд речовин, різних за будовою, — уретан, гідроксиламін, алкалоїди, вільні радикали, деякі лікарські речовини, гербіциди, інсектициди та ін.

За механізмами мутагенної дії всі ці сполуки можна віднести до таких основних груп:

1. Хімічні агенти, що модифікують азотисті основи нуклеїнових кислот.

2. Аналоги азотистих основ, що можуть залучатися до складу полінуклеотидів.

3. Речовини-інтеркалятори, що здатні вбудовуватися між двома сусідніми азотистими основами полінуклеотидного ланцюга ДНК.

4. Сполуки з комбінованою мутагенною дією.

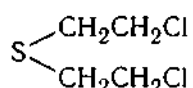
Одна із причин мутацій закладена в можливості існування основ ДНК в різних **таутомерних** формах. Якщо аденін знаходиться в іміноформі, він утворює пари з цитозином, а не з тиміном (рис. 11.43). Цей таутомерний перехід аденіну за наступної реплікації може призвести до транзиції АТ → GC. Розрахунки показують, що всі транзиції і трансверсії можна пояснити дещо неоднозначною відповідністю між окремими нуклеотидами в комплементарних ланцюгах ДНК.



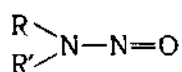
Рис. 11.43. Таутомерні зміни в аденіні, що призводять до утворення незаконної пари А—С замість А—Т

Численні хімічні сполуки, модифікуючи структуру азотистих основ, сприяють замінам типу транзицій і трансверсій. Так, наприклад, заміну GC-пари на АТ-пару можна отримати з допомогою азотистої кислоти (HNO_2), яка дезамінує аміногрупи до гідроксильних груп. При цьому цитозин перетворюється в урацил, який комплементарно з'єднується вже не з гуаніном, а з аденіном. Таким чином, здійснюється просте заміщення або транзиція. Під впливом азотистої кислоти аденін перетворюється в гіпоксантин, який (подібно гуаніну) має схильність з'єднуватись із цитозином. Багато інших хімічних модифікацій азотистих основ також мутагенні. Так, наприклад, до атома вуглецю у шостому положенні піримідинів може приєднуватися гідроксиламін, який виявляє слабку мутагенну активність. Найбільш сильними мутагенами є алкілюючі агенти, які

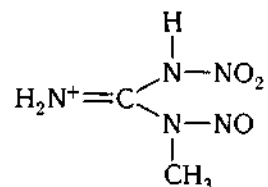
схильні вибірково взаємодіяти з атомом азоту в сьомому положенні гуанінових залишків. Внаслідок ряду причин, включаючи апуринізацію, алкілювання гуаніну призводить до збільшення кількості помилок за комплементарного злучення азотистих основ. До найбільш токсичних і могутніх алкілюючих агентів відноситься іприт і його сірковмісні аналоги, наприклад, біс-(2-хлоретил)сульфід:



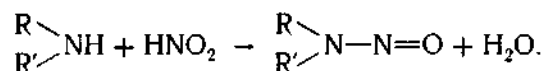
Біфункціональні сполуки цього типу викликають численні летальні поперечні зшивки ланцюгів ДНК. До іншого класу сильних мутагенних алкілюючих сполук відносяться нітрузоаміни:



В лабораторних генетичних дослідженнях часто використовують N-метил-N-нітро-N-нітрузогуанідин:



Він взаємодіє з одноланцюговими ділянками ДНК безпосередньо у вищій реплікації, крім того може діяти на ферменти реплісоми. Отже, це один із найбільш ефективних мутагенів, до того ж з сильним канцерогенним ефектом. Вважають, що нітрузоаміни відіграють важливу роль у розвитку рака у людей. Вони можуть утворюватися за взаємодії будь-якого вторинного аміну з азотною кислотою. Оскільки в рослинах міститься певна кількість нітратів, цілком можливо, що вони можуть відновлюватися до нітритів і взаємодіяти в шлунку із вторинними амінами за схемою:



Той факт, що до складу багатьох лікарських препаратів і природних харчових продуктів входять вторинні аміни, дає підстави вважати, що вони можуть грати важливу роль у виникненні мутацій і розвитку рака у людини.

Інший спосіб, за допомогою якого хімічні сполуки можуть спричинити мутації типу заміни основ, полягає в безпосередньому вбудовуванні сполуки-аналога в молекулу ДНК. Так, наприклад, 5-бромдезоксириндин, дуже сильний мутаген, може заміщати в ДНК тимідин. Менш ефективні агенти, що діють подібним чином (виступають як аналоги основ), — це 2-амінопурин і 2,6-діамінопурин.

В меншій мірі, ніж заміни пар основ, розповсюджені мутації із зсувом рамки зчитування. Такі мутанти, на відміну від мутантів з заміною основ, дуже рідко дають реверсії, і ці реверсії не індукуються речовинами, що викликають заміну основ. В той же час ре-

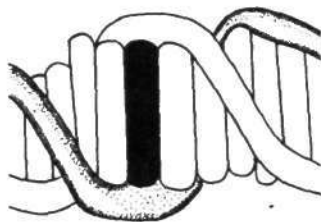


Рис. 11.44. Вставка молекули акридину (чорний диск) між нуклеотидами в спіралі ДНК

версія мутацій із зсувом рамки до дико-го типу легко індукується акридинами і іншими плоскими сполуками, що діють як інтеркалятори, вбудовуючись у спіраль ДНК (рис. 11.44). Ці ж самі інтеркалюючі речовини сприяють появі мутацій із зсувом рамки, особливо часто в ділянках ланцюга ДНК із багаторазовими повторами однієї і тієї ж основи, наприклад полі(А). Вклинюючись в один із ланцюгів ДНК між двома нуклеотидами, профлавін в 2 рази збільшує відстань між ними. За реплікації молекули

ДНК або в процесах кросинговеру вбудований у ДНК профлавін спричиняє утворення в місці свого знаходження делеції або вставки.

Слід зазначити, що сполуки-інтеркалятори часто не виявляють сильних мутагенних властивостей, в той час як сполуки, що поєднують в собі інтеркаляторну і алкілюючу дію, виявляються дуже ефективними. Більшість відомих сьогодні супермутагенів, тобто сполук, що викликають мутації у 100% випадків, можуть одночасно діяти на ДНК з допомогою декількох механізмів.

Багатьом хімічним мутагенам властива так звана подовжена дія, чого не буває за індукції мутацій фізичними агентами. Суть полягає в тому, що значна доля мутацій, які індукуються хімічними речовинами, виявляється не відразу, а значно пізніше, іноді через два-три покоління клітин. Відомо, що деякі хімічні сполуки (**промутагени**) перетворюються в мутагени лише в організмах рослин та тварин внаслідок так званої **метаболічної активації**. Так, наприклад, з'ясовано, що система мітросомного окиснення в печінці за участю цитохрому P₄₅₀, окисляючи деякі промутагени, перетворює їх у мутагени. Прикладом мутагену, який утворюється в організмі людини внаслідок метаболічної активації, може бути **афлатоксин** — про-

дукт одного із видів пліснявого гриба аспергіла. Подібних промутагенів відомо чимало, і це примушує дуже відповідально відноситися до упровадження нових хіміопрепаратів у народне господарство та медицину.

З явищем хімічного мутагенезу пов'язують вирішення проблеми спрямованого отримання мутацій бажаного типу. Розуміння особливостей дії мутагенів на молекулярну структуру ДНК дає можливість прогнозувати типи виникаючих мутацій. Так, наприклад, зворотні мутації, індуковані гідроксиламіном і амінопурином, найбільш ймовірно являють собою заміни АТ на ГС. В той же час зворотні мутації, що виникають під дією профлавіну та інших подібних акридину, — це мутації зсуву рамки зчитування.

Сьогодні для направленого (спрямованого) мутагенезу використовують різноманітні експериментальні підходи. Найбільш ефективною є перебудова клонованих генів *in vitro*. **Олігонуклеотид-направлений (сайт-специфічний) мутагенез** — один із найбільш простих методів отримання бажаних точкових мутацій. Найчастіше використовують одноланцюгову ДНК фага М13 (плюс-ланцюг), в якій вмонтовують кодуючий ланцюг гена-мішені. Останній гібридизують з комплементарним синтетичним олігонуклеотидом, що має, наприклад, одну азотисту основу, не комплементарну основі вбудованого гена. Цей олігонуклеотид слугує затравкою, а М13-вектор з вбудованим геном — матрицею для ДНК-полімеразної реакції. Синтезовану дволанцюгову ДНК замикають у кільце ДНК-лігазою фага Т4. Отримані кільцеві дволанцюгові молекули ДНК (фактично модифіковані геноми фагів М13) вводять у клітини *E. coli*.

Після розмноження фагових часток половина їх утримує ДНК дикого типу, а інша половина — мутантну ДНК із специфічною нуклеотидною заміною в клонованому гені. Мутантний ген вирізають із фагової ДНК і вбудовують у плазмиду, здатну експресуватися в *E. coli*.

Для отримання бажаних мутантних генів сьогодні розроблено чимало й інших методичних підходів, основаних на використанні безпосередньо плазмідних ДНК (без попереднього вбудовування гена у фаговий генотип), а також на поєднанні сайт-специфічного мутагенезу з полімеразною ланцюговою реакцією (розділ 13.3.1).

Для характеристики дії того чи іншого мутагену важливе значення має поняття **порогової дози**. Так називають ту дозу, зменшення якої виключає появу мутацій. Відомо, що у випадку іонізуючих випромінювань порогу дози нема, і мутації появляються за будь-яких незначних доз радіації. За дії хімічних мутагенів у малих дозах вихід мутацій може зменшуватись до нуля за рахунок метаболічної дезактивації, репарації, впливу антимутагенів та ін. Однак

для багатьох хімічних сполук, як і для радіації, порогової дози не виявлено. Відсутність або слабкість ефекту від малих доз мутагенів пояснюється не тим, що дана хімічна сполука в малих концентраціях не діє на ДНК, а тим, що пошкоджень у ДНК не дуже багато, і вони повністю усуваються системами репарації.

За вивчення дії малих доз хімічних мутагенів на спадковість Л. Самсоном і Дж. Кернсом встановлено явище так званої **адаптивної відповіді**. Автори показали, що після обробки клітин кишкової палички невеликими концентраціями N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину у цих клітин виникає певна стійкість до наступної обробки великими дозами цього мутагену. Наявність адаптивної відповіді встановлена для багатьох алкілюючих речовин, таких як N-метил-N-нітрозосечовина, метилметансульфонат та інші. Є докази, що зазначена адаптивна реакція клітин полягає в запуску механізмів індукованої репарації, яка, за даними П. Джего і співавторів, не має нічого спільного з SOS-репарацією.

11.9. Екологія і мутагенез

Чимало хімічних речовин, що сьогодні забруднюють довкілля і є відходами промисловості або речовинами, що використовуються в народному господарстві, виявляють **генетичну активність**. Серед цих речовин — діетилсульфат, β -пропіолактон, етиленімін, радіоактивні відходи, пестициди (інсектициди, фунгіциди, гербіциди) та ін. На жаль, мутагенна активність досить часто виявляється і у таких хімічних сполук, з якими людина щоденно зустрічається в побуті, — наприклад, у консервантів і харчових барвників, лікарських препаратів, косметичних засобів і таке інше. Збільшення концентрації мутагену в навколишньому середовищі сприяє розповсюдженню мутацій серед живих організмів і збільшує генетичний тягар усіх популяцій, включаючи і людину.

Здібність викликати мутації за незначних концентрацій та доз, відсутність порогових доз у іонізуючих випромінювань і деяких хіміопрепаратів, здатність радіоактивних і інших мутагенів накопичуватись у клітинах, — все це значно збільшує загрозу ушкодження генетичних систем, що існують на нашій планеті. Зростання частоти мутацій являє серйозну загрозу збереженню майбутніх поколінь. Досліди показали, що хромосомні перебудови в лейкоцитах крові жителів Хіросими і Нагасакі, японських міст, що перенесли атомне бомбардування у 1945 р., виявляються й досі. Чимало ге-

нетичних порушень знаходять у потерпілих за Чорнобильської трагедії та їх потомків. Ці факти свідчать про те, що використання атомної енергії завжди таїть у собі генетичну загрозу, і тому му- сить бути не тільки жорсткий контроль технічної безпеки, але й надійний контроль за станом біологічних систем у зоні можливого опромінення чи забруднення радіонуклідами.

Постійний контроль (**моніторинг**) генетичних змін природних популяцій необхідний у зв'язку з загальним погіршенням екологіч- них умов існування. Однією з причин такого погіршення ряд вчених вважає збільшення впливу на організми довгохвильового (280— 320 нм) ультрафіолетового випромінювання або так званого ближ- нього ультрафіолетового світла, яке випромінюється сонцем, але в нормі затримується озоновим шаром атмосфери. Спостереження показали, що цей озоновий шар може рідшати або зовсім зникати як за деяких техногенних впливів, так і за інших не зовсім ще з'я- сованих причин. Розвиток нових технологій з використанням дже- рел ультрафіолетового випромінювання, ультразвуку, струмів ви- сокої частоти, електромагнітних полів і т. п. вимагає постійного генетичного контролю з метою профілактики і своєчасного вияв- лення генетичних наслідків дії цих факторів. Найважливіша мета моніторингу разом з комплексом наступних досліджень — визначи- ти суть генетичних порушень у популяції і спрогнозувати їх по- дальші наслідки. Такі спостереження постійно проводяться в регіо- нах, що постраждали під час Чорнобильської аварії. Радіоактивні забруднення прилеглих до АЕС територій спричинили значне збіль- шення генетичного тягаря популяцій, негативні наслідки якого для людства ще належить визначити.

Справжнім екологічним лихом можна вважати забруднення се- редовища хімічними речовинами, серед яких немало сполук з мута- генною і канцерогенною дією на живі об'єкти. Хімічному забруд- ненню довкілля сприяють високі темпи хімізації сільського гос- подарства, розвиток хімічної промисловості, великі об'єми сміття та інших відходів повсякденної діяльності людини. Мутагенний ефект може бути наслідком дії на організм самих різноманітних забруднень атмосфери, води і ґрунту, завдяки наявності в них алкі- луючих сполук, нітратів та нітритів, органічних сполук ртуті і т. п. Багато хімічних речовин (промутагенів) перетворюються у мутаге- ни в організмах тварин та рослин. Послідовність цих перетворень, індукція змін на рівні ДНК, виникнення мутацій та можливості їх фенотипового прояву схематично зображено на рис. 11.45.

Слід зазначити, що мутагенна активність може виявлятися та- кож у деяких агентів біологічного походження — продуктів житте- діяльності мікроорганізмів (антибіотиків і токсинів), чужорідної

ДНК, вірусів віспи, корі, грипу, гепатиту та інших, багатьох вакцин тощо.



Рис. 11.45. Послідовні етапи виникнення і можливості прояву мутацій за дії на організм промутагенів

До класу мутагенів відносяться також деякі ендogenous метаболіти, що іноді виникають спонтанно в багатоклітинних організмах. Відомо, що окремі пагони, які виростають із калусних тканин, можуть бути поліплоїдними. Вважають, що метаболіти калусної тканини є чинниками, які викликають геномні мутації. За культивування рослинних клітин *in vitro* часто спостерігаються генні мутації, хромосомні перебудови, анеуплоїдія та ін. Ці генетичні порушення лежать в основі так званої **сомаклональної мінливості**, причини якої ще мало з'ясовані.

Оцінюючи біологічні ефекти мутагенів зовнішнього і внутрішнього середовища, слід вважати, що вони діють не тільки зокрема, але й сумісно, і це значно збільшує їх ефективність.

Взаємодію організмів і популяцій з факторами навколишнього середовища, особливо мутагенними, з'ясовує прикладна наука, що виникла на стику досліджень мутаційних процесів, генетики попу-

ляцій і екології, — так звана **екологічна генетика**. Складовою частиною цієї науки є **генетична токсикологія**, яка вивчає дію хімічних мутагенів антропогенного походження, розробляє методи і способи оцінки генетичної активності численних ксенобіотиків, які постійно створюються людиною в інтересах медицини та народного господарства.

Враховуючи велику кількість ксенобіотиків, треба мати прості, надійні і дешеві методи, з допомогою яких можна швидко визначити, які із досліджуваних сполук є мутагенами. Це попереднє «проекування» хімічних сполук називають **скринінгом**, для якого створені спеціальні **тест-системи**. Кожна із тест-систем являє собою якомога простіший біологічний об'єкт дослідження, що чуйно реагує на дію мутагену зміною тієї чи іншої фенотипової ознаки (появою генних мутацій, хромосомних і хроматидних перебудов, нерозходженням хромосом у мейозі, зміною частоти реверсій, рекомбінацій тощо). Деякі із тест-систем, що сьогодні використовуються, наведені в табл. 11.3.

Таблиця 11.3

Деякі тест-системи для швидкої оцінки генетичної активності хімічних сполук (за С. Г. Инге-Вечтомовим)

Об'єкти	Ефект, що враховується
1. Бактерії <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i>	Реверсії $His^- \rightarrow His^+$ Зміна стійкості $Aza^s \rightarrow Aza^r$ Індукція профага I
2. Гриби <i>Sacch. cerevisiae</i>	Реверсії ауксотрофних мутантів «Незаконні» злучення $a \times a$ Мітохондріальні мутації Мітотична конверсія, мітотичний кросинговер Нерозходження хромосом у мітозі анеуплоїдів (враховується по рецесивних маркерах)
<i>Shiz. pombe</i> <i>Asp. nidulans</i>	Реверсії ауксотрофних мутантів Мутації біосинтезу метіоніну Мітотичний кросинговер
3. Вищі рослини Традесканція, боби	Хромосомні аберації в кінчиках коренів
4. <i>D. melanogaster</i>	Соматичні мутації: мозаїчність очей, крил та ін. Збільшення частоти домінантних алелей
5. Культура клітин ссавців: Гепатоцити щурів Культура клітин <i>Hela</i>	Одноланцюгові розриви ДНК Індукований синтез ДНК Цитогенетичні ефекти: хромосомні аберації, обміни сестринських хроматид
Лімфоцити людини та ін.	Генні мутації стійкості

Скринінг з використанням мікробіологічних тест-систем дуже продуктивний, але виникають деякі утруднення в екстраполяції результатів на вищі організми, включаючи людину. Однак в поєднанні з іншими тест-системами використання мікроорганізмів для скринінгу дуже себе виправдовує. Так, широке застосування знайшла тест-система Б. Еймса, розроблена на основі серії *His*⁻-мутантів *S. typhimurium*, які мають заміни азотистих основ, а також їх вставки і делеції на ділянці гістидинового оперону. Ці ж мутанти мають порушену систему ексцизійної репарації та деякі інші зміни геному, що значно підвищує чутливість об'єкту до мутагенів. Мутагенний ефект фіксується по частоті реверсій *His*⁻ → *His*⁺ після висіву *His*⁻-мутантів на живильне середовище без гістидину, але з добавкою того чи іншого потенційного мутагену.

Для виявлення серед досліджуваних ксенобіотиків промутагенів їх наносять на чашку Петрі, засіяну тест-об'єктом, в суміші з ферментами мікросомної фракції клітин печінки мишей, які необхідні для метаболітної активації промутагену. Використовують не тільки мікросоми печінки, але й кров, сечу тварин і людини, екстракти тканин тощо.

Тест-система Б. Еймса в поєднанні з системою метаболічної активації промутагенів дає можливість швидко і чітко визначитися щодо мутагенної активності досліджуваної сполуки. Завдяки використанню цієї системи вдалося встановити чітку кореляцію між мутагенною і канцерогенною дією хіміопрепаратів.

Незважаючи на зручність мікробіологічних тест-систем, для заключних однозначних висновків необхідно провести скринінг за повною програмою, тобто з проведенням дослідів на більш складних тест-системах — на багатоклітинних тваринах (дрозофіла, миша) і культурах клітин різного походження, включаючи і людину.

Найкраще відповідає всім вимогам тест-система з використанням культури клітин ссавців, яка дає можливість враховувати хромосомні аберації і частоту обмінів між сетринськими хроматидами. Спостерігати ці обміни можна після включення в ДНК 5-бромдезоксидуридину, що є аналогом тимідину. За першого поділу клітини аналог включається лише в один ланцюг обох дочірніх ДНК (рис. 11.46). Якщо другий поділ клітин здійснюватиметься у відсутність 5-бромдезоксидуридину, то в клітинах буде міченою лише одна хроматида із двох сестринських і реципрокні обміни між ними легко виявити. Визначити хроматиди, що містять 5-бромдезоксидуридин, можна з допомогою барвників (акридинового оранжевого, азур-еозину та ін.) з наступним вивченням флуоресценції хроматид. Після забарвлення акридиновим оранжевим хроматиди, що не містять бром, світяться в зеленому спектрі, а ті, що містять бром, —

у червоному. Якщо під дією хіміопрепарату частота обмінів між сестринськими хроматидами зростає, то це свідчить про генетичну активність досліджуваної сполуки. Цей сучасний метод аналізу

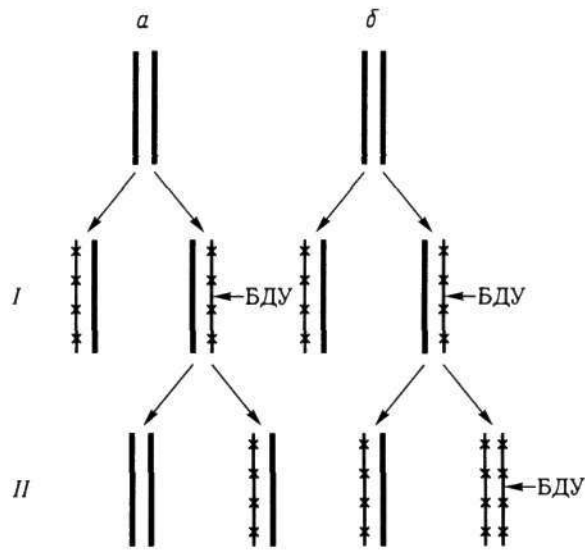


Рис. 11.46. Включення 5-бромдезоксимуридину (БДУ) в ДНК у залежності від наявності БДУ на протязі одного (а) та двох (б) циклів реплікації:

I — перша реплікація; II — друга реплікація

було запропоновано для культури лімфоцитів периферійної крові людини (А. Ф. Захаров, Н. А. Єголіна, 1972), але може бути використаний для дослідження інших клітин.

В зв'язку з тим, що кількість хімічних сполук, які підлягають скринінгу, невпинно зростає, дуже гостро стоїть питання подальшого пошуку нових чутливих тест-систем, і ця робота ведеться широким фронтом.

ГЕНЕТИЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ ЯК МЕХАНІЗМ КОМБІНАЦІЙНОЇ МІНЛИВОСТІ

Вихідний матеріал для природного добору постачає не тільки мутаційна, але й комбінаційна мінливість, яка визначається комбінуванням у генотипах певної сукупності генів. Генетична рекомбінація (розділ 8.8) є одним із основних механізмів «тасування» генів у хромосомах, а відтак — комбінаційної мінливості. Відомо, що рекомбінація властива всім організмам — від ДНК- або РНК-утримуючих вірусів до вищих рослин і тварин.

У процесі загальної рекомбінації обмін між гомологічними хромосомами (точніше — хроматидами) еукаріотів є **реципрокним**. У випадку **нереципрокної рекомбінації** інформація переноситься тільки від донора до реципієнта. Такий обмін інформацією дуже властивий мікроорганізмам. У бактерій він спостерігається за трансформації і трансдукції, а також за рекомбінаційних актів, що можуть супроводжувати транспозиції (переміщення) окремих ділянок хромосом у геномі. **Сайт-специфічна рекомбінація** лежить в основі інтеграції ряду фагових геномів із хромосомами бактерій, класичним прикладом якої є інтеграція фага λ з хромосомою кишкової палички. Одночасно це приклад так званої **консервативної** рекомбінації, яка здійснюється без реплікації ДНК.

До сайт-специфічної рекомбінації можна віднести також переміщення в геномі численних мобільних генетичних елементів. У більшості випадків такої рекомбінації рухомий елемент геному подвоюється і переміщується його копія (**реплікативна** рекомбінація). Якщо в рекомбінацію втягуються молекули ДНК, що не мають ніякої структурної гомології, то говорять про так звану **незаконну** рекомбінацію. Прикладом слугує переміщення в геномі транспозибельних елементів бактерій та мобільних елементів еукаріотів. Ферментативні механізми зазначеної незаконної рекомбінації дуже відрізняються від ферментних систем гомологічної рекомбінації, хоч нерідко вони діють сумісно. З огляду на це, акти неза-

конної рекомбінації, так звані транспозиції, розглядалися окремо (розділ 11.6.3).

12.1. Молекулярні механізми загальної генетичної рекомбінації і конверсії генів

Вивчення явища кросинговеру з допомогою генетичних і цитологічних методів привело до різних уявлень щодо механізмів виникнення рекомбінантних хроматид і хромосом. К. Бріджес та інші дослідники, виходячи із цитологічних даних, запропонували гіпотезу, що відома як гіпотеза «розрив-воз'єднання». З точки зору прихильників цієї теорії обмін блоками генів між двома хромосомами здійснюється шляхом утворення хромосомних фрагментів, а потім їх з'єднання в кросоверному порядку (рис. 12.1, а).

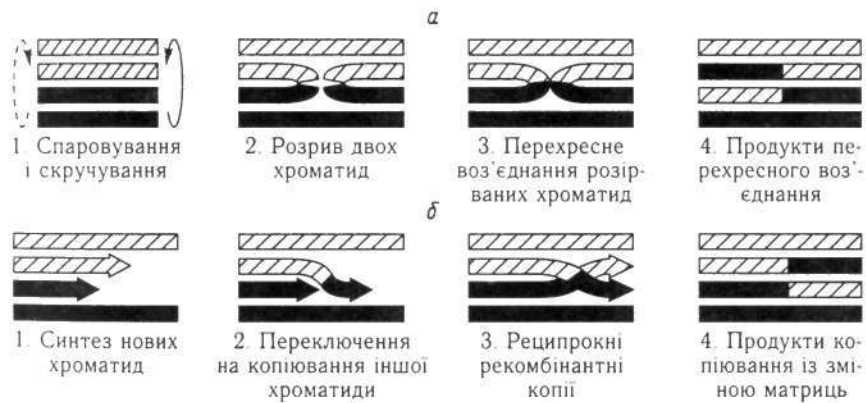


Рис. 12.1. Схематичне зображення двох можливих механізмів кросинговеру:

а — розрив і воз'єднання; б — копіювання із зміною матриць

В 1930 р. Х. Вінклер запропонував ще одну гіпотезу, згідно з якою рекомбінантні класи нащадків дигетерозиготи є наслідком перетворення (**конверсії**) одних алелів генів у інші в процесі мейозу. Можливість конверсії дещо пізніше була підтверджена дослідниками К. К. Ліндегрена, який спостерігав незвичайні розщеплення в тетрадах диплоїдного гібриду *S. cerevisiae*, гетерозиготного щодо алелів одного із генів ферментів синтезу аденіну (*Ade2/ade2*).

Крім звичайного (найбільш частого) розщеплення ($2Ade2 : 2ade2$) деколи зустрічалися тетради типу ($3Ade2 : 1ade2$) або навпаки ($1Ade2 : 3ade2$). Конверсія спостерігається і у інших грибів, наприклад у *Neurospora crassa*. Про це свідчать октади, що містять фенотипово відмінні спори в нерівних співвідношеннях ($6A : 2a$ або $2A : 6a$). Нерідко можна бачити і октади типу $5A : 3a$ або $3A : 5a$, що пояснюється ще додатковим постмейотичним розщепленням — а саме конверсією одного із алейних генів — за мітотичного поділу спор.

Гіпотеза конверсії не могла пояснити всі випадки утворення рекомбінантних гамет, бо, як з'ясувалося, конверсія генів — це хоч і звичайне явище у грибів, але воно трапляється значно рідше, ніж загальна рекомбінація. Так, частота конверсії генів у *Sacch. cerevisiae* складає не більше 1%, в той час як доля рекомбінантних нащадків може бути значно більшою. Пізніше було з'ясовано, що конверсія генів і реципрокна рекомбінація у дріжджів майже в половині випадків відбуваються одночасно, що свідчить про певний взаємозв'язок між цими явищами. Однак суть цього взаємозв'язку стала відома значно пізніше — після з'ясування молекулярних механізмів генетичної рекомбінації і конверсії генів.

12.1.1. Гіпотези «розрив-воз'єднання» та «копі-чойз»

За перших спроб зрозуміти механізм кросинговеру на рівні молекул ДНК розглядалося дві робочих гіпотези — гіпотеза «розрив-воз'єднання» і гіпотеза «копі-чойз». Згідно з останньою утворення кросоверних хроматид здійснюється шляхом синтезу ДНК із зміною матриць (рис. 12.1, б).

Хоч більшість дослідних даних була на користь гіпотези «розрив-воз'єднання», чимало фактів свідчило й про те, що кросинговер супроводжується досить інтенсивним біосинтезом ДНК, який і передбачається гіпотезою «копі-чойз». Для остаточного вибору між зазначеними двома гіпотезами необхідні були спеціальні дослідження.

Одним із переконливих підтверджень справедливості гіпотези «розрив-воз'єднання» стали досліди Д. Тейлора. В цих дослідах клітини корінців бобу *Vicia faba* інкубували з ^3H -тимідином протягом одного клітинного циклу, завдяки чому мічені нуклеотидні попередники включались у новосинтезовані ДНК-репліки. Після цього клітини переносили в середовище без мічених попередників, де вони росли ще протягом одного клітинного покоління. Клітини коренів, виділені в кінці першого поділу (інкубація за наявності радіоактив-

ного тимідину), а також клітини, виділені після другого поділу (тобто вже за відсутності мітки у середовищі), помішали на предметне скло мікроскопа і накривали фотоемульсією. Отримані препарати інкубували з метою отримання радіоавтографа. Аналіз показав, що обидві сестринські хромосоми, зафіксовані в кінці періоду включення мітки, утримують рівномірно радіоактивні молекули ДНК. Такі ж сестринські хромосоми, але зафіксовані після другого поділу клітин, відрізняються тим, що одна з них містить радіоактивну мітку, а інша — ні.

Однак на деяких радіоавтографах, отриманих після двох циклів реплікації (одного за наявності, а іншого — у відсутність мітки), виявляється зовсім інший розподіл радіоактивності. В той час, як кінцевий фрагмент однієї з двох сестринських хроматид містить мітку, гомологічний фрагмент іншої її не має; в іншому ж місці друга сестринська хроматида радіоактивна, а перша — ні (рис. 12.2). Такий обмін фрагментами між сестринськими хроматидами можна пояснити лише з позицій гіпотези «розрив-воз'єднання».

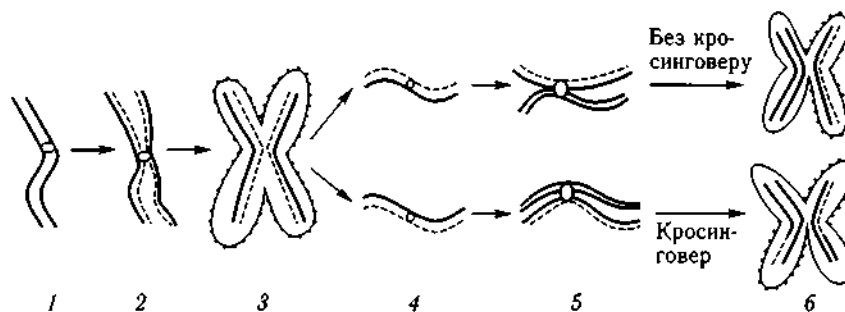


Рис. 12.2. Схема редуплікації хромосом у клітинах корінців *Vicia faba* і вияви кросинговеру в досліджах Дж. Тейлора:

1, 2, 3 — інтерфаза, профаза і метафаза першого поділу клітин; 4, 5, 6 — ті ж самі фази другого поділу; пунктиром позначені мічені нитки ДНК; зубчасті контури — радіоактивні ділянки хроматид

Не менш переконливими є результати досліджень М. Дельбрюка і А. Д. Херші, які незалежно один від одного встановили, що за зараження клітин кишкової палички двома або більшим числом фагів, які відрізняються принаймні двома генетичними маркерами, із клітин можна виділити деяку кількість рекомбінантних фагових часток. Так, наприклад, змішане зараження *E. coli h-* і *r*-мутантами фага T2 призводить до появи серед нащадків як фагових частинок дикого типу (h^+r^+), так і подвійних мутантів (hr).

В досліджах М. Меселсона і Дж. Вейгле клітини *E. coli*, що виростили на звичайному (без важких ізотопів) середовищі, заражали «важким» (міченим по ^{14}C і ^{15}N) фагом λ дикого типу (c^+mi^+) і «легким» (неміченим) подвійним мутантом cmi (c — прозора негативна колонія, mi — малий розмір колонії). Нашадків від такого схрещування фагів (серед них біля 1,5% складала рекомбінантні c^+mi і cmi^+) піддавали рівноважному центрифугуванню в градієнті щільності CsCl і визначали титр різних генотипів фага по всьому градієнту.

З'ясувалося, що розподіл різних генотипів фагових часток у градієнті CsCl повністю відповідає припущенню, що рекомбінація — це результат розриву молекул фагових ДНК і з'єднання фрагментів мічених і немічених молекул. Було встановлено, що рекомбінантні фаги містять не тільки вже прореplikовану (напівоновлену) ДНК, але й таку ДНК, яка складається із кусків ще не реplikованих батьківських молекул.

Цим дослідом було переконливо доказано, що рекомбінанти фагів дійсно містять частини ДНК батьківських геномів і, отже, генетичний обмін здійснюється внаслідок розривів і воз'єднань, а не внаслідок зміни матриць за репликації.

На користь гіпотези «розрив-воз'єднання» свідчать і інші факти, а саме:

1) рекомбінація ДНК здійснюється на фоні блокованого репликативного синтезу (в ролі інгібітора можна використати 5-фтордезоксиридин та інші сполуки);

2) мутагени, що призводять до локальних розривів у ланцюгах ДНК, збільшують частоту рекомбінацій.

Однак, якщо рекомбінація здійснюється за схемою розрив-воз'єднання, то для чого потрібен частковий синтез ДНК, що майже завжди супроводжує кросинговер і генетичну рекомбінацію? Відповідь на це запитання дають сучасні молекулярно-генетичні уявлення про механізми кросинговеру і шляхи обміну блоками генів між хромосомами.

12.1.2. Молекулярні механізми загальної (гомологічної) рекомбінації

Існує декілька гіпотез щодо молекулярних механізмів кросинговеру і генетичної рекомбінації. Найбільш відома експериментально обґрунтована модель, яка запропонована англійським дослідником Р. Холідеєм у 1964 р. для еукаріотних організмів. Вона являє собою молекулярно-біологічну інтерпретацію класичної теорії кросин-

говеру «розрив-воз'єднання» і в загальних рисах справедлива для всіх варіантів гомологічної рекомбінації.

Для здійснення загальної рекомбінації у еукаріотів необхідна **кон'югація гомологічних хромосом** з точним протистоянням відповідних генних локусів. Точність синапсису гомологічних ланцюгів ДНК забезпечується утворенням у зиготені мейозу так званого **синаптонемного комплексу**, який у кожного виду має свої структурні особливості. Цей комплекс остаточно формується на початок пахітени і розпадається невдовзі після неї. Один із варіантів структури синаптонемного комплексу — це два бокових (латеральних) і один не завжди наявний осьовий (центральный) білкових тяжі, які зливаються і розділяють дві гомологічні хромосоми, відстань між якими — до 200 нм. У деяких видів (грибів, комах), крім системи повздовжніх білкових елементів, є ще поперечні білкові тяжі, що фіксують гомологічні хромосоми в певному положенні. В сторони від латеральних елементів синаптонемного комплексу відходить у петлі зібганий хроматин (рис. 12.3).

Важливу роль у рекомбінації грають так звані **рекомбінаційні вузолки** — сферичні, еліпсоїдні або іншої форми білкові утворення, що розташовані вдовж центрального елемента синаптонемного комплексу, тобто між двома гомологічними хромосомами. Вважають, що в цих вузолках містяться мультиферментні апарати рекомбінації, які підтягують одну до одної локальні ділянки материнської і батьківської хроматид через область синаптонемного комплексу. Цікаво, що кількість рекомбінаційних вузолків приблизно співпадає з числом перехрестів (хіазм), які виникають на більш пізніх стадіях профазі мейозу.

Крім білкових тяжів (елементів), фіксацію гомологічних хромосом еукаріотів у певному просторовому протистоянні забезпечує

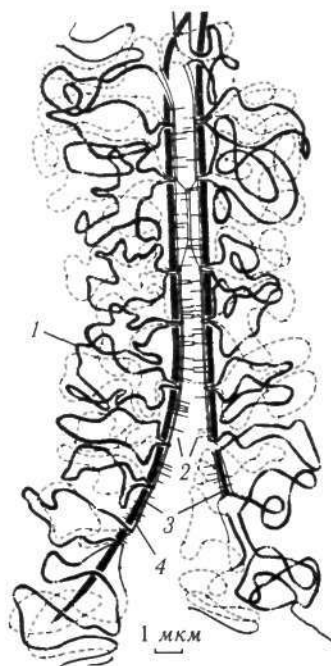


Рис. 12.3. Гіпотетична схема будови синаптонемного комплексу (СК) у лілії:

1 — нитки хроматину; 2 — поперечні білкові волокна в центральному просторі СК; 3 — бокові елементи СК; 4 — зиготенна ДНК

ще так звана **зиготенна ДНК** (зДНК). Вона являє собою множинність розкиданих уздовж молекул ДНК невеликих (100 п. н.) послідовностей, що складають приблизно 0,3% всієї ДНК. Кількість цих ділянок дорівнює кількості генів або міжгенних проміжків. В інтерфазі мейозу зДНК не подвоюється: це здійснюється значно пізніше — під кінець зиготени. В протилежність цьому, за мітозу зДНК подвоюється в інтерфазі разом із загальною ДНК.

Рекомбінація розпочинається з одностороннього розтинів у двох молекулах ДНК, що вступають у рекомбінацію. Відповідний фермент (ендонуклеаза RecBCD) взаємодіє з нитками ДНК однакової полярності (рис. 12.4). Місця розтинів в обох молекулах ДНК лока-

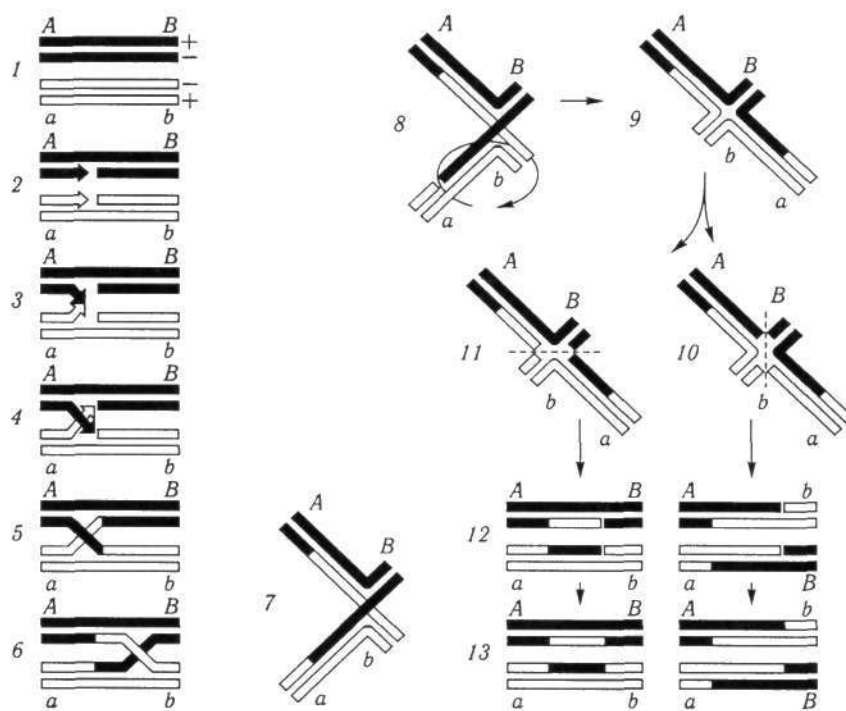


Рис. 12.4. Схема молекулярного механізму загальної рекомбінації за Р. Холідеєм:

1 — батьківські (вихідні) дволанцюгові ДНК гомологічних хромосом; 2—5 — розрив і зв'язання ланцюгів однієї полярності батьківських молекул з утворенням фігури хреста (структура Холідея або зчеплена молекула); 6 — утворення гетеродуплекса після міграції галузки; 7—9 — утворення стереоізомерів структури Холідея шляхом обертання її складових відносно точки перехрестя; 10—11 — розривання структури Холідея у двох можливих напрямках (позначено пунктиром); 12—13 — структура хроматид, що виникають у цих випадках. *A, B, a, b* — генетичні маркери

лізуються у специфічних за будовою *chi*-сайтах. До 3'-кінців у розривах приєднуються білки RecA і SSB, що сприяє зближенню двох сусідніх молекул ДНК і проникненню зазначених 3'-кінців у двоспіральну структуру молекули-партнера. За цих умов власна двоспіральна структура взаємодіючих молекул розплітається, а за рахунок парування ниток із різних молекул можливе утворення **гетеродуплексів**. Фрагменти розірваних ланцюгів із обох молекул ДНК з'єднуються хрест-навхрест, внаслідок чого два із чотирьох ланцюгів ДНК (а саме перехрещені) перетворюються в рекомбінантні — вони обмінюються термінальними фрагментами.

Внаслідок зазначеного перехрестя гомологічних ланцюгів неестринських хроматид виникає пара з'єднаних дволанцюгових молекул — структура, що отримала назву **зчепленої молекули, H-структури або структури Холідея**. При цьому нерідко вилучається деяка кількість нуклеотидів і здійснюється локальний ресинтез ДНК, подібний до того, що відбувається за репарації ДНК. Зчеплену молекулу називають ще **напівхіазмою**, тому що вона має два перехрещених ланцюги, а не всі чотири. Ці два ланцюги на всьому протязі комплементарно спаровані з інтактними ланцюгами зчепленої молекули — спершу з неперехрещеним ланцюгом однієї вихідної молекули ДНК, а потім — іншої.

Напівхіазмі властива здатність до **міграції перехрестя** рекомбінантних ланцюгів уздовж зчепленої молекули в обох можливих напрямках, подібно застібці змійки. Цей процес (**міграція галузок**) збільшує протяжність спарованості ланцюгів ДНК, що належать різним молекулам, і значно розширює **область гетеродуплекса**. Міграція галузки забезпечується функцією двох білків — RuvA і RuvB, кожен з яких є хеліказою, а RuvB, крім того, виявляє ще АТР-азну активність.

Утворена гетеродуплексна структура може існувати в різних формах, що виникають внаслідок взаємного обертання її складових частин (рис. 12.4). За такої ізомеризації може утворитися лінійна пласка молекула (без перехрестя ланцюгів); інтактні, раніше не схрещені ланцюги можуть утворити перехрестя, а рекомбінантні нитки ДНК, що перехрестилися ще на першому етапі рекомбінації, в цьому випадку вивільняються і стають неперехрещеними. Все визначається кутом взаємного обертання складових зчепленої молекули у просторі.

Заключний етап кросинговеру полягає в тому, що структура Холідея розділяється на дві окремі дволанцюгові молекули ДНК. Для цього потрібні розтини в місці сполучення цих молекул. Розтини здійснюються специфічною ендонуклеазою RuvC в одній із двох альтернативних пар ланцюгів ДНК (рис. 12.4). В тому випад-

ку, коли розриваються, а потім хрест-навхрест з'єднуються ланцюги ДНК, які вже розрізалися раніше і вступали в рекомбінацію, два інших ланцюги залишаються інтактними. Внаслідок всіх перетворень вивільняються дві вихідні (нерекомбінантні) батьківські молекули, кожна із яких містить гетеродуплекс (рис. 12.4, 11—13).

В іншому випадку, коли розрізається, а потім воз'єднується інша пара ланцюгів, яка раніше не приймала участі в рекомбінації, кожна із чотирьох вихідних ниток ДНК виявиться розрізаною. В кінцевому результаті утвориться дві рекомбінантні молекули ДНК, що також містять області гетеродуплексів (рис. 12.4, 10—13).

Модель Холідея передбачає утворення рекомбінантних молекул ДНК за рахунок розриву і воз'єднання ланцюгів батьківських молекул. При цьому не виключається локальний репаративний синтез ДНК в місцях розривів і гетеродуплексів.

Рекомбінація є високоспецифічним генетично детермінованим процесом, що здійснюється за участю білків. У *E. coli*, яка володіє двома повноцінними системами загальної рекомбінації, за цей процес відповідають гени *recA*, *recB*, *recC*, *recD*, *recF* та ін. Вже зазначалося, що продукт гена *recA* являє собою поліфункціональний фермент, необхідний як для загальної рекомбінації, так і для після-реплікативної репарації. В тому й іншому випадку дуже важливе значення має ДНК-залежна АТР-азна активність цього білка. Вважають, що енергія гідролізу АТР використовується білком *RecA* для розплітання подвійної спіралі ДНК і взаємодії комплементарних ланцюгів різних молекул ДНК. При цьому білок *RecA* і молекули білка *SSB* діють кооперативно. Білок *RecA* каталізує також наступну переорієнтацію ланцюгів з утворенням хрестовидної структури Холідея, здатної до переміщення точки перехрестя. Слід підкреслити, що рекомбінаційна функція білка *RecA* може здійснюватися за умов тих невисоких його концентрацій, які підтримуються в клітині за наявності репресора *LexA*. Отже, загальна рекомбінація здійснюється під контролем експресії гена *recA* з боку *LexA*. Згадаймо, що для SOS-репарації вкрай необхідне розщеплення репресора *LexA* і підвищення концентрації білка *RecA* в клітині.

Якщо в процес рекомбінації вступають кільцеві молекули ДНК (геноми бактерій, вірусів або плазмід), то завдяки білку *RecA* утворюються структури, що своєю формою нагадують цифру «8» (рис. 12.5). По суті — це ті ж структури Холідея, але утворені кільцевими молекулами. В мутантних клітинах *E. coli recA⁻* структури типу вісімок не утворюються, що вказує на важливу роль *RecA*-білка в цьому процесі. Білкові продукти генів *recB*, *recC* і *recD* приймають участь в акті рекомбінації раніше білка *RecA*. Вони являють собою субодиниці АТР-залежної ендонуклеази V,

яка специфічно розрізає молекули ДНК, що вступають у рекомбінацію.

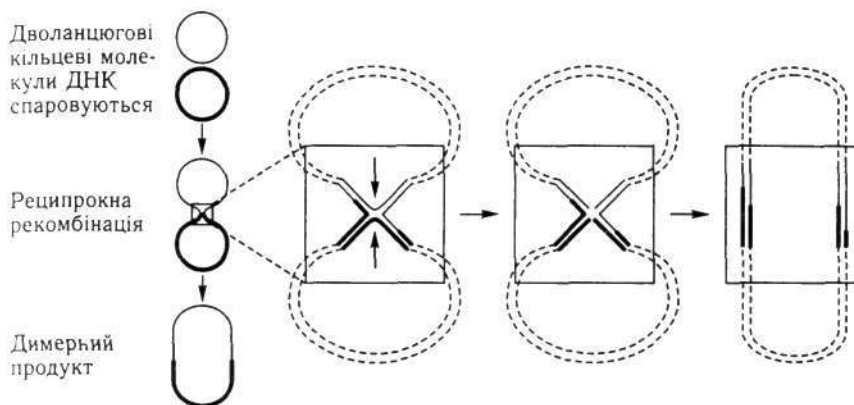


Рис. 12.5. Реципронна рекомбінація між гомологічними дволанцюговими кільцевими молекулами ДНК

Таким чином, для здійснення кросинговеру у *E. coli*, крім білка RecA, необхідна також наявність ендонуклеази, яка спричиняє одноланцюгові розтини в молекулах ДНК; екзонуклеази, яка розширює виломів в місцях таких розтинів; ДНК-полімерази I, що здійснює репаративний синтез ДНК в місцях одноланцюгових виломів; лігази, яка з'єднує розірвані кінці ДНК. Варто зауважити, що ферменти, відповідальні за кросинговер, дуже близькі за властивостями до ферментів репарації. Часто це ті ж самі ферменти. Однак є і специфічні для рекомбінації білки. Серед них — ендонуклеаза V (ніказа), що каталізує утворення одноланцюгових розтинів у ДНК на ранніх етапах рекомбінації. Цей фермент за своїми фізико-хімічними властивостями відрізняється від ендонуклеаз соматичних клітин, появляється в мейотичних клітинах лише на стадії пахітени і зникає після її закінчення. Він розпізнає симетричні структури в молекулі ДНК (паліндроми), що розкидані вздовж цієї молекули. Саме тому рекомбінація не може розпочатись у молекулі ДНК де завгодно, — вона здійснюється в певних, так званих «гарячих» точках. Ці особливі, розсіяні вздовж хромосоми гомологічні послідовності — 5'-GCTGGTGG-3', з яких починається кросинговер, називаються **рекомбінаторами**.

Описана модель Холідея була запропонована для пояснення молекулярних механізмів мейотичної рекомбінації. Зараз є докази того, що механізми загальної рекомбінації у еукаріотів і прокаріотів мають багато спільного.

12.1.3. Молекулярні механізми конверсії генів

Вже зазначалося, що спроба пояснити появу рекомбінантних гамет лише на основі конверсії генів виявилася невдалою. Зате модель Холідея, що з'ясовує механізми загальної рекомбінації, чітко вказує і на можливі шляхи конверсії.

Ще в 1955 р. М. Мітчел вказала на те, що механізм конверсії має істотні відмінності від механізму класичного кросингверу. Суть цих відмінностей полягає в тому, що перетворення одного алельного гена в інший під час мейозу в більшості випадків не є результатом міжallelної рекомбінації за вже відомою нам схемою, а є наслідком репаративних процесів в області гетеродуплекса. Згідно з моделлю Холідея, такі гетеродуплекси обов'язково утворюються за загальної рекомбінації, незалежно від того, які ланцюги ДНК розтинаються на заключній стадії цього процесу. Якщо в ланцюгах, що утворюють гетеродуплекс, які-небудь гени представлені різними алелями, то появляються некомплементарні пари нуклеотидів, що в більшості випадків призводить до репарації. Остання може здійснюватися за схемою ексцизійної репарації («вирізей і латай») або іншого механізму корекції. Матрицею для такої корекції рівноправно може слугувати як той, так і інший ланцюг гетеродуплекса (рис. 12.6).

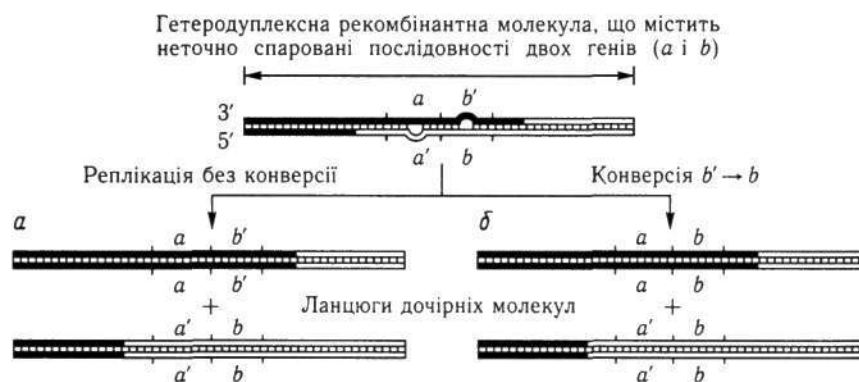


Рис. 12.6. Розщеплення гетеродуплекса:

a — за реплікації без виправлення дефектів; b — після реплікації і конверсії $b' \rightarrow b$. Аналогічно може здійснюватись репарація в напрямку $b \rightarrow b'$, $a \rightarrow a'$, $a' \rightarrow a$ або одночасно по двох генах (коконверсія)

Саме це і призводить до взаємоперетворення (конверсії) алелів у гетерозиготи і до аномального розщеплення в тетрадах і октадах, що спостерігали К. Ліндегрен та інші автори.

Якщо в область гетеродуплекса попадає не один ген, а два або більше маркерів, то можлива їх сумісна конверсія або **коконверсія**. Зрозуміло, що чим менша відстань між двома генами, тим більш імовірна коконверсія таких генів. Отже, за частотою коконверсії можна будувати генетичні карти.

Слід зазначити, що чим ближче розташовані гени і чим частіше спостерігається їх коконверсія, тим менш можлива між ними реципрокна рекомбінація. Тому так звана висока негативна інтерференція (розділ 8.5), яку трактували як стимулювання одного реципрокного обміну іншим, фактично є проявом конверсії.

12.1.4. Особливості загальної рекомбінації у вірусів

За змішаного зараження бактеріальної клітини фагами з різними мутантними генотипами молекули ДНК фагів, які розмножилися, можуть вступати у генетичну рекомбінацію. Щоб прослідкувати за явищем загальної рекомбінації при схрещуванні вірусних часток, їх необхідно позначити різними мутаціями, розташованими у віддалених одна від одної ділянках ДНК. Як позначку (мітку) використовують також стабільні та радіоактивні ізотопи елементів, що входять до складу ДНК. Саме на цьому принципі були основані дещо раніше описані дослідження М. Дельбрюка і А. Д. Херші, а також М. Меселсона і Дж. Вейгле по вивченню механізмів рекомбінації у фагів Т2 і λ . Дещо несподіваним виявився факт, що загальна рекомбінація у фагових часток нерципрокна. Дійсно, із двох дволанцюгових фагових ДНК, які вступають у рекомбінацію, утворюється лише одна рекомбінантна молекула (рис. 12.7).

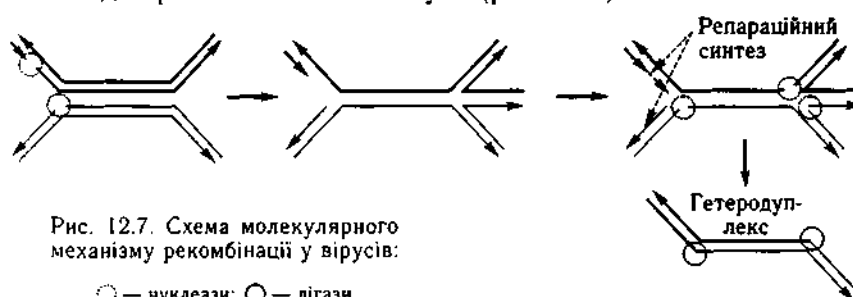


Рис. 12.7. Схема молекулярного механізму рекомбінації у вірусів:

○ — нуклеази; ○ — лігази

Для пояснення цього факту запропонована модель рекомбінації, згідно з якою процес розпочинається з одноланцюгових розтинів в довільних місцях дволанцюгових молекул ДНК. Спеціальна екзонуклеаза (фаговий ген *exo*) розширює зони розтинів, перетворюючи

їх у протяжні прогалини. Виникають одноланцюгові ділянки в обох молекулах ДНК, які в зв'язку з їх повною або частковою комплементарністю спаровуються, утворюючи H-подібні структури Холідея. Якщо гомологія одноланцюгових ділянок неповна, то утворюється гетеродуплекс, який в подальшому розширюється шляхом переміщення точки розгалуження (міграція галузки). В процесі цього переміщення незалучені до утворення гетеродуплекса комплементарні ланцюги обох молекул ДНК розшаровуються і, паруючись один з одним, утворюють коротку бокову гілку. Будь-які одноланцюгові проміжки заповнюються ДНК-полімеразами, а розриви зшиваються лігазами. В результаті утворюються розгалужені молекули ДНК, які добре розрізняються на електронних мікрофотографіях. На заключному етапі ендонуклеази відсікають зайві бокові галузки, точкові розриви ДНК репаруються і утворюється рекомбінантна молекула фагової ДНК, яка містить область гетеродуплекса.

Загальна рекомбінація вірусних ДНК детермінується генами як вірусного, так і бактеріального геному. Відомо, що у фага λ є своя власна Red-система рекомбінації, яка використовує RecF- і RecE-шляхи рекомбінаційних подій кишкової палички.

12.1.5. Спеціалізовані системи гомологічної рекомбінації

Мейотична і мітотична рекомбінація у еукаріотів, а також рекомбінаційна репарація у всіх без винятку організмів виконують загальні функції, необхідні для життєдіяльності і відтворення. Крім цих загальних, існує чимало спеціалізованих систем рекомбінації, які вирішують окремі задачі.

Так, наприклад, у гонококів і інших збудників інфекційних хвороб існують спеціалізовані системи гомологічної рекомбінації, з допомогою яких інфекційні агенти уникають знешкоджуючої дії імунної системи організмів-хазяїв. В основі захисної реакції мікроорганізму лежить простий принцип: у збудника є декілька (або багато) алелів певного гена, що кодує поверхневий білок (антиген), здатний розпізнаватись імунною системою хазяїна. Експлуатується з усіх цих копій лише одна, що знаходиться у певному локусі. Інші алелі займають так звані «мовчазні» локуси (**касети**) і не експресуються. Заміна функціонуючого алеля на запасний здійснюється шляхом гомологічної рекомбінації, що призводить до заміни поверхневого антигену на інший і до втрати мікроорганізмом імунної чутливості. Слід зазначити, що рекомбінація між окремими сайтами

двох окремих генів здійснюється шляхом утворення гетеродуплекса і наступної корекції одного із сайтів за програмою другого. Таким чином, міжallelна рекомбінація виявляє ті ж властивості, що і конверсія гена: вона не обов'язково пов'язана з реципрочною рекомбінацією між фланкуючими маркерами. Дійсно, в більшості зазначених випадків заміна функціонуючого гена на запасний (касетний) варіант досягається з допомогою генної конверсії.

У гонококів — збудників гонореї — є багато копій генів, що кодують імунологічно різні варіанти білка піліну. Останній утворює ворсинки (пілі) на поверхні цих бактерій і є одним із основних факторів вірулентності — забезпечує прикріплення гонококів до епітелію сечостатевої системи. Експресуються лише ті алелі, що знаходяться в локусах *pilE*, вони і визначають структуру піліну на поверхні клітин. Досить часто ген у локусі *pilE* ушкоджується або втрачається, але шляхом рекомбінаційної взаємодії «залишків» гена *pilE* з копіями «мовчазних» локусів (*pilS*) відновлюється новий ген *pilE* з інформацією, передбаченою відповідним геном *pilS* — донором інформації за рекомбінаційного процесу (рис. 12.8). Аналогічну стратегію використовує збудник поворотного тифу *Borellia*, який теж час від часу змінює структуру поверхневого білка — антигену, який розпізнається імунною системою людини.



Рис. 12.8. Генетичний механізм оновлення поверхневих антигенів у гонококів

У збудника сонної хвороби *Trypanosoma brucei* заміна функціонуючої копії гена на іншу є результатом гомологічної рекомбінації, яка супроводжується обміном між теломерними областями хромосом або конверсією з участю працюючої і мовчазної копії. На цій моделі показано, що кросинговер або конверсія можуть не тільки замінити один ген на інший у певній ділянці геному, але й здатні

привести до утворення нових алельних генів завдяки тому, що за рекомбінації можливий перенос не цілого гена, а його частини, і утворення гібридного, тобто нового варіанту гена.

В усіх зазначених випадках використовується звичайний *Rec*-залежний механізм рекомбінацій. Однак існують системи спеціалізованої гомологічної рекомбінації, які діють за участю додаткових білків. Прикладом може бути механізм визначення клітинного типу спаровування у дріжджів *S. cerevisiae*. Залежно від конкретної інформації в локусі *MAT* гаплоїдні дріжджі бувають двох типів спаровування: a і α . Ці гаплоїдні аскоспори — продукти мейозу, зливаючись одна з одною, започатковують диплоїдні культури a/α , здатні до мейозу з утворенням чотирьох гаплоїдних спор. У деяких (гомоталічних) дріжджів спостерігається ефективно переключення типів спаровування: клітини α -типу здатні перетворюватись на клітини a -типу і навпаки. Це переключення здійснюється згідно з так званим касетним механізмом за перших поділів проростаючої аскоспори. У цих дріжджів, крім діючого гена, розташованого в локусі *MAT*, зліва і справа від нього на певній відстані в хромосомі 3 є дві мовчазні «касети» (рис. 12.9). Зліва це HML_{α} , яка несе

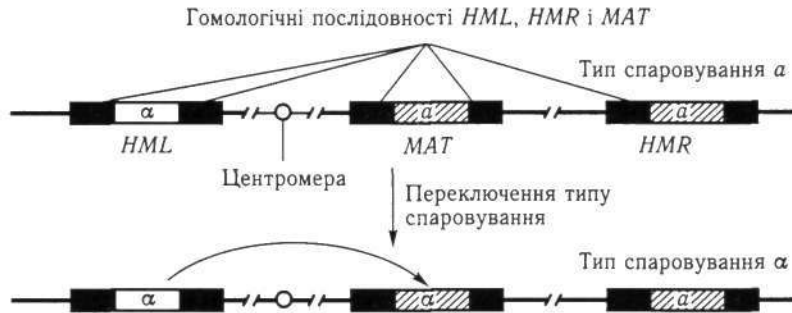


Рис. 12.9. Розташування локусів HML_{α} , MAT і HMR_{α} в третій хромосомі дріжджів *Sacch. cerevisiae* та механізми переключення типів спаровування

інформацію про α -тип спаровування, а справа — HMR_{α} з інформацією, яка визначає a -тип спаровування. Послідовність ДНК в локусі *MAT* ідентична або лівій (MAT_{α} -дріжджі) або правій (MAT_a -дріжджі) мовчазній копії. Інформація, що міститься в касетах, не експресується, бо кожна з них фланкована певними послідовностями — «глушниками», які впливають на компактизацію хроматину в касетах. Глушники контролюються декількома генами *SIR* (*silent information regulators* — регуляторами мовчазної інформації), локалізованими в інших хромосомах. Біля локуса *MAT* глушників немає.

Заміна інформації діючого *MAT*-локуса на протилежну інформацію однієї з мовчазних касет призводить до переключення типів спарування $a \rightleftharpoons \alpha$ в двох із чотирьох клітин, що виникають за поділу диплоїдної зиготи. Процес ініціюється спеціальною сайт-специфічною ендонуклеазою — продуктом гена *HO*. Цей фермент здійснює дволанцюговий розтин певної послідовності ДНК *MAT*-локуса, чим ініціює спрямовану конверсію генетичного матеріалу локуса *MAT* за програмою одного з «мовчазних» локусів. В одному із можливих варіантів рекомбінації ніякої репарації в локусі *MAT* бути не може, бо послідовності ДНК в цьому локусі і в одній із мовчазних касет ідентичні. В другому випадку, коли ці послідовності неоднакові, утворений ендонуклеазою розрив розширюється екзонуклеазою до тих пір, поки кінці вилому не виявляться гомологічними відповідним ділянкам мовчазної копії, яка визначає протилежний тип спарування. Потім ДНК касетного локуса використовується як матриця для забудови вилому, внаслідок чого в локусі *MAT* замість власної інформації виявляється інформація запасної касети (рис. 12.9). В диплоїдних (a/α) дріжджах експресуються два *MAT*-локуси: a і α . Ген *HO* не працює, і ніяких переключень не відбувається.

Автори касетної моделі вважають, що подібні багатоступеневі взаємодії регуляторних і структурних генів можуть грати значну роль у регуляції онтогенетичного розвитку не тільки бактерій і грибів, але й складних багатоклітинних організмів.

12.1.6. Спеціалізована соматична рекомбінація і гени імуноглобулінів у ссавців

В процесі імунної відповіді В-лімфоцити продукують імуноглобуліни декількох різних класів з однаковою специфічністю до антигену (табл. 12.1).

Таблиця 12.1

Класи імуноглобулінів людини, що виникають за імунної відповіді на антиген

Клас імуноглобуліну	Важкий ланцюг	Рівновідності важких ланцюгів	Легкий ланцюг	Субоднинний склад молекул
IgM	μ	—	χ або λ	$(\mu_2\chi_2)_5$, $(\mu_2\lambda_2)_5$
IgG	γ	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	χ або λ	$\gamma_2\chi_2, \gamma_2\lambda_2$
IgA	α	α_1, α_2	χ або λ	$(\alpha_2\chi_2)_{1,2,3}$, $(\alpha_2\lambda_2)_{1,2,3}$
IgD	δ	—	χ або λ	$\delta_2\lambda_2, \delta_2\chi_2$
IgE	ϵ	—	χ або λ	$\epsilon_2\lambda_2, \epsilon_2\chi_2$

Основний клас антитіл, що вивільняється у кровотік, — це IgG. Найважливішим чинником, що визначає різноманітність антитіл, є здатність ДНК лімфоцитів до гомологічної рекомбінації певних сегментів молекули з утворенням тисяч різних варіантів структури відповідних генів. З'ясування генетичного контролю імунної відповіді відноситься до галузі науки, яка отримала назву **імуногенетики**.

Будова і кількість окремих сегментів ДНК, з яких у процесі дозрівання лімфоцитів збирається ген того чи іншого імуноглобуліну, порядок з'єднання їх у структурі одного гена мають ряд особливостей залежно від класу імуноглобуліну, проте процес перебудови відповідної молекули ДНК в усіх випадках має багато спільного.

Структура тетрамерного білка імуноглобуліну G показана на рис. 12.10. Білок складається з двох ідентичних легких (L) і двох ідентичних важких (H) поліпептидних ланцюгів. Згідно з комбі-

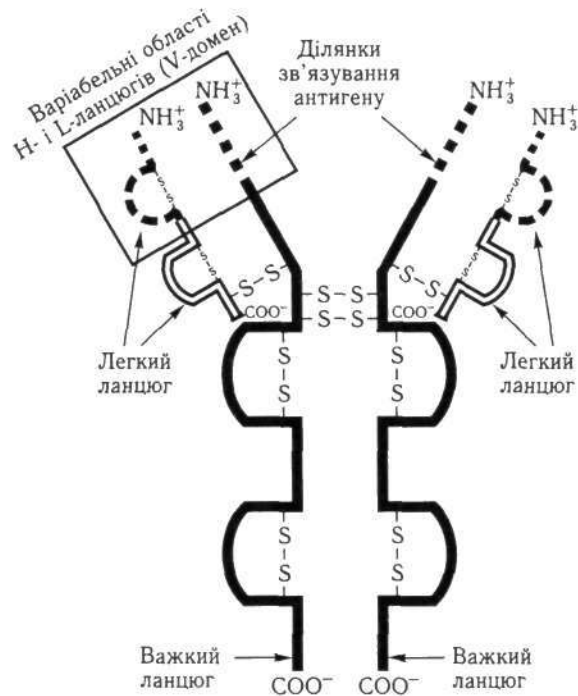


Рис. 12.10. Схема будови молекули імуноглобуліну

наційною теорією будь-який тип легкого ланцюга може з'єднатися з будь-яким ланцюгом H. Кожний поліпептидний ланцюг має дві

принципово відмінні області: N-кінцеву — варіабельну (V) і C-кінцеву — константну (C). Варіабельні області у різних білків значно відрізняються послідовністю амінокислот, в той час як константні виявляють істотну гомологію. Асоціація варіабельних областей L- і H-ланцюгів формує **варіабельний домен**, який визначає специфічність даної молекули імуноглобуліну і його здатність взаємодіяти з антигеном. В межах варіабельної області є ділянки більш варіабельні, ніж інші. Їх називають **гіперваріабельними**. Загальна кількість варіабельних областей нараховує декілька сотень як для легких, так і для важких ланцюгів білка. Кількість різних константних областей невелика.

L-ланцюги кодуються двома основними групами генів — λ і χ , розташованих у різних хромосомах (рис. 12.11). До складу кожної групи відносяться три різних послідовності ДНК: послідовності V_L ,

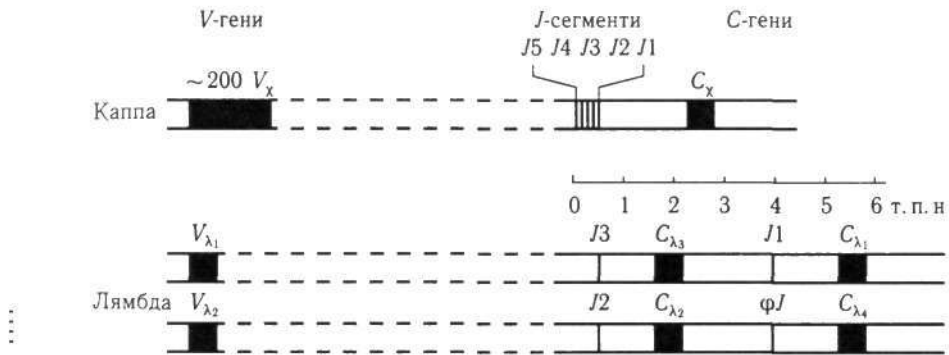


Рис. 12.11. Послідовності ДНК, що кодують легкі ланцюги капа- і лямбда-типів у миші

які кодують перші 97 амінокислотних залишків з N-кінця ланцюга; незначне за кількістю сімейство послідовностей J_L (від англ. *joining* — з'єднуючі), які кодують наступні 10—12 залишків, і один або декілька генів C_L , кодуючих C-кінцеву половину L-ланцюга. У людини в кожному із сімейств V_λ і V_χ нараховується, за різними даними, 90—300 генів, а сімейства сегментів J_λ і J_χ складаються із п'яти різних послідовностей кожне. Таким чином, комбінування цих послідовностей ДНК у кожному випадку може призводити до кодування приблизно тисячі ($5 \cdot 200$) різних V_L областей легкого імуноглобуліну.

Фрагменти H-ланцюга кодуються групою послідовностей, локалізованих у хромосомі, відмінній від обох хромосом, що містять гени L-ланцюгів. Як показано на рис. 12.12, варіабельна ділянка H-ланцюга кодується трьома різними сімействами послідовностей

ДНК: V_H (біля 300 варіантів); D (не менше 10 варіантів) і J_H (4 різних послідовності). З них може бути утворено біля 12 000 комбінованих генів важких поліпептидних ланцюгів.

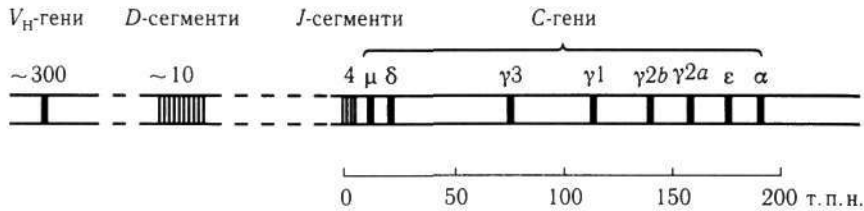


Рис. 12.12. Послідовності ДНК, що кодують важкий ланцюг імуноглобуліну миші

Отже, випадковим попарним сполученням різних варіантів легких і важких ланцюгів можна отримати $24 \cdot 10^6$ ($12\,000 \cdot 2000$) різних видів антитіл. Крім того, C -кінцева область H -ланцюгів кодується різними генами C_H , які відповідають класам імуноглобулінів, наведеним у табл. 12.1.

У 1976 р. С. Тонегава і співавтори показали, що послідовності V_λ і C_λ , а також V_χ і C_χ , які кодують різні області легких ланцюгів імуноглобулінів, в клітинах мишиної мієломи прилягають одна до одної. Клітини мієломи здатні синтезувати антитіла лише одного типу. В ДНК ембріональних клітин і в клітинах сперми ці послідовності у складі молекули ДНК просторово розділені. Автори припустили, що фрагменти ДНК, які кодують V - і C -послідовності легких і важких ланцюгів імуноглобулінів, у процесі диференціювання лімфоцитів зближаються, утворюючи один ген, який транскрибується в одну спільну іРНК.

Виникнення імуноглобулінового гена в клітині шляхом зближення послідовностей V_λ і C_λ виключає продуктивне використання комбінацій послідовностей V_χ і C_χ і навпаки. Більш того, в кожному випадку комбінуються ті послідовності сімейств λ або χ , які знаходяться лише в одній молекулі ДНК (в одній гомологічній хромосомі). Аallelні гени іншої гомологічної хромосоми не експресуються. Це явище отримало назву **алельного виключення**.

Експериментальні дані про процеси перегрупування послідовностей, кодуючих константні і варіабельні ділянки імуноглобулінових ланцюгів, були отримані з допомогою методів, основаних на застосуванні рекомбінантних ДНК. Для цього виділяли іРНК, яка кодує L -ланцюг імуноглобуліну мієломи, і на її основі з допомогою зворотної транскриптази отримували кДНК, яку клонували в плазмідному векторі. Накопичену в достатній кількості кДНК розрізали

відповідною рестриктазою таким чином, щоб отримати фрагменти, кодуєчі V- і С-ділянки L-ланцюга. Ці фрагменти ДНК розділяли електрофоретично, і вводили в них радіоактивну мітку. Після цього їх піддавали денатурації і використовували як зонди для ідентифікації тих фрагментів рестрикції ДНК із мієломних і ембріональних клітин, які мали послідовності, комплементарні зондам. З'ясувалося, що в ДНК клітин мієломи V- і С-кодуєчі ділянки локалізуються в одному EcoRI-фрагменті, в той час як в ембріональних клітинах вони знаходяться в різних EcoRI-фрагментах. Це означає, що на якомусь етапі розвитку ембріональної клітини відбувається специфічна перебудова ДНК, внаслідок якої усувається принаймні один сайт рестрикції між V- і С-кодуєчими ділянками ембріональної ДНК.

Загальна організація послідовностей, що кодуєчі структуру L-ланцюга, в ембріональних клітинах і зрілих лімфоцитах показана на рис. 12.13.

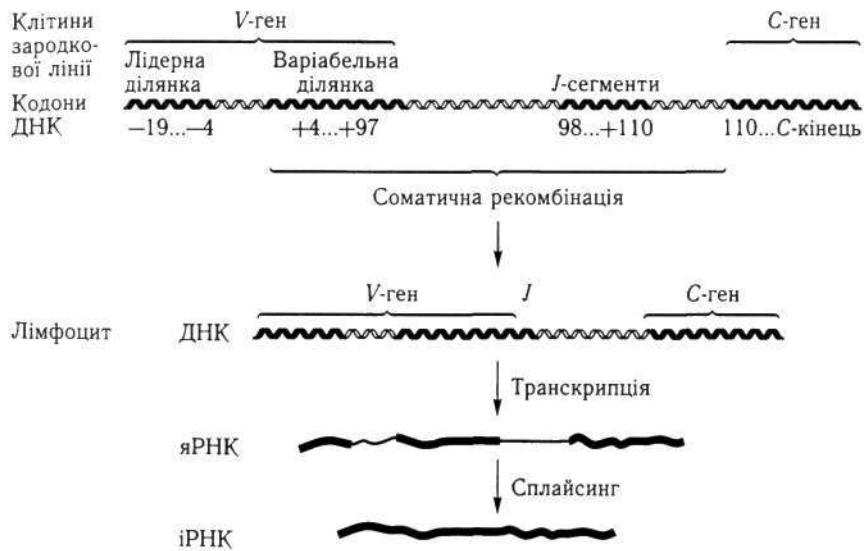


Рис. 12.13. Утворення функціонального гена легкого ланцюга лямбда-типу шляхом соматичної рекомбінації; структура проРНК та зрілої іРНК

Кількість послідовностей V для людини точно не встановлена і знаходиться в межах 90—300. Кожна така послідовність містить промотор, який може функціонувати лише після з'єднання даної конкретної послідовності V з одним із п'яти сегментів J. Фрагмент

ембріональної ДНК, що розділяв до цього V - і J -послідовності, вилучається (делетується). У сформованій ДНК диференційованого лімфоцита транскрипція ініціюється на промоторі послідовності V і продовжується, включаючи останню за чергою послідовність C . В процесі сплайсингу РНК-транскрипту в ньому вилучаються всі J -сегменти, за винятком того, який безпосередньо примикає до послідовності V . Таким чином, формується зріла іРНК, в якій послідовно з'єднані по одній копії послідовностей V , J і C . Отже, кожен легкий ланцюг імуноглобуліну кодується двома різними послідовностями V і C , а також одним із невеликих сегментів J .

На рис. 12.14 показана організація групи генів H -ланцюга. В зародкових клітинах сімейства послідовностей V_H , D і J_H розташовані перед сімейством C_H . Кожен із генів V_H містить власну промоторну

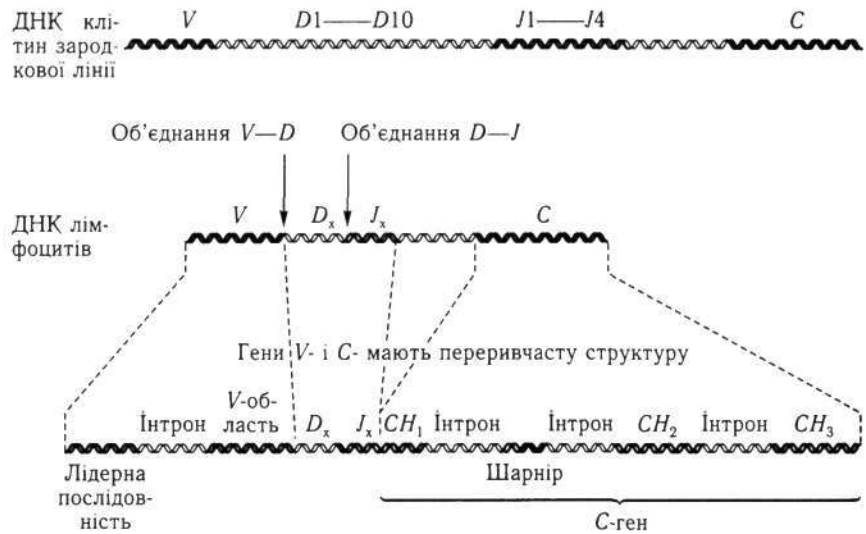


Рис. 12.14. Утворення гена важкого ланцюга за дозрівання лімфоцитів (здійснюється шляхом з'єднання V -гена з D -сегментом і приєднання D -сегмента до одного із сегментів J , розташованих перед C -геном)

послідовність, яка стає функціонально активною після об'єднання конкретного гена V_H з одним із сегментів D і одним із сегментів J_H . Отже, вибір того чи іншого гена V_H супроводжується двома перебудовами в хромосомі: об'єднанням послідовностей V_H і D з вилученням проміжної області ДНК і об'єднанням $V_H D$ з одним із сегментів J_H , що також пов'язано з делецією проміжної ділянки ДНК. Таким чином виникає транскрипційна одиниця, з якої за рахунок

альтернативного сплайсингу можуть зчитуватися μ - і δ -варіанти важкого ланцюга. В поєднанні з ланцюгами L_λ або L_χ вони забезпечують продукцію JgM або JgD. Значно пізніше (на стадії термінального диференціювання В-лімфоцитів) здійснюється так зване переключення класів імуноглобулінів, після чого клітина продукує лише одне із антитіл, наведених у табл. 12.1. Це переключення пов'язане з третьою перебудовою ДНК, в процесі якої область V_HDJ_H об'єднується з певним C_H -геном завдяки вилученню проміжної області ДНК.

Механізм зазначених перебудов ДНК і їх регуляція в лімфоцитах поки що не з'ясовані. Вважають, що збірка частин імуноглобулінових генів як легких, так і важких ланцюгів здійснюється за допомогою одного і того ж механізму, хоч кількість фрагментів різна в кожному випадку. На користь сказаного свідчить наявність однакових канонічних послідовностей, що знаходяться на межах усіх імуноглобулінових сегментів зародкової лінії.

Особливості орієнтування певних канонічних послідовностей і наявність спейсерів між V - і J -сегментами запобігають рекомбінації як між окремими V -генами, так і між J -сегментами. Таким чином, V_H -ген може бути з'єднаним тільки з D -сегментом, а D в свою чергу тільки з J_H . Відстань між двома канонічними послідовностями майже точно співпадає з одним або двома завитками подвійної спіралі ДНК. Це вказує на те, що в рекомбінаційних реакціях використовуються деякі геометричні співвідношення. Факт утворення $V—J$ - (або $V—D—J$ -) комбінацій пояснюють з позицій трьох можливих моделей:

1) делеційна модель, яка передбачає вилучення (делеції) проміжних послідовностей ДНК;

2) інверсійна модель, згідно з якою проміжний матеріал повертається на 180° , що призводить до зближення і з'єднання V і J або V і D послідовностей;

3) модель нерівного кросинговеру між сестринськими хроматидами (реплікованими копіями гена). В одній із хроматид утворюється функціонуючий ген і виникає делеція між V і J , в іншій хроматиді область між V і J дуплікована (подвоєна).

Жодна з моделей сьогодні не доказана остаточно.

Слід зазначити, що, крім розмаїття комбінацій окремих частин імуноглобулінових генів, значний вклад у різноманітність останніх вносять соматичні мутації, тобто структурні зміни в цих складових частинах гена. Відомо, що збірка $V—J$ -послідовностей легких ланцюгів і $V—D—J$ -послідовностей важких ланцюгів супроводжується зсувом сайту рекомбінації, бо точка стику сегментів не фіксована і може варіювати в межах декількох пар нуклеотидів. В імуногло-

булінових ланцюгах у районі кожної потенціальної V — J -рекомбінації можуть міститися різні амінокислоти. Тому у випадку легких ланцюгів район між V - і J -сегментами відносять до гіперваріабельної області. Подібні і ще більш часті зміни структури кодонів можуть виникати за з'єднання послідовностей V і J з участю D -сегмента. Допускають, що в соматичних клітинах можуть утворюватися нові D -сегменти внаслідок D — D -рекомбінації. Інша гіпотеза допускає, що в процесі рекомбінації в місцях стиків V — D або D — J можуть вбудовуватися додаткові нуклеотиди з допомогою ферменту дезоксинуклеотидтрансферази. Відомо, що цей фермент активний у лімфоцитах і використовує для вбудовування вільний 3'-кінець. Ці та інші дані свідчать про те, що реакція об'єднання генних сегментів у процесі розвитку лімфоцита є додатковим джерелом різноманітності антитіл.

12.2. Сайт-специфічна рекомбінація

Сайт-специфічна рекомбінація — це рекомбінація, яка, в протилежність загальній, не потребує протяжних ділянок гомології, але для здійснення якої необхідні суворо визначені послідовності ДНК і спеціальний ферментативний апарат. У кожному конкретному випадку сайт-специфічна рекомбінація забезпечує особливу функцію; послідовності ДНК, що взаємодіють при цьому, різні і розпізнаються різними ферментами. Тому кожен випадок сайт-специфічної рекомбінації має певні відмінності щодо механізмів здійснення.

Розрізняють два види сайт-специфічної рекомбінації: **подвійну**, коли обидві взаємодіючі ДНК несуть послідовності, що розпізнаються ферментами рекомбінації, і **одинарну**, коли такі послідовності є лише в одній із двох ДНК. Одинарна сайт-специфічна рекомбінація, яку ще називають іноді **незаконною**, здійснюється за переміщення в геномі мігруючих генетичних елементів еукаріотів і транспозибельних елементів бактерій.

Прикладом добре з'ясованої подвійної сайт-специфічної рекомбінації може бути процес інтеграції фага λ у хромосому *E. coli*. В лізогенну фазу розвитку фага λ його ДНК вбудовується в геном кишкової палички між локусами *gal* і *bio*, реплікується як частина бактеріальної хромосоми і успадковується дочірніми клітинами.

ДНК бактеріофага λ попадає в клітину *E. coli* у вигляді лінійної молекули, яка в клітині замикається в кільце завдяки односторонньому липучим кінцям. Ця кільцева молекула ДНК фага містить

attP-сайт, який за рекомбінації взаємодіє з *attB*-сайтом бактеріальної хромосоми (рис. 12.15).

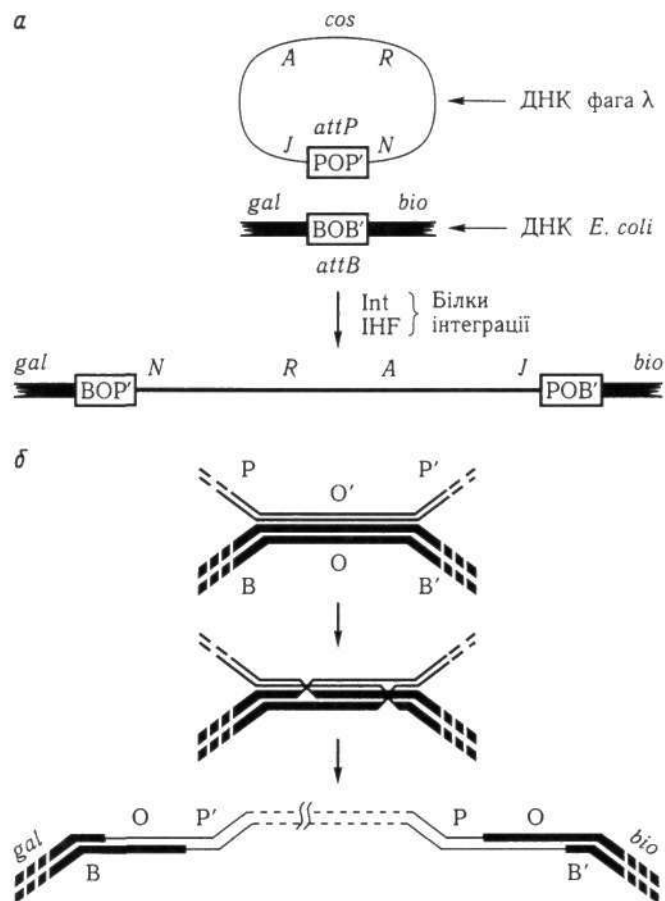


Рис. 12.15. Загальна схема інтеграції геному фага λ і бактеріальної ДНК (а), а також механізм сайт-специфічної рекомбінації (б) за цього процесу:

Тонкі лінії — фагова ДНК; жирні — обмежені ділянки ДНК бактерії.
J, A, R, N — гени фага

Ділянки *attP* і *attB* мають коротку однакову послідовність нуклеотидів у центрі (її позначають літерою «О») і різні за будовою «плечі». Тому сайти *attP* і *attB* можна позначити відповідно як POP'

і BOB' . За рекомбінації між фаговою (POP') і бактеріальною (BOB') послідовностями утворюється два рекомбінантних сайти BOP' (або $attL$, тобто лівий) і POB' (або $attR$ — правий). Внаслідок інтеграції утворюється лінійний профаг, послідовність генів в якому є перmutованою відносно їх послідовності у вільній ДНК фага λ .

Для інтеграції фагової і бактеріальної ДНК необхідний продукт фагового гена int , який кодує фермент інтегразу, і бактеріальний білок IHF (англ. *integration host factor* — фактор інтеграції хазяїна). Ці білки специфічно приєднуються до сайтів приєднання $attP$ і $attB$ (від англ. — *attachment*), переводять $attP$ в більш компактну структуру і сприяють взаємному зближенню $attP$ з $attB$. Фермент інтеграза, крім того, виявляє властивості топоізомерази I і каталізує односторонні розтини в обох молекулах ДНК. Вважають, що в місці взаємодії $attP$ і $attB$ виникає чотириниткова структура ДНК і поява односторонніх розтинів у ній сприяє воз'єднанню вільних кінців фагової і бактеріальної ДНК (здійснюється акт «розрив воз'єднання»). В результаті утворюється рекомбінантна ДНК, в якій інтегруються геноми бактерії і фага λ . Інтегрований фаговий геном називають **провірусом** або **профагом**.

Вирізання (ексцизія) профага із клітинної хромосоми — це теж наслідок сайту специфічної рекомбінації, але на цей раз між рекомбінантними сайтами $attL$ (BOP') і $attR$ (POB'), які знаходяться на кінцях ДНК профага. Реакція вилучення фагової ДНК із хромосоми клітини-хазяїна потребує додатково білкового продукту фагового гена xis (білок ексцизаза). Процес вирізування фагової ДНК із хромосоми кишкової палички, тобто **індукцію фага**, не можна вважати процесом, зворотним інтеграційній рекомбінації: ці два процеси відрізняються будовою сайтів, в яких здійснюється рекомбінація, а також участю конкретних білків. Існує думка, що за ексцизи білок Int утворює комплекс з сайтом $attR$ лише в присутності білка гена xis . Далі цей комплекс з'єднується з комплексом білок Int — сайт $attL$.

Сайт $attB$ в хромосомі *E. coli* є єдиним місцем, куди, як правило, вбудовується ДНК профага λ . Однак бувають випадки, коли цей сайт хромосомою бактерії втрачається, тоді інфікуючий фаг може лізогенізувати бактерію, інтегруючись в іншому місці, хоча ефективність такої реакції — не більше 0,1% від частоти інтеграції в сайт $attB$. Ці вторинні сайти приєднання мають послідовності, які дуже нагадують послідовності серцевинної частини сайту BOB' .

Наявність випадкової гомології певних послідовностей у ДНК профага і бактерії може обумовлювати неточну ексцизію. В цих випадках фагова ДНК вивільняється завдяки реципрокній рекомбі-

наші між певною послідовністю в ДНК профага і певною послідовністю у фланкуючій бактеріальній ДНК (рис 12 16) Реакція здійснюється шляхом загальної (RecA-залежної) рекомбінації між ділянками ДНК профага і бактерії-хазяїна, що мають випадкову гомологію

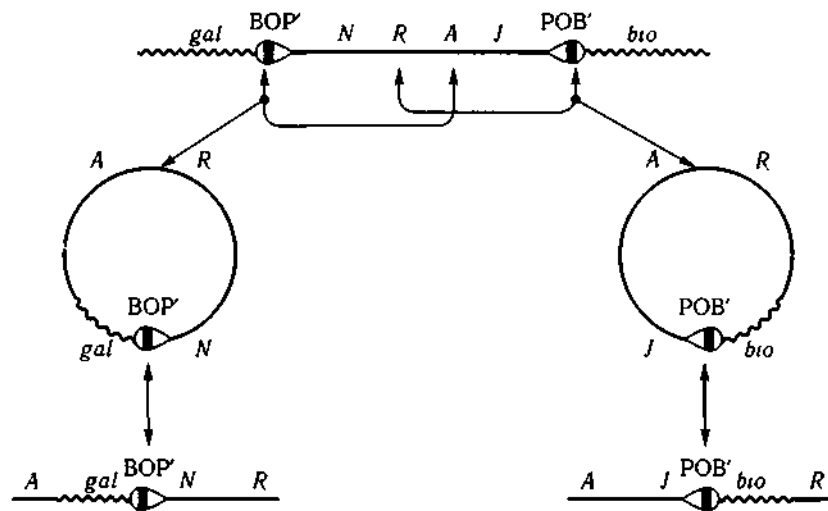


Рис 12 16 Утворення трансдукуючих фагів λ_{gal} і λ_{bio} внаслідок неточного вирізання профага із хромосоми бактерії

В результаті такого «незаконного» вирізання утворюються так звані «дефектні» фаги, які містять один або декілька генів бактерії-хазяїна замість своїх власних генів, але зберігають здатність інфікувати інші клітини. Процес переносу бактеріальних генів з допомогою таких фагів від одних клітин до інших отримав назву **трансдукції**, а відповідні фаги називаються **трансдукуючими**.

Ще один приклад класичної сайт-специфічної рекомбінації являє собою взаємодія дочірніх молекул ДНК фага P1 після реплікації вихідної молекули ДНК в бактеріальній клітині. Помірний фаг P1, в протилежність фагу λ , в лізогенному стані може не вбудовувати свій геном у хромосому *E. coli*, а існувати у вигляді автономної низькокопійної плазмиди. Механізм розподілу (сегрегації) таких плазмід по дочірніх клітинах бактерії може порушуватись у зв'язку з гомологічною рекомбінацією між дочірніми молекулами ДНК фага після реплікації. Внаслідок цього процесу може утворюватися димерне кільце, яке за поділу клітини попаде лише в одну із дочірніх

клітин (рис. 12.17). Це ускладнення усувається завдяки наявності спеціального механізму сайт-специфічної рекомбінації між двома

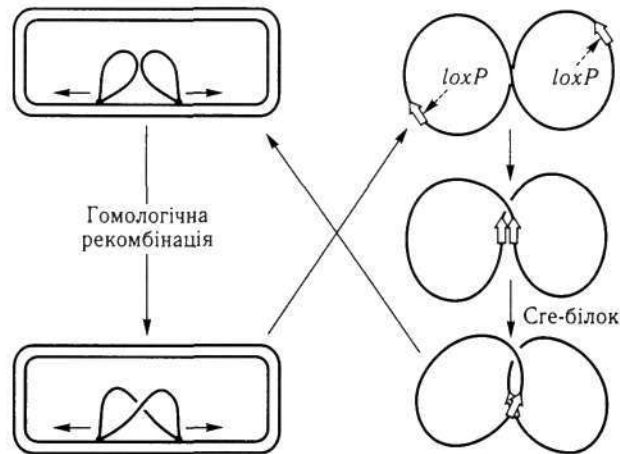


Рис. 12.17. Схема гомологічної рекомбінації між двома кільцевими ДНК фага P1 і мономеризація димерного кільця шляхом сайт-специфічної рекомбінації

послідовностями *loxP*. ДНК фага P1 містить лише одну таку послідовність, але у випадку утворення димера виникає дві послідовності *loxP* в прямій орієнтації одна до одної (рис. 12.17). Рекомбінацію між ними здійснює продукт фагового гена *cre* (Cre-білок), який розрізає димер на мономери.

Системи сайт-специфічної рекомбінації, необхідні для стабільного успадкування, є не тільки у профага P1. Інші плазмиди, а також кільцева хромосома *E. coli* під час реплікації також можуть утворювати димерні форми, які розрізаються з допомогою сайт-специфічної рекомбінації.

Крім того, у складі ДНК багатьох фагів, бактерій і інших прокаріотів є певна ділянка (сегмент), що може змінювати просторову орієнтацію на 180° (інверсія) і тим самим змінювати круг хазяїв бактеріофага або змінювати антигенну природу деяких поверхневих білків у бактерій. Такі здатні до інверсій сегменти ДНК є, наприклад, у фага P1 (C-сегмент), фага Mu (G-сегмент) та у інших об'єктів.

За інверсію сегмента G ДНК фага Mu відповідає ген *gin*, кодує Gin-білок. G-сегмент має розмір біля 3 кб і обмежений інвертованими повторами довжиною біля 20 п. н. За інверсії G-сег-

мента G_{in}-білок діє як топоізомераза, самостійно здійснюючи і розтин, і перехресне з'єднання молекули ДНК. У складі G-сегмента є гени *U* і *S*, які кодують білки відростків фага, причому в одній орієнтації G-сегмента кодуються одні білки, а в протилежній орієнтації — інші. Внаслідок цього розширюється круг хазяїв бактеріофага: одна орієнтація G-сегмента забезпечує інфікування фаговою часткою *E. coli* і *Salmonella typhimurium*, а інша — ураження бактерій кишкової групи *Citrobacter*, *Shigella*, *Erwinia*, *Serratia*. Аналогічним чином *S. typhimurium* змінює тип флагеліну, із якого побудовані жгутики на її поверхні (явище **зміни фаз**). Ферменти, що здійснюють інверсію сегментів ДНК шляхом сайт-специфічної рекомбінації, в усіх зазначених випадках різні, проте їх об'єднує значна гомологія первинної структури, що свідчить про їх спільне походження.

12.3. Генетична рекомбінація у бактерій

Комбінаційна мінливість бактерій і інших прокариотів, яка так важлива для адаптації і еволюційного розвитку цих організмів, визначається інтенсивністю рекомбінаційних процесів в усьому їх розмаїтті. Бактеріям властиві прояви загальної (гомологічної) і сайт-специфічної рекомбінації — як законної, так і незаконної. Незаконна рекомбінація, яка пов'язана з міграцією в геномі транспозибельних елементів, вже була розглянута (розділ 11.6.3). Щодо інших типів рекомбінації, то в природі їх забезпечують головним чином три дуже важливих біологічних процеси:

1) **Кон'югація** бактерій і різні форми обміну генетичною інформацією з допомогою плазмід.

2) **Трансформація** — процес, за якого нова інформація вноситься у клітину великими фрагментами (рідко цілими молекулами) чужорідної ДНК, що має певний ступінь гомології до хромосоми клітини-реципієнта.

3) **Трансдукція** — процес, за якого нова інформація вноситься в бактеріальну клітину так званими трансдукуючими фагами.

Кожен з цих процесів є передумовою тієї чи іншої різновидності загальної або сайт-специфічної рекомбінації, наслідком якої є поява в геномі реципієнта нового алельного гена, зміна дози гена, його положення тощо. Все це обумовлює фенотипову мінливість бактерій, яка за природою може бути як комбінаційною, так і мутаційною.

12.3.1. Плазмиди, епісоми і рекомбінація у бактерій за кон'югації

Процеси, що передують рекомбінації, у прокариотів дуже прості. Це пояснюється відносною простотою організації цих об'єктів. До прокариотів відносяться бактерії, актиноміцети, ціанобактерії (сильно-зелені водорості) та ін., які, як правило, не мають чіткої компартменталізації молекулярних процесів, а поділ їх клітин здійснюється без механізмів мітозу або мейозу. Внутрішні мембрани у прокариотів відсутні. Єдиний виняток — фотосинтетичний апарат ціанобактерій, розташований на мембранних структурах — тилакоїдах, які нагадують тилакоїди пластид вищих рослин, проте лежать безпосередньо у цитоплазмі.

Саме простота організації прокариотів обумовила досить швидкий прогрес у з'ясуванні структури генетичного апарату бактерій і механізмів його функціонування, включаючи механізми генетичної рекомбінації. Крім ДНК хромосом бактерій, в процесах рекомбінації приймають участь також інші здатні до автономної реплікації структури — плазмиди і епісоми, про які вже йшлося (розділ 3.3.2). За кон'югації бактерій плазмиди від донорної клітини передаються реципієнтній, і разом з ними передаються не тільки власні гени плазмід, але й хромосомні гени донора. Механізм переносу плазмиди від донора до реципієнта передбачає її подвоєння і передачу копії. Це стає можливим завдяки тому, що кожна трансмісивна або мобілізаційна плазміда містить певну послідовність нуклеотидів — **оріджин переносу**, який розпізнається спеціальним білком. Останній вносить у цю послідовність одноланцюговий розтин і ковалентно приєднується до шойно утвореного 5'-кінця. Потім ланцюг, з яким зв'язаний цей білок, переноситься в реципієнтну клітину, а нерозірваний ланцюг залишається в клітині-донорі. Весь цей процес здійснюють продукти *tra*-генів трансмісивної плазмиди, серед яких особливо важливою є АТР-залежна хеліказа, яка розплітає і розділяє два ланцюги плазмиди. Після такого розділу і переносу одного з ланцюгів у реципієнтну клітину реплікативний апарат добудовує недостаючі комплементарні ланцюги і у донора, і у реципієнта. Білок, що міститься на 5'-кінці перенесеного ланцюга, сприяє замиканню утвореної дволанцюгової ДНК в кільце і таким чином реципієнтна клітина отримує копію плазмиди донора.

Сучасні уявлення про молекулярну структуру плазмідних ДНК базуються на результатах досліджень реплікативних форм ДНК одноланцюгового фага φX174, а також фага λ, вірусу поліоми та ін. З'ясовано, що плазмідні ДНК в клітині можуть існувати у вигляді закритих суперспіралізованих і відкритих релаксованих кільцевих

форм. Можливе також існування нехромосомної ДНК у лінійній дволанцюговій формі.

Рекомбінація в клітинах бактерій може здійснюватись як безпосередньо між плазмідами, так і між нехромосомними елементами (плазмідами, фагами) і хромосомною ДНК. В процесі так званої сексдукції донорні бактеріальні клітини можуть передавати реципієнтам фрагменти (дуже рідко — цілі копії) своїх хромосом. Роль посередника в цьому обміні виконує фактор кон'югації F у вигляді одного із його варіантів (F').

Як вже зазначалося (розділ 3.3), деякі штами кишкової палички (F^+) несуть статевий фактор F , тоді як інші штами (F^-) не мають його. За кон'югації штам типу F^+ виступає як донор генетичного матеріалу, а штам F^- — як реципієнт. Таким чином, за кон'югації чоловічі (F^+) і жіночі (F^-) клітини грають неоднакову роль.

Процес кон'югації у бактерій *E. coli* був відкритий у 1946 році Дж. Ледербергом і Е. Татумом, які показали можливість формування прототрофних колоній (тобто дикого типу) після висіву змішаної культури двох ауксотрофних мутантів *E. coli* K12 на тверде живильне середовище. Висіви цих мутантів окремо один від одного не давали росту. Досить швидко було з'ясовано, що в основі цього явища лежить не реверсія мутантного гена до дикого типу (це трапляється дуже рідко), а рекомбінація генів після кон'югаційного переносу сегментів хромосоми від клітин-донорів у клітини-реципієнти. Саме цей перенос хромосомних генів від одних бактерій до інших опосередковується фактором F . Цей фактор в F^+ -клітинах існує у вигляді однієї-двох копій на геном і за звичайного росту клітин реплікується по тета-типу незалежно від хромосоми, але синхронно з нею. В протилежність цьому, за кон'югації бактерій F -плазміда реплікується за сигма-типом. 5'-одноланцюговий кінець материнської молекули ДНК через цитоплазматичний мостик проникає в F^- -клітину, де синтезується його комплементарний ланцюг, і утворена дволанцюгова структура замикається в кільце-плазмиду F . При цьому F^- -клітина перетворюється в клітину F^+ . Здатність F^+ -клітини передавати копію статевого фактора в F^- -клітину визначається продуктами генів F -плазмиди. Фізична карта F -фактора містить гени, що забезпечують кон'югативний перенос копії плазмиди (гени *tra*) і гени, що відповідають за реплікацію самого F -фактора (рис. 12.18, а). Крім того, плазміда F містить інсерційні сегменти (*IS*-елементи), з допомогою яких вона може вбудовуватись у хромосому бактерії. Включення F -фактора в хромосомну ДНК здійснюється не в одному специфічному сайті, як у випадку фага λ , а в багатьох (біля 20) сайтах хромосоми *E. coli*, де також містяться аналогічні *IS*-елементи. Інтеграція забезпечується механізмом

ResA-залежної гомологічної рекомбінації між *IS*-елементом плазмідної ДНК і аналогічною послідовністю ДНК хромосоми. Клітини з інтегрованим у хромосому *F*-фактором здатні до кон'югації і рекомбінаційних процесів з високою частотою, тому позначаються символом *Hfr* (від англ. *high frequency recombination*).

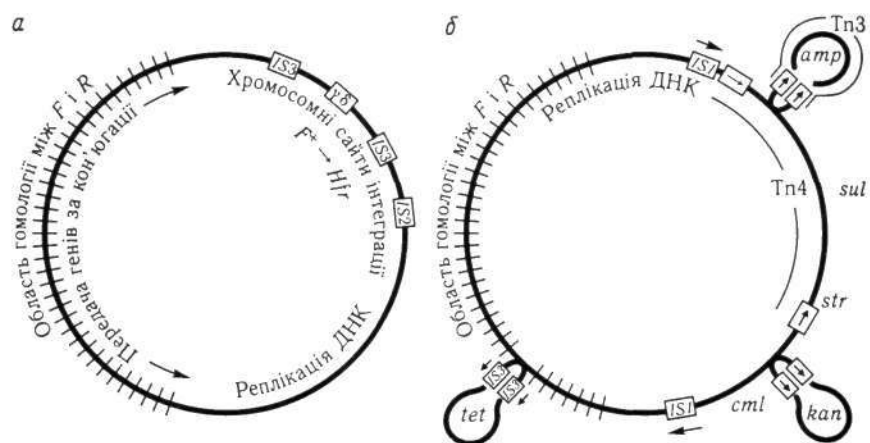


Рис. 12.18. Генетичні карти *F*-фактора (а) і *R*-плазмиди (б) *E. coli*.

Показано області гомології цих плазмід, наявність *IS*-елементів, відповідальних за інтеграцію *F*-фактора в бактеріальну хромосому (а), а також транспозонів, обмежених *IS*-елементами (б)

Як вже згадувалося, в інтегрованому стані *F*-плазмідна сприяє переносу частини або (деколи) цілої хромосоми *E. coli* в *F*⁻-клітині. Причиною цього є те, що за кон'югації бактеріальних клітин інтегрований *F*-фактор ініціює реплікацію хромосоми бактерії за сигма-типом, починаючи з того сайту, в який він вбудований (рис. 12.19). Реплікація розпочинається з середньої частини інтегрованого фактора *F* — у сайті, який називають локусом *o* або **реплікатором**. Передача реципієнту фактора *F* можлива лише в тому випадку, коли хвиля синтезу обійде всю кільцеву ДНК хромосоми і досягне вихідної точки. Практично це означає, що реципієнтна *F*⁻-клітина перетворюється в *F*⁺ лише після отримання повної копії хромосоми клітини-донора, бо повна копія фактора *F* у зв'язку з зазначеними особливостями реплікації попадає в реципієнтну клітину в останню чергу. Таким чином, можна підкреслити принципову відмінність результатів схрещування штамів бактерій *F*⁻ із штамми *F*⁺ та *Hfr*:



У першому випадку всі реципієнтні клітини F^- отримують копію плазміди F і перетворюються в F^+ , у другому — цього практично не буває ніколи, бо кон'югаційний мостик між бактеріями руйнується значно раніше, ніж це необхідно для повної реплікації хромосоми-донора (близько 20 хв).

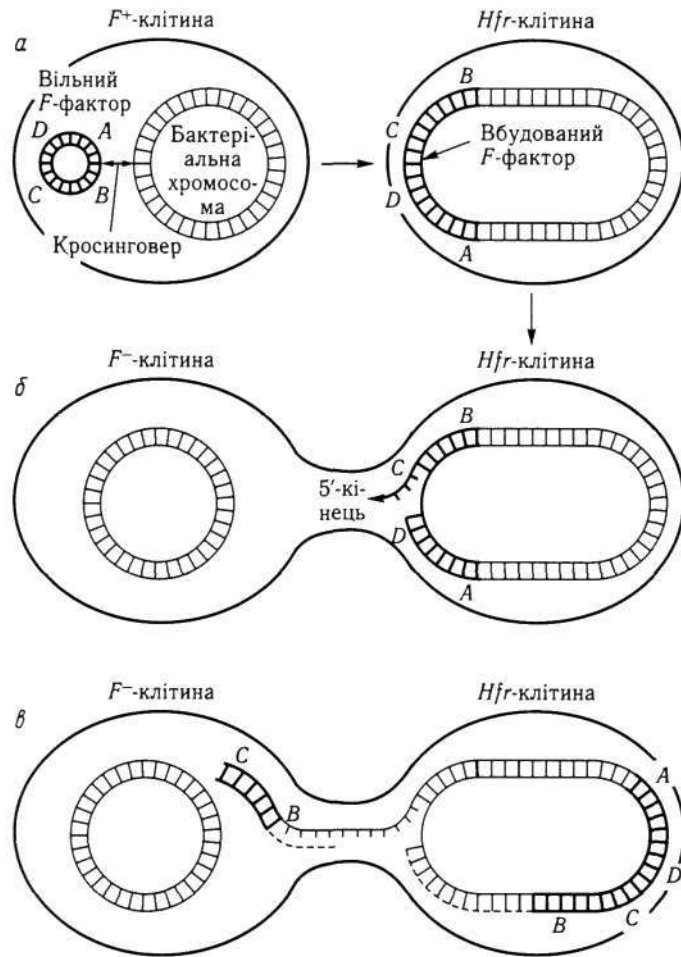


Рис. 12.19. Інтеграція F -фактора з хромосомою і перенос одноланцюгової ДНК бактерії-донора за кон'югації:

a — інтеграція F -фактора; *b* — початок кон'югації; *v* — добудова комплементарного ланцюга

Коли копія частини або всієї хромосоми *Hfr* попадає в клітину F^- , стає можливою загальна законна рекомбінація між генетичними маркерами обидвох геномів. Вважають, що механізм такої рекомбінації близький до того, що спостерігається за трансформації у бактерій, тобто за проникнення в клітину екзогенної частково гомологічної молекули ДНК або її сегмента. Як за трансформації, так і за кон'югації різні ділянки привнесеної донорної ДНК знаходять ділянки гомології в ендогенній реципієнтній молекулі, після чого розпочинаються вже знайомі нам акти генетичного обміну. При цьому одна (будь-яка) з двох ниток трансформуючої молекули включається в хромосому реципієнтної клітини шляхом подвійного кросингверу з участю білка RecA і утворенням *D*-петлі (рис. 12.20).

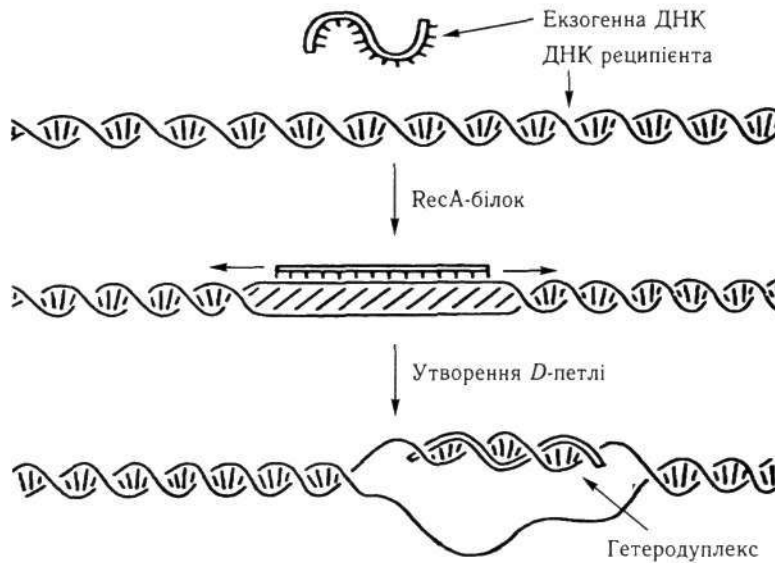


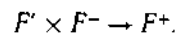
Рис. 12.20. Утворення *D*-петлі за участю білка RecA в процесах трансформації:

Пошук гомології між двома нитками різних ДНК здійснюється шляхом просування одно- і дволанцюгової ДНК уздовж одна одної, або за рахунок повторних актів дисоціації і утворення комплексу. Коли гомологія знайдена, RecA-білок замінює один із ланцюгів дуплекса на інший

Внаслідок усіх цих перебудов генетичний матеріал реципієнта може замінитися на генетичний матеріал донора, а одноланцюговий сегмент ДНК реципієнта, що відслоївся від вихідного дуплекса, руйнується. Після такого заміщення хромосома реципієнта на дея-

кому протязі містить гетеродуплекс — один власний і один чужий ланцюг ДНК; за наступної реплікації чужа інформація може закріпитися в одній із дочірніх молекул.

Ще один поширений серед бактерій спосіб передачі генетичної інформації в реципієнтні клітини — це **сексдукція**, яка теж завершується гомологічною рекомбінацією. *F*-фактор із хромосоми *Hfr*-штаму іноді спонтанно вирізається і клітина *Hfr* перетворюється в *F*⁻. Вирізання (ексцизія) *F*-плазмиди іноді здійснюється неточно. Такий неточно вирізаний із хромосоми ***F'*-фактор** містить суміжний сегмент бактеріальної хромосоми. Вважають, що формування фактора *F'* здійснюється шляхом нечастого перехрестя між сайтами гомології у хромосомі і факторі *F*. Після встановлення синапсисів між генетично гомологічними районами йде реципрокний обмін у сайтах спаровування і вивільняється фактор *F'*. В зв'язку з тим, що хромосома клітин *Hfr* має ряд зазначених гомологічних ділянок, структура можливих факторів *F'* дуже різноманітна. *F'*-фактори, як і *F*-фактор, відносяться до кон'югаційних плазмід. Їх копії переносяться в *F*⁻-клітини, перетворюючи їх у клітини *F*⁺:



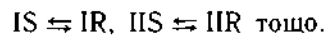
Завдяки сексдукції, реципієнтні клітини *E. coli* можуть стати неповними диплоїдами (**меродиплоїдами** або **мерозиготами**) по тих генах, які входять до складу *F'*-фактора. Для з'ясування структури різних *F'*-факторів використовують схрещування клітин-донорів *Hfr* з клітинами-реципієнтами *RecA*⁻, які із-за мутації в гені *rec* втратили здатність до інтеграції факторів *F* і *F'* з власною хромосомою. Використання клітин *RecA*⁻ дало можливість виявити утворення великих за розмірами факторів *F'*, які походять від клітин-донорів, що містять дві інтегровані плазмиди *F*. Відомі *F'*-елементи, здатні переносити біля 50% бактеріальної хромосоми. Між гомологічними ділянками *F'*-фактора і хромосоми клітини-реципієнта можлива рекомбінація, яка призводить або до утворення клітин *Hfr* з дуплікацією бактеріальних генів у випадку одиничного кросинговеру, або до реципрокного обміну генами між *F'* і бактеріальною хромосомою у випадку подвійного кросинговеру. Метод сексдукції, який дозволяє отримувати часткові диплоїди по будь-якій ділянці хромосоми, дає можливість визначити домінантність або рецесивність алельних генів і провадити комплементарний тест на функціональний алелізм.

Генетична рекомбінація може здійснюватись не тільки між хромосомами і плазмідами, але й між окремими плазмідами, що належать до однієї або різних груп сумісності. Більша частота рекомбінації спостерігається між плазмідами однієї групи сумісності, бо їм властива більша генетична гомологія.

Встановлено, що плазмідна *F* сама не детермінує ферментів рекомбінації, які були б здатні замінити продукти генів *recABC* або *recF*.

12.3.2. Трансформація як процес, що веде до рекомбінації

Явище трансформації полягає в тому, що в клітину вноситься чужа ДНК у вигляді вільних молекул або їх фрагментів. Трансформація у бактерій була відкрита Ф. Гріфітсом у 1928 р. на пневмококах (*Diplococcus pneumoniae*). S-форма пневмокока утворює на агарі гладенькі блискучі колонії і є патогенною завдяки тому, що клітини захищені полісахаридною капсулою від імунної системи інфікованої тварини. За антигенними властивостями капсули S-форми поділяються на типи IS, IIS, IIIS і т. д. Інша — R-форма пневмокока — безкапсульна, утворює шершаві колонії і непатогенна для мишей. Можливі нечасті мутаційні взаємоперетворення S- і R-форм, але тільки в межах певного типу:



В дослідах Гріфітса мишам вводили суміш живих непатогенних (R) і вбитих прогріванням патогенних (S) клітин. Результат виявився несподіваним: миші гинули, а з їх органів висівали живі патогенні пневмококи форми S. Отже, живі клітини одного із R-типів у присутності хімічних компонентів убитих S-пневмококів трансформувались у S-форму. В 1944 р. О. Овері, К. Мак-Леод і М. Мак-Карті встановили, що трансформуючою речовиною в цих дослідах була ДНК. Про це говорив той факт, що ДНК, виділена із клітин типу IIIS і добавлена в культуру бактерій IIR, спричиняла появу пневмококів типу IIIS, які стійко передавали цю ознаку своїм нащадкам. Обробка ДНК дезоксирибонуклеазою призводила до втрати трансформуючого ефекту. Таким чином, вперше було отримано прямий доказ генетичної ролі ДНК.

Пізніше явище трансформації було відкрито не тільки у пневмококів, але й у інших мікроорганізмів: у гемофільних бактерій, клубенькових бактерій, у ряду спороутворюючих бацил кишкової палички, синьо-зелених водоростей і т. д. У вищих рослин і тварин трансформацію довго отримати не вдавалося, і лише в кінці 70-х років, коли стала бурхливо розвиватися технологія генної інженерії, були розроблені методи, з допомогою яких трансформація вищих еукаріотів стала реальністю.

Існує думка, що принаймні у прокаріотів трансформація може бути цілком природним механізмом обміну генетичною інформа-

цією. В 1962 р. С. Отоленчі і Р. Хотчкіс виявили так звану **спонтанну трансформацію**: в змішаній культурі пневмококів появляються гібридні клітини з рекомбінантними ознаками. Було з'ясовано, що ці клітини виникають за рахунок поглинання ними ДНК, яка виділяється в живильне середовище іншими бактеріями. Спонтанна трансформація згодом була виявлена і у інших бактерій, і є підстави вважати, що це — один із шляхів обміну генетичною інформацією у бактерій в природних популяціях.

Механізм проникнення трансформуючої ДНК у клітину і подальші перетворення цієї ДНК вивчали з використанням радіоактивної мітки та інших сучасних методів. Здатність поглинати ДНК властива не всім, а лише так званим **компетентним** клітинам, які виникають у середині логарифмічної стадії росту бактерій і складають не більше декількох відсотків клітин усєї популяції. Для успішного здійснення трансформації необхідна участь «**факторів компетентності**» — низькомолекулярних білків або поліпептидів, які дещо відрізняються один від одного у різних видів бактерій. За наявності хлорамфеніколу — інгібітора білкового синтезу — стан компетентності у клітин не розвивається. У деяких видів бактерій (наприклад, кишкової групи) здатність поглинати екзогенну ДНК властива лише **протопластам**, яких отримують після обробки клітин лізоцимом та іншими ферментами. Збільшити проникність клітин для трансформуючої ДНК можна також з допомогою хлористого кальцію та інших методичних підходів.

Механізм поглинання чужорідної ДНК компетентною клітиною досить складний. Спершу ДНК розміром не менше $1 \cdot 10^7$ Да зв'язується з поверхнею клітини, де розтинається спеціальними нуклеазами до менших за розміром фрагментів ($4-5 \cdot 10^6$ Да), які проникають у клітину. Деякі бактерії, наприклад пневмококи, можуть неспецифічно поглинати ДНК різних джерел; інші, наприклад *Neisseria meningitidis*, поглинають лише гомологічну ДНК свого виду. Фрагменти з молекулярною масою нижче $5 \cdot 10^5$ Да в клітини не проникають.

Зразу ж після поглинання ДНК клітиною дволанцюговий фрагмент розплітається на два одноланцюгові фрагменти. Один із них руйнується нуклеазами, а другий вступає в синапсис з гомологічною ділянкою хромосоми клітини-реципієнта і витісняє із дуплекса один із власних ланцюгів хромосоми з утворенням *D*-петлі за вже знайомою нам схемою (розділ 12.3.1). Весь процес трансформації, що здійснюється за механізмом гомологічної рекомбінації, завершується протягом 10—30 хв. Частота трансформації у різних бактерій складає приблизно 1%.

Трансформація у бактерій спостерігається не тільки в межах одного виду, але й між різними видами. Однак, чим далі відстоїть

один вид від іншого в таксономічному відношенні, тим менша частота міжвидової трансформації. Слід ще раз підкреслити, що дрібні фрагменти ДНК не здатні поглинатися клітинами і не виявляють трансформуючої активності. Саме на руйнуванні донорної ДНК на дрібні фрагменти основана захисна дія систем «модифікації-рестрикції» у бактерій (розділ 5.1).

До трансформації примикають деякі явища, в основі яких також лежить поглинання екзогенної ДНК бактеріальною клітиною. Перш за все це явище **трансфекції**, за якого компетентні клітини поглинають штучно виділену фагову ДНК. Наслідком цього процесу є розвиток фага, лізис бактерії і вихід із клітини зрілих фагових часток, здатних до наступного інфікування. Цікаво, що таким «неприродним» способом можна заразити навіть ті бактерії, які нечутливі до звичайного зараження фагом у зв'язку з мутаційними змінами поверхневих білків та іншими причинами.

Трансформація може слугувати не тільки одним із способів гібридизації бактерій для побудови їх генетичних карт, але й методом штучного введення в клітину ДНК різного походження. Сьогодні **плазмідна** або **векторна трансформація** з використанням природних і штучних плазмід широко використовується в генній інженерії бактерій і еукаріотів.

12.3.3. Генетична рекомбінація в явищах трансдукції

Трансдукцією називають перенос генів від одних бактеріальних клітин до інших з допомогою бактеріофага.

Бактеріофаги або віруси бактерій поділяють на два типи — вірулентні і помірні. Перші з них після розмноження в клітині бактерії викликають її лізис (**літична** реакція). Помірні бактеріофаги здатні спричинити як літичну, так і **лізогенну** реакцію. В останньому випадку фаг не лізує клітину, а існує в ній як плазмідна, або включається в хромосому бактерії (стан профага), і його геном реплікується разом з цією хромосомою. Бактерії, що містять у своїй хромосомі профаг, називаються **лізогенними**. Існування профага є тимчасовим; за так званої **індукції** він покидає хромосому бактерії, переходить у вегетативний стан і розмножується. Процес індукції можна визвати штучно, опромінивши лізогенну бактерію ультрафіолетовим світлом або іншими індукуючими агентами. Цікаво, що лізогенні бактерії імунні до повторного зараження тим самим фагом, що викликав **лізогенію**. Це пояснюється тим, що профаг постійно продукує репресор, який запобігає експресії ранніх генів даного фага або профага.

Таким чином, генетичний матеріал помірних фагів, попадаючи в клітину бактерії, може поводити себе як епісома. Коли профаг не точно вивільняється із хромосоми бактерії, він може захоплювати невеликий сегмент її ДНК. За наступного інфікування гени цього сегмента можуть вбудовуватись у хромосому нового реципієнта.

Розрізняють три типи трансдукції: **загальну** (або неспецифічну, генералізовану), **обмежену** (або специфічну) і **абортивну**.

У випадку загальної трансдукції фрагменти ДНК донора можуть випадково включатися в дозріваючу фагову частинку разом з фаговою ДНК або навіть замість неї. Це призводить до утворення **трансдукуючих часток** дефектного фага, який втрачає частину власного геному. Механізм формування фагових часток, що здійснюють загальну трансдукцію, пов'язаний з активністю фагового ферменту, який розрізає бактеріальну і фагову ДНК в багатьох місцях. В процесі збірки фагів приблизно 0,3% фагових нащадків упаковують у голівку не фагову, а випадкові фрагменти бактеріальної ДНК. При цьому в голівці фага може вміститися бактеріальна ДНК довжиною $1/50$ — $1/100$ від усєї хромосоми, тобто $2,5$ — $5,0 \times 10^7$ Да. Найбільш вивченими фагами, здатними здійснювати загальну трансдукцію, є фаг P1 у *E. coli*, фаг P22 у *Salmonella typhimurium*, фаги PBS1 і SP10 у *B. subtilis*. Трансдукуючі фагові частинки утворюються під час літичного циклу розвитку цих фагів.

За **обмеженої трансдукції** здійснюється рекомбінація між фаговою і хромосомною ДНК, тому трансдукуючі частинки фагів обов'язково містять ДНК обох типів.

У випадку **абортивної трансдукції** привнесений фагом у клітину фрагмент ДНК донора не включається в хромосому клітини-реципієнта, а залишається в її цитоплазмі в незмінному стані і проявляється фенотипово. Під час поділу клітини цей фрагмент передається лише одній із двох дочірніх клітин, тобто успадковується по одній лінії. В кінці-кінців він втрачається в наступних поколіннях. За допомогою абортивної трансдукції можна провести цис-транс-тест (розділ 13.2).

Явище **загальної трансдукції** відкрили Н. Ціндер і Дж. Ледерберг у 1952 р. в дослідах з *Salmonella typhimurium* — бактерією, що викликає тифоїдну пропасницю у мишей. Переносником генетичного матеріалу в цих дослідах слугував помірний фаг P22. Цей фаг частину генетичного матеріалу із хромосоми бактерії, в якій він розмножувався, переносив в інші клітини, інфіковані пізніше. Фаг P22 виявився спроможним трансдукувати будь-які гени у салмонел. Саме тому цю трансдукцію і назвали загальною або неспецифічною. Доказано, що в частинках трансдукуючих фагів P1 або P22 практично вся фагова ДНК може бути замінена на бактеріальну. Фраг-

мент хромосомної ДНК, здатний вміститися в голівці трансдукуючого фага P1, складає біля 2,3% хромосоми *E. coli*. У випадку фага P22, ДНК якого має менші розміри, ніж ДНК фага P1, фрагмент хромосоми *Salmonella*, здатний трансдукуватися, не перевищує 1% її довжини. Частота трансдукції по певному маркеру, тобто відношення частоти клітин-трансдукантів до загальної кількості бактеріальних клітин, уражених фагом, коливається в межах 10^{-5} — 10^{-7} . Ймовірність, з якою перенесений фагом фрагмент хромосоми донора включається у хромосому реципієнта, досягає 40%. Дефектність фагових часток, що здатні викликати загальну трансдукцію, підтверджується тим, що вони, хоч і здатні інфікувати інші клітини, ніколи не спричиняють лізису бактерій-реципієнтів і не надають їм імунності до суперінфекції звичайними нетрансдукуючими фагами. Слід зазначити, що з допомогою фагів P1 і P22 може здійснюватися трансдукція не тільки хромосомних, але й плазмідних ДНК.

Прикладом обмеженої трансдукції може бути трансдукція, спровокована фагом λ , який, переходячи в стан профага, займає чітко визначене місце у хромосомі бактерії. Внаслідок цього трансдукції підлягає певна обмежена послідовність бактеріальної хромосоми: це або частина оперона *gal*, відповідального за використання субстрату галактози, або оперона *bio*, що містить гени синтезу біотину. Інтеграція і ексцизія геному фага λ в бактеріальній клітині здійснюється з допомогою механізмів сайт-специфічної рекомбінації, які розглядалися раніше (розділ 12.2).

Здатність до обмеженої трансдукції була виявлена також у помірному фага ф80, який інтегрується у хромосому *E. coli* поблизу триптофанового оперона.

Індуковане вирізування профага λ із хромосоми, як правило, здійснюється механізмами сайт-специфічної рекомбінації, що проходить з високою точністю по місцях знаходження рекомбінантних локусів *attL* і *attR*. Іноді, як уже зазначалося (розділ 12.2), згадана ексцизія здійснюється неточно, і тоді утворюються дефектні фагові частки, які втрачають частину власної ДНК, але замість неї містять сегмент хромосоми *E. coli* — або частину *gal*-оперона, або район *bio*. Кільцева ДНК фага λ надрізається сайт-специфічною ендонуклеазою і придбає лінійну структуру, яка упаковується в голівку фага. Загальна частота утворення спеціалізованих трансдукуючих фагів серед нормальних віріонів після індукції лізогенних часток складає приблизно 10^{-6} , отже помилкове вирізування профага — дуже рідка подія.

Наслідки зараження клітин трансдукуючими частинками різні. Приблизно в 30% випадків гени *gal* і *bio*, введені в клітини дефектними фагами λ , заміщують відповідні гени хазяїна внаслідок зви-

чайної гомологічної рекомбінації між дволанцюговим фрагментом хромосомної ДНК донора і хромосою реципієнта. При цьому, з огляду на дефектність трансдукуючих часток, лізогенних трансдукантів не утворюється. В інших 70% випадків, коли клітини інфікуються надлишком фагів, в них одночасно проникають трансдукуючі і нормальні фаги, які в цьому випадку називаються **фагами-помічниками**. За наявності останніх трансдукуючі фаги здатні вбудуватись у хромосому бактерії, тобто переходити в лізогенну фазу. Внаслідок цього лізогенні реципієнти несуть дуплікацію відповідних маркерів, наприклад, два набори генів *gal*-оперона. Якщо клітина-реципієнт мала фенотип Gal⁻, а трансдукуючі фаги за генотипом — $\lambda dgal^+$, то трансдуканти *gal*⁺/*gal*⁻ будуть частково диплоїдними. В цьому випадку часто трапляється сегрегація *gal*⁺ і *gal*⁻-нащадків трансдукантів внаслідок рекомбінації в середині дуплікованого району, що супроводжується втратою профага.

Розроблено методи, що дозволяють розширити спектр генів, які може переносити фаг λ . Один із них — конструювання рекомбінантної ДНК фага шляхом вбудовування в неї бажаного гена *in vitro*. Інший шлях — це конструювання штамів *E. coli* з делецією локуса *attB*. Такі штами мають дуже низьку лізогенну активність, зате лізогенні клітини несуть профаг у самих різних ділянках хромосоми і потенційно можуть бути джерелом отримання різних за будовою трансдукуючих часток.

Як правило, в процесі трансдукції переносяться невеликі фрагменти бактеріальної хромосоми, що за розміром складають не більше 1—2% її довжини. Найчастіше переноситься один ген, іноді у складі фагів P1 або P22 може міститися два або більша кількість бактеріальних генів. Аналіз таких випадків **множинної трансдукції** дає змогу будувати карти ділянок хромосоми клітини-хазяїна. Хромосома салмонели, побудована на підставі множинної трансдукції частками фага P22, виявилася замкнутою в кільце, як у *E. coli*; в багатьох ділянках генетичні карти салмонели і кишкової палички співпадають.

12.4. Принципи побудови генетичних карт у бактерій

Генетичний аналіз бактерій ґрунтується на використанні трьох основних процесів, що призводять до рекомбінації: кон'югації, трансформації і трансдукції.

Кон'югаційне картування бактеріальних хромосом здійснюють з допомогою двох основних способів:

1) **методом переривчастої кон'югації**;

2) **шляхом визначення частоти рекомбінацій** у неповних диплоїдів — **мерозигот**. Останні, як вже зазначалося, можуть виникати після схрещування штамів $Hfr \times F^-$, а також в результаті сексдукції, трансформації і трансдукції. Слід підкреслити, що метод переривчастої кон'югації дає можливість грубо визначити послідовність генів у хромосомі бактерії за часом появи відповідних маркерів у клітині-реципієнті. Цей метод дозволяє картувати маркери, перенос яких у реципієнтну клітину за кон'югації здійснюється з інтервалом не менше хвилини. Більш тісно зчеплені гени, що переходять від донора до реципієнта майже одночасно, методом переривчастої кон'югації картувати не вдається, і в цих випадках застосовують рекомбінаційний аналіз, оснований на вже відомих нам принципах трифакторного схрещування (розділ 8.7). За рекомбінаційного картування введення ДНК клітини-донора в клітину реципієнта може здійснюватись різними способами: з допомогою Hfr -хромосом (кон'югація), разом з фагом-вектором (трансдукція), або шляхом безпосередньої передачі ДНК із клітини в клітину, як це було показано для пневмококів (трансформація). Виникаючі в усіх цих випадках мерозиготи нестабільні, оскільки донорна ДНК являє собою лише фрагмент цілого реплікона. Генетичні маркери, які містяться в донорній ДНК, можуть реплікуватись і зберігатись у нащадків лише в тому випадку, якщо вони попадають у реплікон клітини-реципієнта внаслідок рекомбінації. Для того, щоб частина донорної ДНК вбудувалась у кільцеву хромосому реципієнта, необхідно два або навіть декілька кросинговерів.

Незалежно від того, як здійснюється перенос генетичного матеріалу в реципієнтну бактерію — шляхом трансформації, трансдукції чи кон'югації, — формування рекомбінантних нащадків пов'язане із стабільною інтеграцією **екзогеноти** (гена або групи генів донора) з **ендогенотою** (геномом реципієнта), що обумовлює можливість успадкування цієї генетичної інформації в ряду поколінь. Врахування частоти **сегрегації** (вищеплення) тих чи інших рекомбінантних клонів за поділу клітин-реципієнтів лежить в основі всіх методів картування генів.

Метод переривчастої кон'югації для визначення послідовності генів у кільцевій хромосомі *E. coli* запропонували Е. Вольман і Ф. Жакоб. В основі методу лежить штучне переривання кон'югації бактерій в різні строки після її початку з наступним аналізом рекомбінантних нащадків реципієнта. Для того, щоб зупинити кон'югацію в різні інтервали часу, суспензію бактерій струшують у

гомогенізаторі. Під час цієї процедури цитоплазматичний мостик між бактеріями *Hfr* і *F*⁻ руйнується, проте реципієнтна клітина встигає отримати частину копії хромосоми донора. Перенос всього геному клітини *Hfr* — дуже рідка подія в зв'язку з особливостями передачі генетичного матеріалу *Hfr*-клітинами *F*⁻-клітинам (розділ 12.3). Копія ДНК донорної клітини за переривчастої кон'югації розривається в різних місцях, причому тим далі від 5'-кінця, який першим проникає в реципієнтну клітину, чим більше часу пройшло від початку кон'югації. Відповідно до цього різні гени послідовно переходять із донорних в *F*⁻-клітини в різний, але цілком визначений час. В досліджах Вольмана і Жакоба схрещували донорний штам, виділений В. Хейсом (*HfrH*), з реципієнтним *F*⁻ штамом *E. coli* K12. Донорний штам був прототрофним по треоніну (*Thr*⁺) і лейцину (*Leu*⁺); збріджував лактозу (*Lac*⁺) і галактозу (*Gal*⁺); виявляв чутливість до фага T1 (*T1*^s або *Ton*^s), антибіотика стрептоміцину (*Str*^s) і отрути азиду натрію (*Azi*^s). Реципієнтом слугував *F*⁻ штам *E. coli* K12, не здатний до синтезу треоніну (*Thr*⁻) і лейцину (*Leu*⁻), збріджування лактози (*Lac*⁻) і галактози (*Gal*⁻), стійкий до фага T1 (*T1*^r або *Ton*^r), азиду натрію (*Azi*^r) і стрептоміцину (*Str*^r). Генотипи донорного (*Hfr*) і реципієнтного (*F*⁻) штамів можна представити так:

Донор: *Hfr thr*⁺ *leu*⁺ *azi*^s *ton*^s *lac*⁺ *gal*⁺ *str*^s;
 Реципієнт: *F*⁻ *thr*⁻ *leu*⁻ *azi*^r *ton*^r *lac*⁻ *gal*⁻ *str*^r.

Через різні проміжки часу після змішування культур клітин *Hfr* і *F*⁻ проби, відібрані із кон'югативної суміші, різко струшували в спеціальному апараті для механічного роз'єднання кон'югуючих бактерій. Після цього клітини з цих проб висівали на селективний агар для відбору рекомбінантних нащадків і їх подальшого аналізу на успадковування неселективних маркерів. В селективному агарі містився стрептоміцин, але в ньому не було треоніну і лейцину, в зв'язку з чим на ньому росли тільки рекомбінантні клітини. Останні несли гени *thr*⁺ і *leu*⁺ від донора *Hfr* і маркер *str*^r від реципієнта *F*⁻. Рекомбінантів *thr*⁺, *leu*⁺, *str*^r, що утворювали колонії на селективному агарі, далі переносили методом реплік на різні селективні середовища для виявлення у них інших маркерів донора. Закономірна послідовність переходу різних генів із клітин *Hfr* в клітини *F*⁻ залежно від часу, що сплинув від початку кон'югації, за даними В. Хейса виглядає, як у табл. 2.2.

Отже, проникнення генів донора у клітину реципієнта здійснюється з певною чіткою послідовністю залежно від часу. Якщо добір рекомбінантів здійснюється по проксимальних маркерах, тобто таких, що передаються першими (в нашому прикладі — *thr*⁺), то

Таблиця 2.2

Послідовність переходу різних генів із клітин *Hfr* в клітини *F*⁻ залежно від часу (за даними В. Хейса)

Час після початку кон'югації, хв.	Гени, що перейшли із клітин <i>Hfr</i> в клітини <i>F</i> ⁻ (за реципроних схрещувань)
0,0	Рекомбінації немає
8,0	<i>thr</i> ⁺
8,5	<i>thr</i> ⁺ <i>leu</i> ⁺
9,0	<i>thr</i> ⁺ <i>leu</i> ⁺ <i>azi</i> ^r
11,0	<i>thr</i> ⁺ <i>leu</i> ⁺ <i>azi</i> ^r <i>ton</i> ^r
18,0	<i>thr</i> ⁺ <i>leu</i> ⁺ <i>azi</i> ^r <i>ton</i> ^r <i>lac</i> ⁺
25,0	<i>thr</i> ⁺ <i>leu</i> ⁺ <i>azi</i> ^r <i>ton</i> ^r <i>lac</i> ⁺ <i>gal</i> ⁺

гени, що переходять в *F*⁻-клітину пізніше, будуть успадковуватися залежно від тривалості кон'югації. Навпаки, якщо селективним маркером слугує одна із ознак, що кодується дистальним геном (у нашому прикладі — ген *gal*⁺), то рекомбінанти *gal*⁺ будуть нести не тільки цей дистальний, але й усі проксимальні маркери, оскільки в хромосому реципієнта вбудовується, як правило, весь переданий донором фрагмент хромосоми. Чим далі (дистальніше) від локуса *oriT* в інтегрованій плазміді *F* знаходиться даний хромосомний ген, тим менша ймовірність його проникнення в клітину реципієнта і появи відповідних рекомбінантів. За одну хвилину передається приблизно 1% довжини бактеріальної хромосоми, тому для повного переносу останньої необхідна кон'югація протягом 100 хв, що трапляється надзвичайно рідко. Ймовірність інтеграції перенесеного гена донора з хромосомою реципієнта складає приблизно 50%.

Різні *Hfr*-штами передають хромосомні маркери з різною послідовністю залежно від розташування і орієнтації локуса *oriT* плазмиди *F* у хромосомі клітини даного штаму *Hfr*.

Схрещування різних *Hfr*-штамів з *F*⁻-реципієнтом і порівняльний аналіз послідовності переносу маркерів дало можливість з'ясувати порядок розташування генів у хромосомі *E. coli* та інших бактерій, тобто побудувати їх генетичні карти. Виявилось, що генетична карта *E. coli* має кільцеву форму (рис. 12.21), що підтверджує справедливості існуючих уявлень про кільцеву будову бактеріальної ДНК. З уже відомих нам причин генетична карта кільцевої хромосоми *E. coli* подібно до циферблату годинника умовно поділена на 100 хв. Одна хвилина цієї карти відповідає 20 одиницям рекомбінації, а враховуючи, що розмір ДНК хромосоми складає $4 \cdot 10^6$ п. н., нетрудно підрахувати, що одиниця рекомбінації у *E. coli* відповідає приблизно 2000 п. н. Слід зазначити, що метод

переривчастої кон'югації не дає чітких результатів, якщо відстань між маркерами складає 2 хв і менше. Тому цей метод необхідно поєднувати з методами картування по трьох точках-маркерах, яке проводять як на основі кон'югації, так і на основі трансдукції або трансформації.

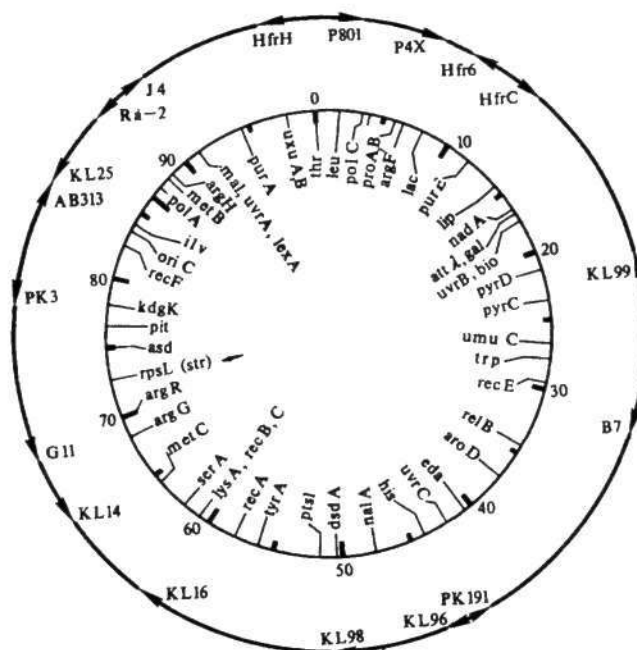


Рис. 12.21. Неповна кільцева карта хромосоми *E. coli* K12:

Цифрами над внутрішнім кругом позначено масштаб карти (хв) відносно точки 0. На зовнішньому колі стрілками позначено початок і напрямок переносу хромосоми різними *Hfr*-штамами

Кон'югаційне картування за частотою рекомбінацій різних маркерів ґрунтується на тому, що клітини певного штаму *Hfr* (донори) інкубуються разом з реципієнтними (F^-) клітинами протягом години, після чого з допомогою селективних середовищ визначають абсолютну частоту різних рекомбінантів. Для цього спершу методом переривчастої кон'югації визначають дистальний селективний маркер, який мусить знаходитися за межами досліджуваного сегмента хромосоми і значно дистальніше точки початку кон'югаційного переносу генів. Досліджуваний ген (або гени) попадають у реципієнтну клітину у складі фрагмента копії хромосоми *Hfr*.

Клітини F^- також мусять мати селективний маркер (наприклад, str^r), для того щоб можна було відібрати клітини-реципієнти, в яких пройшла рекомбінація селективних і неселективних маркерів. Картування виконується шляхом відбору по дистальному маркеру (рис. 12.22, маркер ade^+). Частота появи неселективних маркерів (на рисунку — генів $lacYZI$) у відібраних рекомбінантів $ade^+ str^r$ використовується для визначення відстані на карті будь-якого з не-селектованих маркерів до дистального селектованого ade^+ .

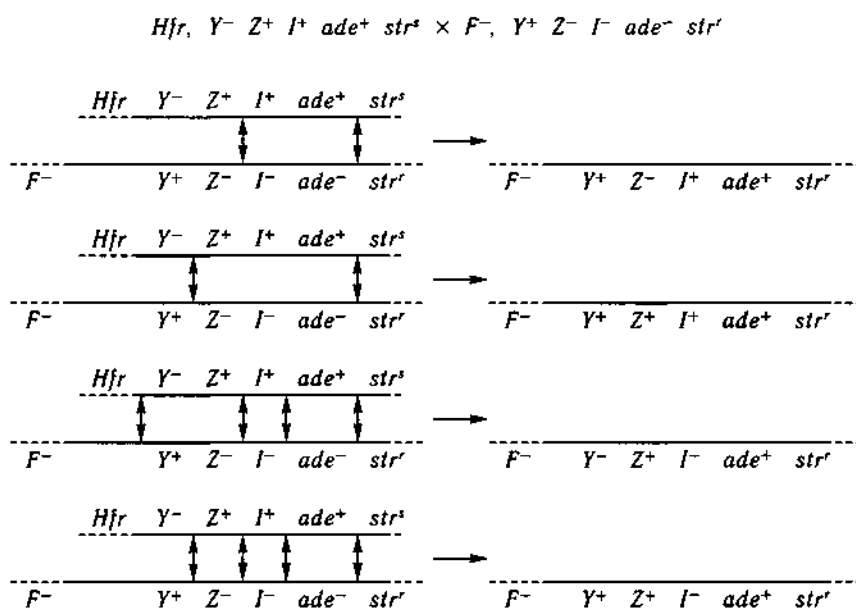


Рис. 12.22. Утворення селективних і неселективних рекомбінантних генотипів за схрещування $Hfr \times F^-$

Y^- , Z^- , I^- — нездатність утилізувати лактозу; ade^- — ауксотрофність по аденіну, str^r — резистентність до стрептоміцину, str^s — чутливість до цього антибіотика. Стрілки — місця обміну проксимальних маркерів

Рекомбінаційне картування по трьох маркерах доцільно застосовувати, якщо між генами відстань не перевищує 3 хв; в протилежному випадку маркери успадковуються незалежно. Крім того, використання кон'югаційних методів передбачає проведення реципрокних схрещувань, що не завжди можливо. В зв'язку з цим картування на коротких ділянках хромосоми здійснюють шляхом трансдукції з допомогою помірної бактеріофага P1.

Трансдукційне картування ґрунтується на з'ясуванні відносного розташування маркерів по частоті сумісного включення їх у голівку бактеріофага (котрансдукції) при утворенні дефектних часток. Встановити факт котрансдукції можна шляхом селекції бактерій, трансдукованих по одному із маркерів. Так, наприклад, якщо фаг P1 розмножувати на клітинах *E. coli thr⁺ leu⁺ azi^r*, потім отриманим препаратом фага інфікувати реципієнта *thr⁻ leu⁻ azi^r*, то тільки 3% рекомбінантів з фенотипом *Thr⁺* виявляють також фенотип *Leu⁺* і жоден з них не виявляє фенотипу *Azi^r*. Однак, якщо відбрати рекомбінантів бактерій типу *Leu⁺*, то 50% з них мають також фенотип *Azi^r*. Отже, ген *leu⁺* більш тісно зчеплений з *azi^r*, ніж з *thr⁺*, і гени, очевидно, розташовані в послідовності *thr⁺ leu⁺ azi^r*. Частоту сумісної трансдукції (котрансдукції) відповідних маркерів можна використати для визначення ступеня їх зчеплення. Факт, що лише 3% трансдукуючих фагів *thr⁺* містять також ген *leu⁺*, вказує на те, що ці гени настільки віддалені один від одного, що рідко виявляються разом в одному фрагменті ДНК, який попадає в голівку фага P1.

Вирощуючи фаг P1 на різних штаммах бактерій, а потім використовуючи нащадків цих фагів для трансдукції відповідних маркерів в інші штами, можна провадити аналіз рекомбінації за схемою трифакторних реципрокних схрещувань. У цих дослідках використовується мутант фага P1 (cleag), не здатний лізогенізувати бактерію. Подібні дослідки по котрансдукції з урахуванням наслідків рекомбінації за схемою реципрокних трифакторних схрещувань дають можливість визначати послідовність мутантних генів у хромосомі в тих випадках, коли інші методичні підходи не дозволяють цього зробити. Прикладом може бути з'ясування шляхом тримаркерного аналізу взаємного розташування тісно зчеплених генів ауksотрофності по триптофану (*trpE*, *trpC*, *trpB*, *trpA*) і деяких інших генів бактерій, що входять в один оперон.

Треба зазначити, що для побудови точної генетичної карти бактерії слід скористатися не одним, а двома або й декількома методичними підходами і співставити отримані результати. Однак не всі відомі методи можуть бути використані в кожному конкретному випадку в зв'язку з біологічними особливостями того чи іншого об'єкта. Так, наприклад, для багатьох видів бактерій кон'югація невідома, в зв'язку з чим методи кон'югаційного картування для цих об'єктів не можна використати. Незважаючи на ці та інші утруднення в проведенні генетичного аналізу бактерій, вже побудовані точні та досить повні генетичні карти не тільки для *E. coli*, але й для інших мікроорганізмів — *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* та ін. В зв'язку з підвищеним інтересом


до азотфіксуючих бактерій успішно просуваються дослідження хромосом *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium* та інших.

12.5. Принципи генетичного картування бактеріофагів

Метод трифакторних схрещувань з наступним аналізом рекомбінантних нащадків широко використовується також для побудови генетичних карт бактеріофагів. Для цього одні і ті ж бактеріальні клітини одночасно заражають генетично відмінними частками бактеріофага. Повні фагові геноми в клітині експресують свою інформацію подібно гомологічним хромосомам, між якими можлива генетична рекомбінація. Про це свідчить факт, що сумісне зараження бактеріальної клітини двома температурнозалежними мутантами приводить до появи рекомбінантів дикого типу. Їх можна виявити, висіваючи нащадків фага на чутливі бактерії за умов, непермісивних для батьківських форм бактеріофага.

Генетичний аналіз бактеріофагів ускладнюється особливостями їх розвитку в клітині, а саме тим, що реплікація фагових ДНК супроводжується неодноразовими актами їх спаровування і рекомбінації. Однак, якщо чітко контролювати співвідношення введених у клітину різних геномів фага, а також час реплікації і рекомбінації, то ці труднощі можна подолати, і тоді цілком можлива стандартна логіка аналізу рекомбінації за тримаркерних схрещувань. На основі цього підходу побудовані генетичні карти бактеріофагів фХ174, ф80 та інших, які виявилися кільцевими у відповідності з кільцевою структурою геномів цих фагів.

Кільцева карта рекомбінації побудована і для Т-парного фага Т4, геном якого в дійсності являє собою лінійну молекулу ДНК. Як з'ясувалося, ця ДНК упаковується в голівку фага в дещо більшому розмірі, ніж один геном, завдяки чому виникає так звана кінцева надлишковість фагової ДНК. Зараження клітини різними фаговими частинками створює умови для рекомбінації фагових ДНК з об'єднанням декількох геномів в один **конкатемер**. Такі довгі молекули реплікуються і знову рекомбінують. Дозрівання бактеріофага супроводжується розрізанням конкатемерних молекул ДНК на фрагменти, достатні для наповнення голівки фага, тобто дещо більші, ніж один геном. Саме тому виникає кінцева надлишковість геному, що допускає кільцеві перестановки або кільцеві **пермутації** генів (розділ 3.2).



Частина V

**ОКРЕМІ ПРОБЛЕМИ
ГЕНЕТИКИ**



ПРОБЛЕМИ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНА

Дослідження гена є актуальною і найважливішою проблемою хромосомної теорії спадковості і сучасної біології в цілому. За недовгий час існування генетики поняття «ген» істотно змінювалося і поглиблювалося залежно від досконалості методів генетичного аналізу в різні періоди розвитку генетики.

13.1. Хромосомна теорія спадковості і класичні уявлення про ген

Видатною заслугою Г. Менделя було те, що він не обмежився відкриттям основних закономірностей успадковування, а експериментально показав, що будь-які ознаки організму обумовлюються матеріальними дискретними одиницями, які із статевими клітинами передаються нащадкам. Ці дискретні одиниці спадковості Г. Мендель називав «здатками» або «факторами», чому його й вважають автором «факторіальної» гіпотези спадковості. В дослідженнях Г. Менделя ідея про дискретність спадковості вперше знайшла експериментальне обґрунтування, проте ще досить довгий час не було ніяких уявлень ні про хімічну природу гена, ні про його загальну організацію. В 1909 р. В. Йогансен менделівські фактори спадковості запропонував називати **генами**, справедливо зазначивши, що матеріальна природа гена продовжує залишатися загадкою. Ситуація була настільки складною, що В. Бетсон, автор терміну «генетика», виступив проти хромосомної теорії спадковості і признав її лише на схилі життя, зважаючи на безперечні факти, що свідчили на користь цієї теорії. В 1912 р. увагу наукової громадськості звернули на себе прогресивні роботи голандського генетика Дж. Лотсі, присвячені вивченню ролі гібридизації в процесах еволюції. На жаль, Дж. Лотсі запропонував вкрай помилкову теорію гена, в основі якої лежало уявлення про абсолютну незмінність останнього. Автор розглядав гени як незмінні одиниці спадковості,

поєднання яких у різних варіантах призводить до появи тих чи інших форм організмів. Таке розуміння природи гена привело Дж. Лотсі до думки про абсолютну константність видів, а також до заперечення мутаційного процесу і ролі природного добору в еволюції. Все це суперечило теорії Ч. Дарвіна і навіть більш раннім поглядам Г. Менделя і його послідовників на комбінаційну мінливість.

Дуже довгий час спадковий «фактор» Г. Менделя багатьом казався міфічною одиницею, в кращому випадку — статистичною, що не влаштовувало ні цитологів, ні ембріологів, ні генетиків. Як уже зазначалося, А. Вейсман ще в 1894 р. припустив, що спадкові фактори знаходяться у хромосомах, а Т. Морган і його співробітники в 20—30-х роках ХХ століття підтвердили це експериментально і розробили **хромосомну теорію спадковості**. Згідно з цією теорією дискретні елементарні одиниці спадковості — гени — розташовані у хромосомах лінійно, як намисто на нитці. Ген уявлявся матеріальним фактором, що займає певний локус хромосоми і відповідає за визначення однієї фенотипової ознаки. В генах відбуваються нечасті мутації, що ведуть до утворення нових форм генів або алелів і відповідних змін у фенотипі. Вважалося, що ген мутує як одне ціле і може розглядатися як одиниця мутації. Внаслідок кросинговеру (генетичної рекомбінації) між гомологічними хромосомами здійснюється перекомбінація існуючих у генотипі генів. За Морганом, рекомбінація можлива в міжгенних проміжках, але не в середині гена. Отже, ген в той час уявлявся як **одиниця функції, мутації і рекомбінації** (тріада Моргана), тобто як неподільна структура.

Завдяки дослідженням Г. А. Надсона і Г. С. Філіпова, Г. Меллера, Дж. Стадлера, В. В. Сахарова, М. Ю. Лобашова, С. М. Гершензона та інших видатних вчених в 20—30-х роках було відкрито явище мутагенезу, а мутантні форми живої природи стали невід'ємними складовими генетичного аналізу.

Спадкові фактори, які Мендель вперше позначив латинськими буквами *A* і *a*, визначають пару альтернативних ознак. В. Бетсон в 1902 р. запропонував назвати цю пару ознак **алелеморфною парою**, а саме явище наявності альтернативних ознак — **алелеморфізмом**. Пізніше В. Йогансен запропонував замінити термін «алелеморфізм» на більш короткий «**алелізм**», а окремий фактор цієї пари ознак назвав «**алелем**». Під термінами «домінантний алель» та «рецесивний алель» стали розуміти альтернативний стан одного і того ж гена. З відкриттям явища мутагенезу стало зрозумілим, що алелі виникають внаслідок мутації гена, властивого дикому (нормальному) типові; отже, в менделівській парі алелів один ген —

нормальний, не змінений, а другий — мутантний. Обидва алелі розташовані в одному локусі гомологічних хромосом, тому у гетерозиготного організму один із пари алелів знаходиться в одній, а другий — в іншій, парній їй, хромосомі. Мутації одного і того ж нормального гена можуть виникати багаторазово, виникаючи зміни в гені при цьому можуть бути різними і неоднаково впливати на ознаку. В результаті в популяції утворюється **серія алелів** і, відповідно, серія алелеморфних ознак. Як уже зазначалося, це явище отримало назву **множинного алелізму**. Всі алелі однієї серії визначають одну і ту ж ознаку; відмінність між ними полягає головним чином у ступені розвитку певної ознаки або в особливостях її прояву. В популяції можуть виявлятися особини з абсолютно однаковим проявом ознаки, але з різними алельними генами. Крім того, складна ознака може визначатися не тільки алельними, але й неалельними генами. Тому однакова зміна ознаки може обумовлюватися виникненням мутацій як в алельних, так і в неалельних генах. В процесі генетичного аналізу дуже важливо визначити локалізацію цих фенотипово ідентичних мутацій і з'ясувати, чи належать такі мутації одному гену, чи двом різним генам.

13.2. Непрямі методи дослідження гена

13.2.1. Критерії алелізму

Виходячи з уявлення про ген як одиницю мутації, рекомбінації і функції, Т. Х. Морган запропонував основні критерії алелізму — рекомбінаційний і функціональний, за допомогою яких мутаційні зміни можна віднести до одного і того ж, або до різних генів.

Рекомбінаційний критерій алелізму базувався на тому принципі, що якщо мутації не рекомбінують (не призводять до появи у нащадків F_2 дикого фенотипу за сумісного знаходження цих мутацій у генотипі гібриду F_1), то вони алельні, тобто це мутації одного і того ж гена. Можливість появи гена дикого типу шляхом внутрішньогенної рекомбінації між двома мутантними генами дослідниками того часу повністю виключалася, і сьогодні зрозуміло чому: внутрішньогенні рекомбінації відбуваються досить рідко і не могли бути виявлені із-за недостатньої розрізняльної здатності тогочасних методів генетичного аналізу.

Функціональний критерій алелізму або тест на комплементарність мутантних генів основою був на тому, що поєднання в гете-

розиготі двох різних мутантних генів супроводжується появою в F_1 дикого фенотипу, в той час як наявність у батьківських форм мутацій в одному і тому ж гені призводить, як правило, до збереження мутантного фенотипу у гібридів F_1 . В цьому легко переконатися на конкретному прикладі. Хай сумісна експресія домінантних генів (A і B) обумовлює одну і ту ж домінантну ознаку X . Мутантні (рецесивні) алелі цих генів (відповідно a або b) в гомозиготному стані визначають однаковий фенотип — рецесивну ознаку x . Якщо остання обумовлена мутаціями в різних генах, то генотипи мутантних батьківських форм і схема їх схрещування виглядають так:



Отже, якщо схрещуються дві фенотипово однакові гомозиготи з різними мутантними генами, то виникає дигетерозигота, яка в кожному з досліджуваних локусів містить алель дикого типу в одній хромосомі і мутантний алель — в іншій. Така дигетерозигота виявляє дикий фенотип за рахунок комплементарної взаємодії домінантних генів.

Зовсім інший результат спостерігається, якщо схрещувати дві рецесивні гомозиготи, що утримують мутації в одному і тому ж гені:



В цьому випадку мутантний фенотип зберігається і у гібриду. Тест на комплементарність або функціональний критерій алелізму може бути застосований у відношенні лише рецесивних мутацій. Дослідники школи Т. Х. Моргана вважали мутації алельними, якщо були негативними як функціональний (гібрид — мутант), так і рекомбінаційний (мутації не рекомбінують) критерії.

Результати рекомбінаційного і функціонального тестів на алелізм у дослідях Т. Х. Моргана співпадали, що свідчило, як тоді здавалося, про неподільність гена і непорушність постулату «ген — одиниця функції, мутації і рекомбінації». Проте досить швидко накопичувалися факти, що не вкладались у цю формулу, і призвели до кризи морганівської концепції гена.

13.2.2. Концепція ступінчатого алелізму та псевдоалелізму

Перші експериментальні докази подільності гена були отримані в дослідях на *D. melanogaster* і пов'язані з відкриттям явищ

ступінчатого алелізму (або ступінчатого алелеморфізму) і псевдо-алелізму. Ступінчатий алелеморфізм був виявлений у кінці 20-х років О. С. Серебровським і його учнями М. П. Дубініним, І. І. Аголом та ін. Автори вивчали будову гена *scute*, який розташований в X-хромосомі дрозофіли. Мутації гена *scute* — sc_1 , sc_2 і т. ін. — призводять до редукції щетинок і деяких інших фенотипових ефектів. Схрещуванням гомозиготних по алелях гена особин, наприклад

$$\frac{sc_1}{sc_1} \times \frac{sc_2}{sc_2}$$

отримували компаундів $\frac{sc_1}{sc_2}$, у яких найчастіше були відсутні лише ті щетинки, яких не було у обох гомозиготних батьків. Автори прийшли до висновку, що функціональною одиницею може бути не тільки весь алель, а й окремі його частини, завдяки чому фенотиповий ефект (редукція щетинок) у гібридів виявляється лише у тому випадку, коли в гомозиготному стані опиняються обидві мутантні ділянки алелів. Отже, ген може мутувати не тільки весь, як вважав Т. Х. Морган, але й частинами. Графічне зображення закономірності, відкритої О. С. Серебровським і його учнями, має вигляд сходів, приступцями яких з одного боку слугують алелі гена *scute*, а з другого — частини тіла мухи (ABCDE), в яких спостерігається редукція щетинок у даного мутанта:

$$\begin{array}{l} sc_1 — ABC \\ sc_2 — BCD \\ sc_3 — CDE \text{ і т. д.} \end{array}$$

Природа ступінчатого алелізму остаточно не з'ясована й досі, проте це явище було першим доказом подільності і складної будови гена. На підставі подібних досліджень М. П. Дубінін запропонував теорію гена, згідно з якою ген складається з більш дрібних елементів — центрів (центрова теорія гена).

На початку 40-х років появилися праці, основний зміст яких зводився до того, що в окремих схрещуваннях результати функціонального і рекомбінаційного тестів на алелізм не співпадають. Мутації, що за функціональним тестом не виявляли комплементарності і, отже, були алельними (відносились до одного і того ж гена), за рекомбінаційним критерієм справляли враження неалельних, бо рекомбінували і обумовлювали дикий фенотип деяких нащадків F_2 . Логічне пояснення цього парадоксу можна було б знайти у визнанні можливості внутрішньогенних рекомбінацій. Однак, зважаючи на високий авторитет Т. Х. Моргана, трапилося це не

зразу, і явище рекомбінацій між мутаціями, алельними за даними тесту на комплементацию, отримало назву «псевдоалелізму». Невдовзі стало зрозуміло, що «псевдоалелізм» широко розповсюджений, і що це явище — правило, а не виняток. Це трапилось після того, як об'єктами дослідження стали бактерії і віруси. Досліди на цих об'єктах дали можливість значно збільшити розміри вибірок і тим самим розрішальну здатність генетичного аналізу.

Перші дані про можливість внутрішньогенного кросинговеру були отримані в дослідях на дрозофілі К. Олівером і його співробітниками Е. Льюїсом і М. Гріном. Автори вивчали мутації в гені *lozenge*, розташованому в X-хромосомі. Цей рецесивний ген у гомозиготному стані зменшує розмір очей і обумовлює злиття фасеток ока. Дві мутації *lz*, позначені як *lz^s* і *lz^g*, виявились алельними. Це було видно з того, що схрещування відповідних мутантних мух не супроводжувалося комплементарною взаємодією досліджуваних генів і гетерозиготні самки (компаунди) мали мутантний фенотип. Отже, за функціональним критерієм алелізму мутації *lz^s* і *lz^g* належали алелям одного гена. Схрещування таких самок з самцями *lz^s* або *lz^g* за умови збільшення вибірки нащадків до десятків і навіть сотень тисяч особин дало змогу виявити серед нащадків мух з нормальними очима з частотою 0,2%.

Цей факт не можна було пояснити зворотними мутаціями, бо частота останніх у багато разів нижча, ніж 0,2%. Тому припустилися думки, що мутації *lz^s* і *lz^g* займають у локусі *lozenge* різні положення, і ті рідкі випадки, коли появляються особини дикого типу, пояснюються кросинговером і рекомбінацією в середині гена.

Як видно із рис. 13.1, наслідком внутрішньогенного кросинговеру між алельними мутаціями гомологічних хромосом (**транс-положення мутацій**) є утворення 1) нормального алеля, який обумовлює функцію і дикий фенотип, а також 2) алеля, що містить дві мутації в різних місцях або сайтах (**цис-положення**).

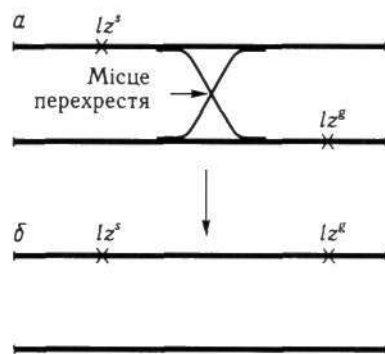


Рис. 13.1. Схема внутрішньогенного кросинговеру і переміщення мутацій із транс-позиції в цис-позицію:

а — транс-позиція мутацій (мутантний фенотип); б — цис-позиція мутацій (дикий фенотип)

Таким чином, класичне уявлення про ген як про неподільну структуру, що мутує вся разом взята, виявилось хибним. Терміни «псевдоалель» і «псевдоалелізм» стали непотрібними.

13.2.3. Цис-транс-тест і побудова генетичних карт

Подальший розвиток досліджень структури гена пов'язаний з введенням Е. Льюїсом і С. Бензером **цис-транс тесту** в широку практику генетичних досліджень. Розглянемо більш детально тест на комплементарність за допомогою рис. 13.2, на якому зображені

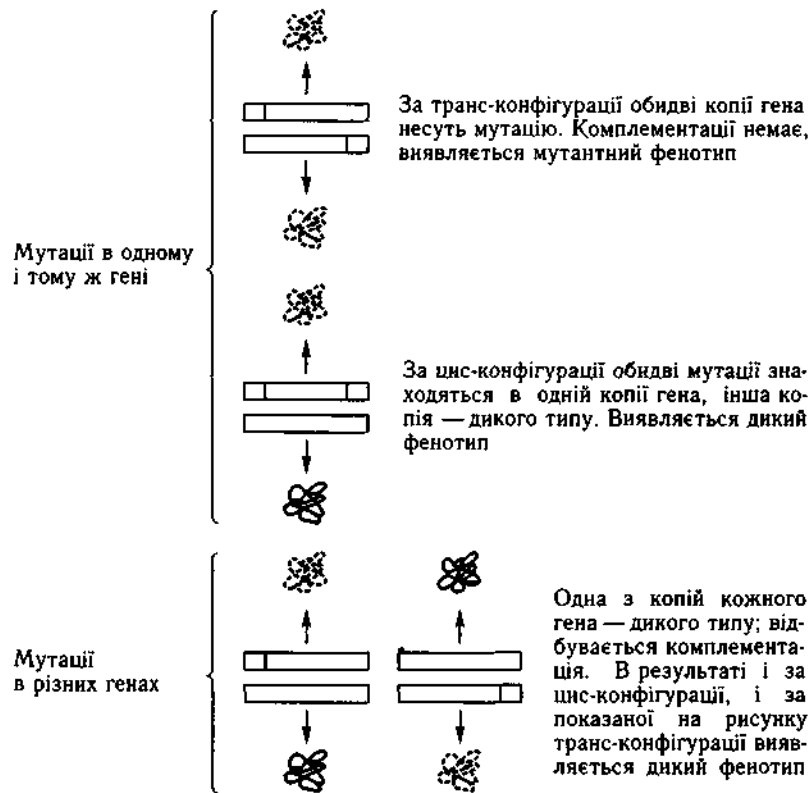


Рис. 13.2. Фенотипові вияви мутацій за їх транс- та цис-положення в одному гені та в різних генах.

Локалізація мутацій позначена вертикальними рисами в межах генів. Білки дикого типу зображені як клубки чорного кольору, мутантні білки — світліші

досліджувані генотипи в двох можливих варіантах або конфігураціях. За **цис-конфігурації** обидві мутації знаходяться в одній і тій же хромосомі. **Транс-конфігурація** передбачає розташування цих

мутацій в протилежних (гомологічних) хромосомах. З рисунка видно, що якщо дві досліджувані мутації знаходяться в одному гені, то фенотип гетерозиготи визначається їх взаємним розташуванням: за транс-конфігурації фенотип — мутантний, за цис-конфігурації — дикий. Якщо ж мутації належать різним генам, то їх взаємне розташування (цис- або транс-) не має значення, — в обох варіантах фенотип буде дикий, бо кожен такий генотип, крім мутантної копії гена, матиме копію дикого типу.

Отже, за цис-конфігурації результат не залежить від того, чи знаходяться мутації в одному, чи в різних генах. Цис-варіант використовують в основному як формальний контроль. *Організм або клітину, що несе обидві мутації в цис-положенні, тобто в одній хромосомі, називають цис-гетерозиготою.* Якщо цис-гетерозигота має мутантний фенотип, то це вказує на домінуючий характер мутацій, і в цьому випадку транс-тест не може бути використаний для доказу того, що дві мутації знаходяться в одному гені.

Процедура перевірки комплементарності двох мутацій (рис. 13.2) полягає в тому, щоб з'ясувати, чи буде у **транс-гетерозиготи** дикий фенотип (в цьому випадку рецесивні мутації відносяться до різних генів), чи **мутантний** (мутації в одному гені). Метод проведення транс-тесту залежить від особливостей досліджуваного об'єкта. Для диплоїдів необхідно схрестити між собою дві гомозиготи, кожна із яких несе мутації в обох алельних генах одного локуса. У випадку вірусів достатньо одночасно інфікувати клітину хазяїна мутантами двох типів. Положення «цис» або «транс» у цьому випадку будуть мати мутації, що належать геномам різних фагових часток (рис. 13.3). Якщо мутантні гени вірусу комплементують

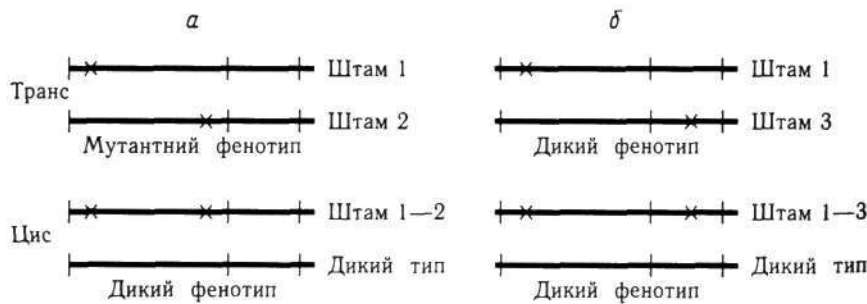


Рис. 13.3. Цис-транс-тест як приклад тесту на комплементарність *rII*-мутацій фага T4. Локалізація мутацій показана хрестиками:

а — мутації в одному гені (одної групи комплементарності); б — мутації в різних генах (різних груп комплементарності)

один одного у транс-положенні, то вони відносяться до різних генів. Продукти генів, які доповнюють один одного за транс-конфігурації, відносяться до **транс-активних**. Вони являють собою дифундуючі білки, здатні функціонувати сумісно, незалежно від того, походять вони від одного геному, чи від різних.

В умовах зараження бактеріальної клітини двома фаговими частками між їх геномами виникають функціональні відносини, аналогічні відношенням між гомологічними хромосомами диплоїда. Отже, між різними мутаціями фагових генів можливий функціональний тест на алелізм, тобто тест на комплементарність. На основі функціонального критерію (цис-транс-тесту) проведено детальне генетичне картування окремих локусів, тобто збудовано генетичні карти для багатьох вірусів, бактерій і більш складних об'єктів.

Класичними стали дослідження кінця 50-х років, проведені С. Бензером на мутантах *rII* фага T4 (*r* — від англ. *rapid lysis* — швидкий лізис). Бензер скористався двома селективними перевагами цих мутантів. По-перше, *rII*-мутанти можуть бути отримані у великих кількостях, оскільки їх негативні колонії на газоні *E. coli* B значно більші за розмірами, ніж колонії фага дикого типу. Використання хімічних мутагенів значно збільшує частоту мутацій *rII*, тому можна швидко отримати сотні різних мутантів. По-друге, *rII*-мутанти не дають нащадків, якщо ними заражати клітини *E. coli* K(λ), які утримують профаг λ. В протилежність цьому, дикий тип фага T4 (*rII*⁺) нормально розмножується в *E. coli* K(λ). Це була перша умовно летальна система, досліджена і використана в генетиці фагів.

За тестування на комплементарність клітини *E. coli* K(λ) заражали двома *rII*-мутантами, кожен з яких поодиноці не здатний розмножуватися за цих неперемисливих умов. Якщо два таких мутанти виявляють комплементарність і проявляється дикий фенотип, то це означає, що мутації цих двох мутантів локалізовані в різних функціональних одиницях фагового геному. За сумісного інфікування двома такими мутантами фаг може розмножуватися, бо кожен з мутантів забезпечує функцію, яка відсутня у другого. В даному випадку мова йде про функції (білки), що контролюються різними ділянками *rII* фага T4. Якщо ж два мутанти нездатні до сумісного розмноження на бактеріях штаму K, то можна зробити висновок, що фенотип rII обох мутантів обумовлений порушенням однієї і тієї ж функції (мутації відносяться до одного гена).

Всі мутації, що не комплементують, відносяться до однієї групи комплементарності (одного комплону) і графічно їх зображують лініями, що перекриваються (рис. 13.4). Як правило, для кожного гена можна збудувати лише одну таку **карту комплементарності**.

тації, яка чітко відображує послідовність і відносну протяжність ураження гена і його продукту за алейних мутацій.

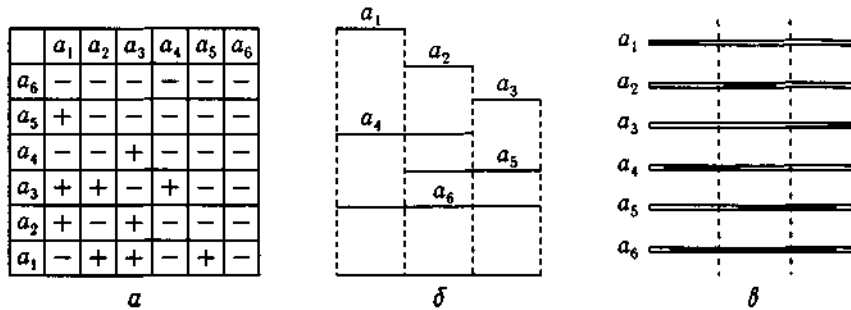


Рис. 13.4. Групи і карта комплементції:

a — наявність (+) або відсутність (-) комплементції за всіх можливих комбінацій цих мутацій; b — побудова карти комплементції (мутації зображені у вигляді відрізків; перекриття останніх відповідає відсутності комплементції між даними мутаціями, неперекриття відрізків свідчить про наявність комплементції); c — ймовірна картина ушкодження (затемнено) в білкових субодиницях, що відповідають різним мутантним алелям одного гена; a_1 — a_6 — різні мутантні алелі одного гена

З допомогою тесту на комплементцію Бензер визначив, що всі мутанти *rII* розподіляються на дві групи комплементції — *A* і *B*. Мутанти однієї групи здатні комплементувати будь-якого представника другої групи за умови сумісного зараження ними *E. coli* K(λ), однак взаємної комплементції між представниками однієї і тієї ж групи не спостерігається. Бензер прийшов до висновку, що локус *rII* включає в себе два гени — *A* і *B*, тобто дві функціональні одиниці. Кожна з них кодує будову специфічного поліпептиду, необхідного для росту фага на штамі K. Генетичну одиницю функції, що виявляється з допомогою цис-транс-тесту, Бензер назвав **цистроном**, тобто такою ділянкою геному, яка в функціонально активному стані мусить бути інтактною в цис-положенні. Термін «цистрон» деякий час широко використовувався як синонім терміну «ген»; сьогодні він вживається досить рідко.

13.2.4. Комплементційний аналіз у еукаріотів

Тест на комплементцію (або функціональний тест) дає можливість аналізувати мутації, що виникають у геномах вищих організмів. Як приклад можна розглянути дві незалежні рецесивні мутації дрозофіли — *raspberry* (*ras*) і *prune* (*pn*). Обидві ці мутації

зчеплені зі статтю і в гемізіготному та гомозиготному стані дають практично однаковий фенотип — темнорубінове забарвлення очей. Для того, щоб визначити, чи не ідентичні ці дві мутації, можна скористатися тестом на комплементарність. Схрещуванням самок *ras/ras* з самцями *pn/Y* отримують дочок з очима дикого типу. Отже, досліджувані дві мутації є комплементарними, а гени, що їх утримують, визначають різні генетичні функції. Приклади інших комплементарних мутацій, що мають відношення до кольору очей дрозофіли, були наведені в розділі 7.3.2.

Відомі й інші ситуації. Так, зчеплені зі статтю рецесивні мутації *white* (*w*), *apricot* (*a*), *coffee* (*cf*) і *buff* (*bf*), які також впливають на забарвлення очей у дрозофіли, в гомозиготному і гемізіготному стані проявляються по-різному, тобто їх фенотиповий вияв залежить від дози гена. У самок, гетерозиготних по будь-якій парі із цих мутацій, забарвлення очей відрізняється від дикого типу. Отже, кожна з названих мутацій має відношення до однієї і тієї ж функції, але ці мутації не комплементарні. Гени, що їх несуть, є алелями одного гена (гена *white*), і тому їх позначають символами w^a , w^{cf} , w^{bf} (ще один приклад множинного алелізму).

Тест на комплементарність дуже зручний за аналізу рецесивних летальних мутацій. Комплементарний аналіз виявився вирішальним методом дослідження мутацій локуса *T* у мишей. Домінантна мутація *Brachyrury* (*T*) виникає спонтанно у лабораторних ліній і легко виявляється, бо гетерозиготні миші (*T/+*) мають короткий хвіст. Гомозиготи *T/T* гинуть на ембріональній стадії розвитку. Були відкриті також мутації *t*, що являють собою рецесивні леталі. Гетерозиготи *T/t* можна розглядати як чисті лінії, оскільки ці миші життєздатні і дають нащадків наступного покоління, а *t*-мутація, як правило, подавляє рекомбінацію, і генотип *T/t* зберігається від покоління до покоління:

$$\frac{T}{t} \times \frac{T}{t} \rightarrow 1 \frac{T}{T} + 2 \frac{T}{t} + 1 \frac{t}{t}$$

Гинуть на ембріональній стадії Безхвості Гинуть на ембріональній стадії

Чисті лінії такого типу називаються збалансованими летелями; вони дуже зручні для генетичних досліджень, бо дають можливість зберегти обидві мутації для подальших досліджень без спеціального добору в кожному поколінні.

Комплементарний аналіз рецесивних летальних *t*-мутацій, який проводять схрещуванням різних збалансованих ліній, показав, що за деяких сполучень *t*-мутацій у генотипі нащадки виглядають

цілком життєздатними і мають нормальні хвости, в інших випадках — гинуть на ембріональній стадії розвитку. З'ясування механізмів комплементарності *t*-алелей у мишей дало чимало інформації щодо генетики індивідуального розвитку ссавців (розділ 14.7).

13.2.5. Рекombінаційний тест і тонка структура гена

Пропонуючи цис-транс-тест як модифікацію функціонального критерію алелізму, Е. Льюїс та інші автори (в протилежність Т. Х. Моргану) допускали можливість внутрішньогенних рекомбінацій. Пов'язаний з цим перехід алельних мутацій із транс-положення в цис-конфігурацію може бути причиною виникнення дикого фенотипу у окремих гібридів і їх нащадків. Це явище зручно спостерігати в дослідженнях з фагами, які генерують велику кількість (сотні тисяч) нащадків, чим і скористався С. Бензер. Нездатність *rII*-мутантів фага Т4 до росту на газоні *E. coli* К(λ) дає дуже зручний спосіб добору, оскільки таким способом можна виділити один *rII*⁺-фаг із 10⁶ *rII*-мутантів. Отже, є можливість легко ідентифікувати фаги дикого типу, що виникають внаслідок рекомбінації між ДНК різних *rII*-мутантів, навіть таких, що мають структурні порушення в різних місцях (сайтах) одного і того ж гена.

Схема експерименту із **схрещуванням бактеріофагів** полягає в тому, що клітини пермісивного хазяїна (*E. coli* штаму В) одночасно заражають двома мутантами, а потім підраховують загальну кількість нащадків. Кількість *rII*⁺-рекомбінантів визначають після сумісного висіву двох мутантів на газон *E. coli* К(λ). Слід врахувати, що виникаючі за рекомбінації подвійні мутанти *rII*, тобто реципрокні рекомбінанти, при цьому не визначаються, але частота їх утворення співпадає з частотою рекомбінантів дикого типу. Тому, розраховуючи відстань на генетичній карті між двома мутаціями, кількість рекомбінантів дикого типу помножують на два:

$$\text{Генетична відстань} = \frac{2 \times \text{Кількість рекомбінантних нащадків типу } rII^+}{\text{Загальна кількість нащадків}} \times 100.$$

С. Бензер виділив більш 3000 незалежних спонтанних мутантів з фенотипом ПІ, серед яких були як делеційні мутанти із втратою певної послідовності ДНК, так і мутанти з точковими мутаціями. Можна було передбачити, що ці мутації можуть рекомбінувати між собою, за виключенням тих делецій, які перекриваються, або тих точкових мутацій, що знаходяться в одних і тих же сайтах алельних генів. Після зараження бактеріального штаму К двома мутан-

тами *rII* в процесі реплікації фагових геномів може накопичитися певна кількість рекомбінантів дикого типу. Частота появи цих рекомбінантів пропорційна відстані між мутантними сайтами в геномі бактеріофага. Здатність двох алельних мутацій рекомбінувати між собою свідчить про їх розташування в різних сайтах гена. В залежності від локалізації і типу точкових мутацій в межах гена розрізняють гетероалелі (різняються типом і локалізацією мутацій) і гомоалелі (точкові мутації одного типу знаходяться в ідентичних сайтах).

Попарним схрещуванням трьох і більшої кількості мутантів *rII* з урахуванням в кожному випадку частоти рекомбінації можна розташувати досліджувані мутації в лінійному порядку (розділ 8.4). Однак, враховуючи велику кількість *rII*-мутантів, кількість необхідних схрещувань могла б скласти не менше 2 млн. Щоб зменшити об'єм роботи, С. Бензер використав інший метод, а саме метод делецій, що перекриваються.

Відомо, що за схрещування мутантів із штамми, які несуть делеції (втрати фрагментів ДНК) в гомологічних ділянках хромосоми, не можна отримати рекомбінантів дикого типу. Цей факт дає в руки дослідника могутній метод аналізу, яким С. Бензер скористався для картування тисяч незалежних *rII*-мутацій. Продумано упорядкований набір делецій, представлений на рис. 13.5, ділить область *rII* на 47 відрізків, що визначаються сусідніми кінцями різних пар делецій. Для того, щоб нову мутацію віднести до одного із цих 47 відрізків, достатньо провести чуть більше десятка схрещувань, за яких фіксується лише наявність або відсутність рекомбінантів дикого типу після сумісного висіву на *E. coli* K(λ) пари мутантів *rII*: одного з відомою делецією, а другого — з мутацією, локалізація якої ще не з'ясована. Зрозуміло, що рекомбінанти дикого типу будуть виникати лише в тих випадках, коли делеція у стандартного штаму фага не перекривається з ділянкою, в якій локалізована досліджувана мутація. Був використаний набір добре вивчених делеційних мутантів для попередньої грубої локалізації досліджуваних мутацій *rII* в тому або іншому сегменті локуса *rII* із усіх 47. Більш точно взаємне розташування цих мутацій визначали методом попарних схрещувань досліджуваних мутантів.

Картуванням мутацій, отриманих всіма можливими способами, була виявлена належність 200 мутацій до *rIIA*-цистرونу і 108 мутацій — до *rIIB*-цистرونу. Сьогодні відомо, що протяжність *rIIA* складає 1800 нуклеотидних пар, а *rIIB* — 850. Мала кількість спонтанних мутацій в одних ділянках карти і значно більша їх кількість в інших свідчить про різну ефективність мутування в різних сайтах локуса *rII*. Особливо високою частота спонтанних мутацій вияви-

лась у двох конкретних точках локуса *rII*; вони отримали назву «гарячих точок» спонтанного мутування.

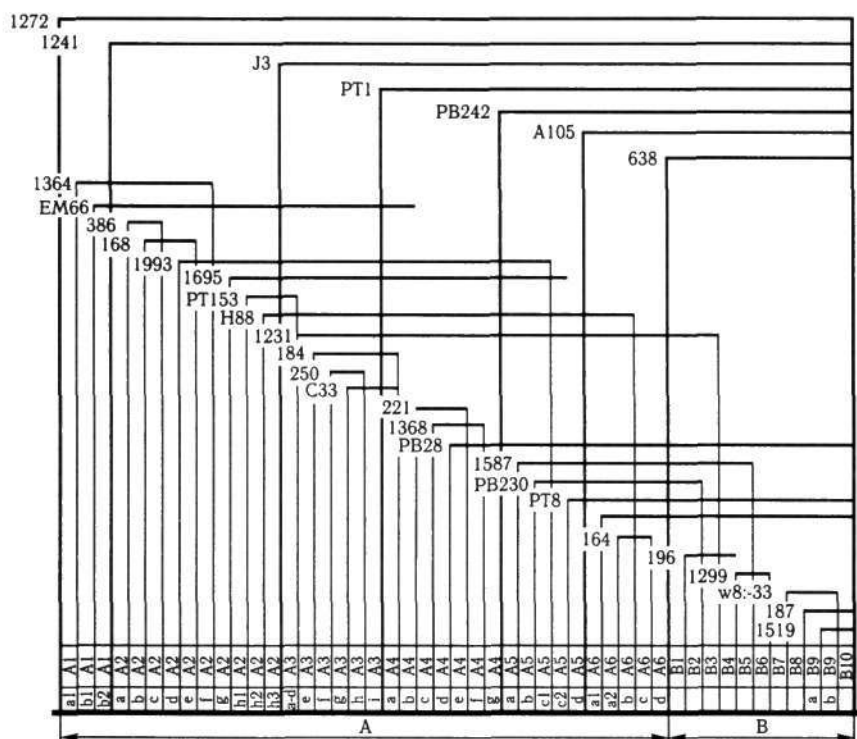


Рис. 13.5. Делеції, які перекриваються і кінці яких картуються в локусі *rII* (по Бензеру):

Проекції кінців цих делецій поділяють локус *rII* на 47 ділянок, які в свою чергу поділені на 7 більш великих ділянок делеціями, представленими у верхній частині рисунка

Розрішальна здатність рекомбінаційного аналізу дуже висока — мінімальна відстань на карті між двома сусідніми *rII*-мутаціями складає біля 0,02 одиниці рекомбінації. Ця величина приблизно відповідає двом парам нуклеотидів. Оскільки це лише груба оцінка, то доречно припущення, що рекомбінувати можуть мутації, локалізовані в сусідніх парах нуклеотидів. Саме це було чітко показано за вивчення карти тонкої структури гена *trpA*. Точкові мутації, що не дають рекомбінантів дикого типу за схрещування, очевидно, являють собою незалежні зміни одної і тої ж пари нуклеотидів.

Таким чином, після досліджень С. Бензера ген перестав уявлятися як одиниця мутації та рекомбінації, — і той, і інший процес може здійснюватися на рівні однієї пари нуклеотидів, якщо мати на увазі дволанцюгову молекулу ДНК. Саме тому відпала необхідність в термінах «мутон» і «рекон», які вживалися раніше для позначення одиниць мутації і рекомбінації. Із морганівської «тріади» залишилося лише поняття про ген як одиницю функції, але й воно поступово змінюється і доповнюється в світлі сучасних досягнень молекулярної генетики.

13.2.6. Рекомбінаційний тест і тонка структура генів еукаріотів

Рекомбінаційний аналіз для з'ясування тонкої структури гетероалелей у вищих еукаріотних організмів здійснювали майже виключно на *D. melanogaster*. Виявлення кросинговеру між гетероалелями вимагає проведення тисяч схрещувань і визначення генотипів нащадків. Це дуже тривала і трудомістка процедура, яка не може бути використана для всіх еукаріотних об'єктів.

У дрозофіли цим способом найбільш детально досліджено цистрон *rosy* (*ry*) — ген, що кодує фермент ксантиндегідрогеназу (КДГ). Мухи, у яких цей фермент не працює (нуль-активні мутанти), відрізняються червонувато-коричневим забарвленням фасеток ока, яке виникає із-за відсутності пігменту ізоксантоптерину. Личинки, що не мають активної КДГ, дуже чутливі до отруйної дії пурину. Таким чином, корм з домішкою пурину може використовуватись як селективне середовище для отримання рідко виникаючих рекомбінантів дикого типу за схрещування носіїв різних нуль-гетероалелей КДГ. Самок, гетерозиготних по двох гетероалелях *rosy* (ry^x/ry^y), у великій кількості схрещують з самцями, гетерозиготними по інших двох гетероалелях (ry^A/ry^B). Оскільки у самців *D. melanogaster* рекомбінація відсутня, то гетерозиготи дикого типу можуть з'явитися лише внаслідок рекомбінації материнських генів ry^x і ry^y і тому можуть мати генотипи ry^x/ry^A або ry^y/ry^B . Активність КДГ у личинок, гетерозиготних по ry^+ , достатня для того, щоб вони могли вижити на середовищі з домішкою пурину. Всі інші нащадки, що являють собою гетерозиготи по різних гетероалелях *rosy* (тобто компаунди), гинуть від пурину, що додається в пробірки з кладками яєць. Сумарну кількість нащадків, що загинули, можна визначити, залишивши одну-дві пробірки без пурину і підрахувавши в них число мух. За частотою рекомбінацій різних варіантів гетероалелей КДГ у самок збудована карта тонкої струк-

тури гена *rosy*, що локалізований у третій хромосомі дрозофіли (52 сМ). Одночасно з рекомбінаційним аналізом з'ясовували електрофоретичну рухливість різних варіантів КДГ, отриманих від мутантних і рекомбінантних мух. Розрішальна здатність генетичного аналізу тонкої структури гена у дрозофіли не поступається показникам, що були досягнуті в генетиці фагів і мікроорганізмів.

Рекомбінаційний аналіз тонкої структури гена був проведений також у відношенні гена білоокості (*white*), численні мутації якого в гомозиготному чи гетерозиготному стані обумовлюють різне забарвлення очей дрозофіли. Вперше описаний Морганом алель w' обумовлює абсолютно білі очі, w^e — світлі жовто-розові (еозинові), w^h — світло-жовті, w^{sal} — темно-рубінові і т. ін. Рекомбінаційний аналіз цих мутантів дав можливість побудувати карту тонкої структури локуса *w*.

Побудова цієї карти стала можливою завдяки візуальному визначенню фенотипів мільйонів мух у поколіннях від різних типів схрещувань.

13.2.7. Деякі обмеження цис-транс-тесту.

Міжалельна комплементация

Існує ряд причин, що обмежують використання цис-транс-тесту для дослідження гена. Серед них:

- а) домінантність досліджуваних мутацій;
- б) полярність мутацій, тобто їх вплив на декілька зчеплених генів, що належать одному оперону;
- в) явище міжалельної комплементации.

Щодо домінантності мутацій, то ця обставина вже обговорювалась. Зрозуміло, що дикий фенотип цис-гетерозиготи можливий лише у тому випадку, якщо обидві мутації повністю рецесивні.

Полярні мутації виникають як наслідок появи термінуючих (нон-сенс) триплетів у середині структурних генів, що призводить до обриву трансляції. Такі мутації не можуть комплементувати мутацію в іншому гені, розташованому дистально в тому ж опероні.

Феномен міжалельної комплементации розглядався раніше (розділ 7.3.2). Згадаймо, що цей феномен пояснюється взаємодією продуктів (поліпептидів) алельних генів компаунда, які кодуєть субодиниці четвертинного білка — найчастіше гомомультимера.

Відновлення ферментативної активності внаслідок міжалельної комплементации пояснюють взаємним виправленням конформації мутантних субодиниць за їх поєднання в четвертинній структурі білка. Принциповою особливістю міжалельної комплементации є те,

що дикий фенотип виявляється у компаунда без явища внутрішньогенної рекомбінації.

Можливість взаємодії ідентичних субодиниць, що несуть різні мутаційні зміни, і утворення при цьому активного білка з четвертинною структурою була показана неодноразово. Класичним прикладом може бути дослід з ферментом глутаматдегідрогеназою нейроспори. Цей фермент кодується геном *am* і складається із ідентичних субодиниць. За допомогою радіоактивної мітки було показано, що змішування двох мутантних варіантів субодиниць цього ферменту (абсолютно неактивних) супроводжується появою четвертинного білка з певним рівнем активності.

Вважають, що комплементувати можуть субодиниці білка з мутаційними змінами, що не перекриваються, тобто з такими порушеннями структури, які розташовані в різних місцях поліпептидних ланцюгів (відповідно — алельних генів).

Явище міжалельної комплементування та інші причини не дають можливості однозначно оцінювати наслідки цис-транс-тесту без додаткових досліджень макромолекулярної будови відповідних білків, молекулярної суті досліджуваних мутацій та ін. Зазначені обмеження відображають відносність функціональних критеріїв алелізму, що в цілому не зменшує значення цис-транс-тесту для генетичного аналізу.

13.3. Ген с позицій молекулярної генетики

Одиниця генетичної карти залежить від відносної частоти рекомбінацій, яка може бути різною у кожного виду. Отже, генетичні карти різних організмів не можна порівнювати між собою.

У бактеріофагів генетичні обміни здійснюються досить часто. Крім того, величезна кількість нащадків дає можливість виявити рекомбінантів, що виникають з дуже низькою частотою. Ці особливості фагів дозволяють проводити детальне внутрішньогенне картування з допомогою цис-транс-тесту та інших непрямих генетичних методів дослідження гена. У бактерій частота генетичних обмінів теж висока, як і чисельність нащадків, і тому внутрішньогенне картування за частотою рекомбінацій цілком можливе. У нижчих еукаріотів, наприклад, у дріжджів, частота рекомбінації все ще значна, але у вищих еукаріотів вона падає принаймні у 100 разів.

Отже, з'ясування тонкої структури гена шляхом дослідження рекомбінацій є реальним лише для прокаріотів і, можливо, нижчих

еукаріотів. Щодо вищих еукаріотів, то інформацію про внутрішню будову їх генів зазначеним способом отримати неможливо.

Однак навіть у прокаріотів дані, отримані шляхом врахування наслідків міжхалельної рекомбінації, дуже залежать від особливостей рекомбінаційних актів. Частота останніх може залежати від природи мутацій, використаних у схрещуванні, від послідовності ДНК в даній ділянці хромосоми, інших специфічних особливостей генотипу та від умов досліду. Отже, відстані між мутаціями на карті не завжди відповідають реальній відстані між ними в молекулі ДНК. Крім того, використання рекомбінаційного аналізу може також обмежувати мала доступність деяких мутантних форм досліджуваних організмів.

Таким чином, з багатьох причин були необхідні інші джерела інформації про організацію гена, а, отже, інші методичні підходи до його вивчення. Ці принципово нові підходи запропоновані молекулярними генетиками.

13.3.1. Деякі прямі методи дослідження гена

Кінцевою метою генетичного картування є визначення нуклеотидної послідовності гена і примикаючих до нього ділянок аж до сусідніх генів. Для цього необхідно перш за все виділити ДНК, відповідну досліджуваному гену. Спочатку це було зроблено на вірусах, у яких легко виділити всю геномну ДНК. Сьогодні виділення клітинної ДНК будь-якого типу стало загальнодоступною процедурою, особливо якщо відома первинна структура відповідного білкового продукту. В цьому випадку, виходячи із відомих значень генетичного коду, можна синтезувати необхідні мічені РНК- і кДНК-зонди, які використовують для розпізнавання і виділення фрагментів ДНК, що несуть досліджувані гени.

Після виділення ДНК будують карту рестрикції, для чого ДНК розрізають у певних точках, відстань між якими можна точно виміряти. Такі точні розтини можливі завдяки рестриктазам II-типу, мішенню для яких слугують короткі специфічні послідовності ДНК (розділ 5.1). *Карта ДНК, отримана шляхом локалізації точок ферментативних розтинів, називається рестрикційною картою.* Вона являє собою лінійну послідовність сайтів, що розпізнаються певними рестрикуючими ферментами. Відстань між сайтами рестрикції виміряють кількістю нуклеотидних пар ДНК.

Після побудови рестрикційної карти переходять до визначення послідовностей ДНК між близько розташованими сайтами (звичайно — біля 300 п. н.). Окремі розшифровані послідовності часто

перекриваються, завдяки чому їх можна з'єднати в послідовність цілого гена або більшого за розміром фрагмента ДНК. Потім виявлену первинну структуру генів порівнюють із послідовністю амінокислот у відповідних білках. Це дає можливість простежити колінеарність гена і його продукту, а у випадку еукаріотних генів — виявити наявність екзонів і інтронів. Продовжуючи визначення послідовності нуклеотидів в одному із напрямків, можна визначити відстань до наступного гена.

Порівнюючи між собою послідовності ДНК дикого типу і мутантних форм, можна точно локалізувати мутантні сайти і виявити природу мутацій. Таким способом визначається ступінь відповідності між **генетичною** картою (основаною на локалізації мутацій) і **фізичною** картою (складеною на підставі вивчення нуклеотидної послідовності ДНК).

Методи виділення з геному індивідуальних послідовностей

Виділення та клонування індивідуальних генів є необхідною передумовою з'ясування їх молекулярної організації, нуклеотидної послідовності та функції. Це необхідно також в інтересах генної інженерії, метою якої є пересадка генів із одних геномів у інші.

Виділення генів лактозного оперона *E. coli* вперше здійснили Дж. Шапіро, Дж. Беквіт і співробітники в 1969 р. Вони використали два трансдукуючих фаги — фаг λ і $\phi 80$, які несли в своїх геномах лактозний оперон *E. coli*. Ланцюги ДНК кожного фага розділяли в градієнті хлористого цезію, а потім здійснювали гібридизацію ДНК-ДНК. Дуплекс, стійкий до дії особливої дезоксирибонуклеази, яка руйнує лише одониткові ділянки ДНК, утворювався лише в області *lac*-операона. Це й дало змогу виділити лактозний оперон у чистому вигляді і розглянути його в електронному мікроскопі. На жаль, цей унікальний метод не можна застосувати для отримання інших генів, в зв'язку з чим він має лише історичне значення.

Дещо пізніше були виділені групи генів тРНК, гени гістонів, рРНК та інші гени, ДНК яких завдяки великій кількості GC-пар відрізняються плавучою щільністю від тотальної ДНК клітини. Однак цей метод може бути застосований лише у відношенні тих генів, які багаторазово повторюються в геномі.

Можливість отримання індивідуальних структурних генів з їх регуляторними ділянками появилася після того, як були розроблені методи гібридизації індивідуальних іРНК та кДНК з денатурованими фрагментами тотальної ДНК. Встановлено, що за температури,

яка обумовлює часткову і незначну денатурацію молекул, РНК витісняє гомологічний ланцюг у ДНК, утворюючи гібрид РНК-ДНК. Внаслідок такої гібридизації і відходження в сторону одного з ланцюгів ДНК утворюється структура, що за електронної мікроскопії має вигляд петлі, відомої під назвою **R-петлі**. В подальшому методом хроматографії на поліU-сефарозі можна виділити утворені молекулярні гібриди завдяки наявності поліА-последовностей на 3'-кінцях іРНК. Таким чином, у цьому методі отримання фрагментів ДНК, що відповідають окремим генам, оснований на виділенні структур типу R-петель.

Запропоновано й інші методи. Так, наприклад, для виділення фрагментів овальбумінових генів була використана овальбумінова кДНК, зв'язана хімічно з целюлозою, нанесеною на колонку. Після двох циклів очистки фрагменти овальбумінових генів були сконцентровані в 2300 разів. Слід зазначити, що в цій роботі використовувались фрагменти ДНК розміром приблизно 700 нуклеотидів, що в три рази менше довжини овальбумінового гена. За допомогою кДНК були виділені і інші гени.

Надто складною проблемою довгий час залишалася проблема отримання малоактивних (унікальних) генів із складних еукаріотних геномів. Це пояснюється тим, що кожний такий ген являє собою лише незначну частинку геному. Наприклад, геном типової клітини ссавців містить біля 10^9 п. н., так що ген розміром 500 п. н. складає приблизно лише 0,00005% ДНК ядра.

Для ідентифікації такої незначної кількості генетичного матеріалу необхідно мати **мічений зонд**, який взаємодіє лише з певними последовностями, що цікавлять дослідника. Використовують мічені радіоактивні **РНК-** або **ДНК-зонди**, гібридизація яких з певною последовністю ДНК реєструється радіоавтографічно.

Мічена іРНК у ролі зонда має ряд недоліків. Цю РНК важко отримати в абсолютно чистому вигляді і в необхідній кількості; крім того, іРНК досить лабільні. З цих причин як зонд мічену іРНК можна успішно використати лише у випадку генів, що мають у геномі багато копій і кодують стабільні РНК (гени рРНК, тРНК та ін.). Унікальні последовності ДНК, особливо ті, що слабо експресуються, з допомогою іРНК розпізнати і отримати важко. Тому замість іРНК в ролі зондів стали використовувати їх дволанцюгові **кДНК-копії**, синтезовані за допомогою зворотної транскриптази на матрицях відповідних іРНК.

Отримані кДНК попередньо клонують у складі плазмід. Для введення кДНК у плазмиду можна використати метод штучного нарощення гомополімерних липких кінців у кДНК і розрізаної рестриктазою плазмиди. Гомополімерні кінці кДНК і плазмиди здатні

комплементарно взаємодіяти, внаслідок чого утворюється химерна (рекомбінантна) плазміда, яка несе вставку кДНК. Цими плазмідами трансформують бактерії, найчастіше *E. coli*. Трансформовані клітини бактерій відбирають по їх резистентності до антибіотиків, яка кодується генами рекомбінантної плазміди. Деякі штучно отримані плазміди (рBR322, 324, 325 та ін.) мають два або й три гени стійкості і лише один унікальний сайт рестрикції для певної рестриктази. Так, наприклад, плазміда рBR322 несе гени стійкості до ампіциліну (*Ap^r*) і тетрацикліну (*Tc^r*). В гені *Ap^r* знаходиться унікальний сайт для рестриктази PstI, а в гені *Tc^r* — для Bam HI. Якщо вставку кДНК здійснити по сайту для PstI, то ген стійкості до ампіциліну руйнується, проте трансформовані плазмідом бактерії можна розпізнати завдяки появі у них стійкості до тетрацикліну.

Отриманий із бактерій матеріал кДНК може бути помічений *in vitro* з високою питомою радіоактивністю.

Перший крок в ідентифікації гена, відповідного специфічному зонду, полягає в подрібленні ДНК геному на фрагменти зручного для подальшої роботи розміру. Бажано, щоб ген знаходився в якомога меншій кількості фрагментів ДНК (в ідеальному випадку — лише в одному). Максимальна довжина фрагментів геному, які можна досліджувати, знаходиться в межах 15—20 т. п. н. Іноді неможливо отримати ген у вигляді одного фрагмента, і тоді для визначення його структури необхідно узагальнити дані, отримані за аналізу його різних фрагментів.

Для фрагментації геному використовують два методи: розщеплення рестриктазами і механічне подріблення ДНК ультразвуком або іншим способом. У першому випадку кожний фрагмент ДНК закінчується сайтом пізнання відповідної рестриктази, в другому — місця розривів є випадковими.

Розподіл сайтів рестрикції вздовж молекули ДНК носить випадковий характер, тому обробка еукаріотної ДНК рестриктазами призводить до утворення множини фрагментів. За електрофорезу в гелі ці фрагменти утворюють пляму, в якій не розрізняються окремі смуги, за винятком деяких смуг, що відповідають певним повторам у ДНК.

Наявність досліджуваної послідовності в плямі можна виявити за допомогою специфічного зонду. Для цього ДНК в агарозному гелі денатурують з утворенням одностанцюгових фрагментів, які переносять на нітроцелюлозний фільтр, де вони іммобілізуються. Процес переносу ДНК із агару на нітроцелюлозу дещо нагадує промочання (англійською — блотинг), тому цей метод відомий під назвою блотинга по Саузерну (за прізвищем автора методу). Послідов-

ність операцій по переносу фрагментів ДНК на нітроцелюлозний фільтр зображено на рис. 13.6. Агарозний гель поміщають на фільтрувальний папір, змочений концентрованим розчином солі.



Рис. 13.6. Послідовність методичних процедур за блотинга по Саузерну

Потім на гель кладуть нітроцелюлозний фільтр і зверху — сухий фільтрувальний папір, який поглинає соляний розчин. Останній проходить через агарозний гель, а потім через нітроцелюлозний фільтр. ДНК переноситься разом з розчином, але затримується (міцно зв'язується) нітроцелюлозою. Імобілізовану нітроцелюлозним фільтром досліджувану послідовність ДНК можна гібридизувати *in situ* із специфічним радіоактивним зондом, а потім виявити з допомогою радіоавтографії. Кожна гомологічна зондові послідовність виявляється у вигляді радіоактивної смуги, місце знаходження якої за електрофорезу визначається розміром фрагмента ДНК.

Клонування геномної ДНК, створення бібліотек (банків) генів

Пряме виділення унікальних фрагментів геному з допомогою зондів пов'язане з чималими труднощами. Тому для виділення окремих генів спершу проводять клонування геному, а вже потім відбирають клони, що містять специфічні послідовності. Химерні вектори, що містять фрагменти ДНК геному, називають **клонами геномної або хромосомної ДНК** (в протилежність відповідним клонам кДНК).

Клонування всього геному (в протилежність клонуванню специфічних фрагментів) називають «шотган»-експериментами (*shotgun experiment* — метод дробовика). Для їх здійснення весь геном поділяють на фрагменти з допомогою рестриктаз чи іншим способом і вбудовують їх у **клонуєчий вектор** (у плазміді чи в ДНК фага). Набір таких клонованих фрагментів називають **бібліотекою** або **банком генів**. Бібліотека, створена з використанням того чи іншого вектора (найчастіше — фага λ), може зберігатися невизначено довгий час і за наявності зонда може бути джерелом отримання специфічного фрагмента (гена).

Клонування фрагментів, отриманих шляхом механічного подріблення геному, ускладнюється тим, що вбудовування таких фрагментів у вектор вимагає досить складної процедури нарощення липких кінців. Вбудувати у вектор рестрикт значно легше. Обробка вектора і ДНК однією і тією ж рестриктазою часто призводить до утворення готових липких кінців, що дуже зручно для клонування. Однак сайти рестрикції можуть знаходитись у незручних місцях, наприклад, у середині досліджуваного гена. Подолати цю трудність можна шляхом використання двох або й більшої кількості рестриктаз з отриманням фрагментів, що перекриваються.

Розроблено методи, що дають можливість здійснити селекцію певного клону геномної ДНК із бібліотеки. Один із методів, що називається **методом гібридизації колоній**, схематично зображено на рис. 13.7.

Нітроцелюлозний фільтр поміщають на поверхню агара, де розмножуються бактерії, що містять химерні вектори. При цьому колонії бактерій опиняються на фільтрі, де їх піддають лізису, а вивільнену з клітин ДНК денатурують обробкою фільтрів лугом. ДНК зв'язується з нітроцелюлозою, а білки та інші домішки вилучаються. Після промивання ДНК фіксують нагріванням до 80 °С і гібридизують з радіоактивним зондом (найчастіше — з клонованою кДНК). Всі колонії, з якими гібридизується зонд, радіоавтографічно виявляються у вигляді темних плям. Відповідні колонії еталонної культури бактерій можуть слугувати джерелом отримання химерних векторів, а відтак — і відповідних фрагментів геномної ДНК. Якщо еукаріотний ген має значні розміри, за створення бібліотеки він може виявитися фрагментованим, і різні ділянки гена опиняються в різних клонах, що гібридизуються з зондом. В цьому випадку необхідно реконструювати повну послідовність гена, використовуючи наявність індивідуальних фрагментів, що перекриваються.

Для ідентифікації необхідного фрагмента еукаріотної ДНК в клонах бактерій можна застосувати і інші методи. Якщо досліджу-

ваний ген експресується в клітинах *E. coli* (що в більшості випадків мало ймовірно), то ген ідентифікують по здатності компенсувати відповідний дефект метаболізму у мутанта *E. coli*.

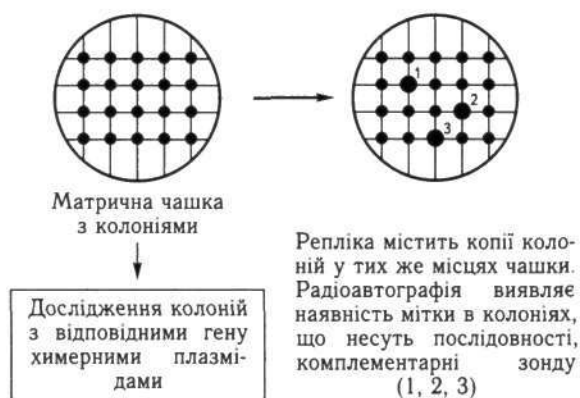
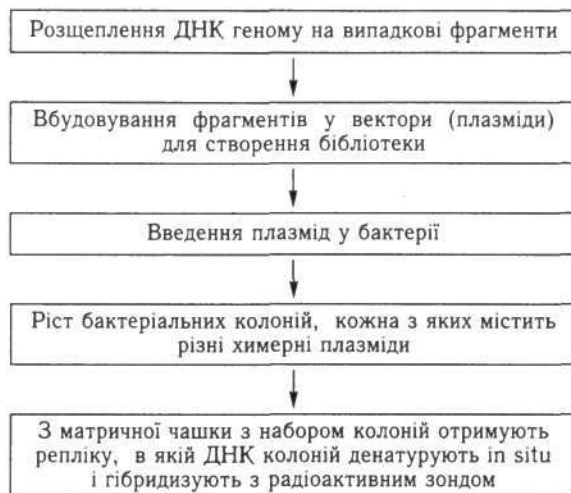


Рис. 13.7. Селекція химерних плазмід із специфічними послідовностями методом гібридизації колоній

Використовують також імунохімічні методи, наприклад, моноклональні антитіла до антигенів, що специфічно взаємодіють з досліджуваними генами або їх продуктами.

Принципи побудови рестрикційних карт

Якщо молекулу ДНК обробити рестрикуючим ферментом, то в чітко визначених місцях виникають розтини, які поділяють ДНК на окремі фрагменти. Останні можна фракціонувати за їх розмірами методом електрофорезу. Для цього препарат розрізаної ДНК наносять зверху на агарозний гель. Швидкість переміщення фрагментів в електричному полі залежить від їх довжини. Чим коротший фрагмент, тим швидше він рухається в гелі. Загалом пройдена відстань зворотно пропорційна логарифму довжини фрагмента.

Приклад використання методу ілюструє рис. 13.8. Уявімо собі, що індивідуальний фрагмент молекули ДНК довжиною 5000 п. н.

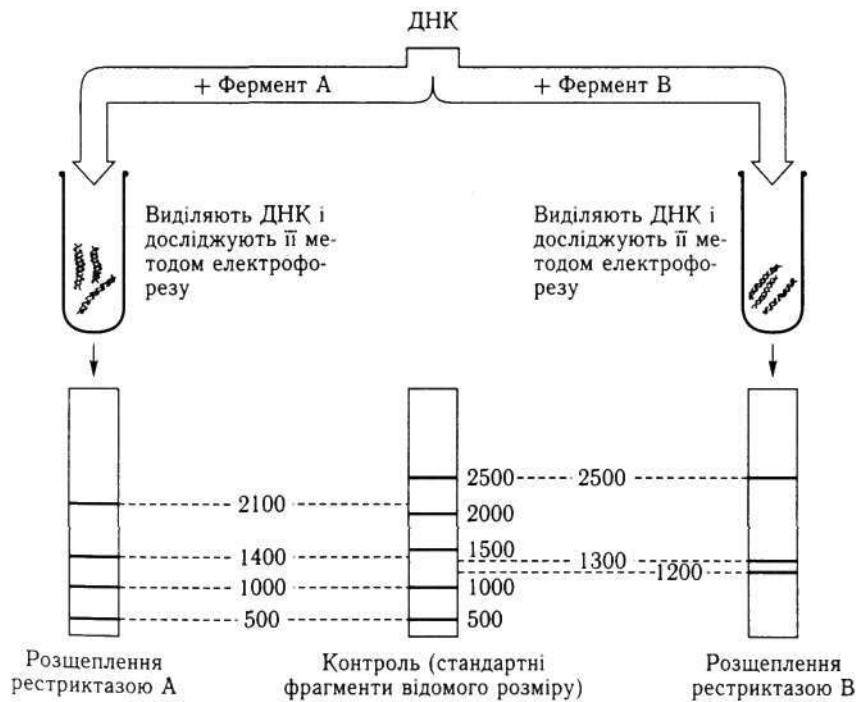


Рис. 13.8. Розщеплення ДНК рестриктазами на окремі фрагменти та їх розподіл електрофорезом в агарозному гелі

оброблено окремо двома рестриктазами — А і В. Отримані рестрикти розподіляють за допомогою електрофорезу. Фермент А в нашому прикладі розрізав ДНК-субстрат на чотири фрагменти розмірами

2100, 1400, 1000 і 500 п. н., а фермент *B* спричинив утворення трьох фрагментів довжиною 2500, 1300 і 1200 п. н.

Існує декілька методів порівняння рестриктів, отриманих за розщеплення ДНК двома різними рестриктазами. В одному із методів використовується процедура **подвійного розщеплення**. Суть цього методу полягає в тому, що після обробки досліджуваної ДНК одним ферментом (наприклад, *A*) кожен отриманий рестрикт обробляють другим ферментом (наприклад, *B*). В паралельному варіанті досліді поступають навпаки: ДНК розрізають рестриктазою *B*, а утворені рестрикти обробляють ферментом *A*. Суміш фрагментів, отриману після розщеплення вихідної ДНК та її фрагментів, аналізують за допомогою електрофорезу. Якщо фрагменти одного і того ж розміру утворюються внаслідок розщеплення двох різних більш значних фрагментів, то можна думати, що ці фрагменти перекриваються. В нашому прикладі перекриваються, наприклад, фрагменти 2100 і 2500 п. н., бо розщеплення і того, і другого дає однаковий фрагмент розміром 1900 п. н. (рис. 13.9). Фрагменти, що перекри-



Рис. 13.9. Порівняння наслідків обробки ДНК двома рестриктазами

ваються, слугують надійним ключем до рестрикційного картування. Враховуючи перекриття фрагментів, можна однозначно розташувати на карті всі сайти рестрикції (рис. 13.10).

Процедуру картування можна значно полегшити шляхом спеціальних прийомів. Один із них полягає в тому, що ДНК розрізають певною рестриктазою спершу частково (тобто не в усіх сайтах рестрикції), а вже потім — повністю. Це значно полегшує процедуру розташування окремих рестриктів у певній послідовності.

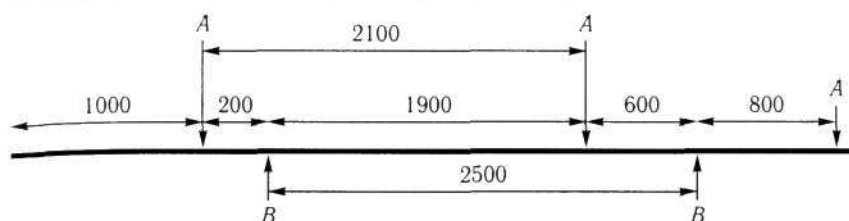


Рис. 13.10. Карта сайтів рестрикції, побудована на підставі розщеплення фрагмента ДНК двома рестриктазами (A і B):

Сайти рестрикції показано стрілками, цифри — довжина рестриктів у парах нуклеотидів

Інший зручний спосіб — це приєднання мітки (^{32}P) до 5'- або 3'-кінця молекули ДНК за допомогою спеціальних ферментів. У цьому випадку кінцеві рестрикти в суміші таких, що утворюються після обробки ДНК рестриктазами, розпізнаються завдяки наявності в них радіоактивної мітки.

Співставлення фрагментів і виявлення в них ділянок, що перекриваються, часто здійснюють методом **гібридизації нуклеїнових кислот**. У нашому прикладі фрагменти 2100 і 2500 п. н. містять ділянки (1900 п. н.), які перекриваються. Отже, ці фрагменти ДНК будуть спаровуватися (гібридизуватися) один з одним, якщо спершу викликати їх термічну денатурацію, а потім створити умови для ренатурації (знизити температуру).

Комбінуючи метод кінцевої мітки з методом неповного розщеплення, можна визначити розташування в досліджуваній ДНК всіх фрагментів, що виникають внаслідок дії однієї рестриктази. Поєднуючи ці методи з методом гібридизації фрагментів, що перекриваються, а також використовуючи декілька рестриктаз, можна переконатися, що рестрикційна карта збудована вірно і жоден з дрібних фрагментів не загубився.

Детальну карту сайтів рестрикції можна співставити з генетичною картою. Значні генетичні зміни — такі як делеції або вставки — методом рестрикційного картування виявляються досить легко. Це пояснюється тим, що вони призводять до зменшення або збільшення відповідних рестрикційних фрагментів. Крім того, внаслідок генетичних перебудов деякі сайти рестрикції зникають або

появляються вперше. Точкові мутації локалізувати на рестрикційній карті набагато складніше. Це легко зробити, якщо вони змінюють сайти-мішені для рестриктази. В протилежному випадку точкові мутації на рестрикційній карті не виявляються, бо розміри рестрикційних фрагментів ДНК дикого типу і мутантів виявляються однаковими. Для точної локалізації таких мутацій необхідно визначити послідовність нуклеотидів у ДНК.

Полімеразна ланцюгова реакція як метод ампліфікації специфічних послідовностей ДНК

Досліджувану послідовність геномної ДНК можна накопичувати не тільки клонуванням, але й шляхом локальної ампліфікації ДНК. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), що лежить в основі ампліфікації ДНК *in vitro*, описана в 1987 році. Ця процедура дає можливість протягом відносно короткого часу отримати багато копій певної послідовності ДНК. Для ПЛР необхідні олігонуклеотидні праймери-затравки, які обмежують послідовності ДНК, що ампліфікуються. Процес ампліфікації включає багаторазові послідовні цикли денатурації ДНК, реасоціації праймерів з наступним синтезом комплементарних ланцюгів.

Ключовим ферментом реакції є ДНК-полімераза. В сучасних дослідженнях застосовують ДНК-полімеразу із мікроорганізмів, яка функціонує за високих температур (Тақ-полімеразу). Температурний оптимум її дії біля 75 °С. Це дає змогу проводити реасоціацію праймера і елонгацію в умовах високої температури, що забезпечує специфічність приєднання праймера до молекули ДНК.

Праймери являють собою олігонуклеотиди довжиною 10—30 залишків нуклеотидів, комплементарних певним ділянкам досліджуваної послідовності. Синтез нового ланцюга здійснюється між ними, що призводить до подвоєння певних ділянок ДНК. Внаслідок реакції здійснюється експоненційне збільшення кількості обмежених праймерами фрагментів молекули. Оскільки синтезовані ділянки в наступному циклі синтезу виступають у ролі нових матриць, метод отримав назву полімеразної ланцюгової реакції. Якщо ділянки ДНК не обмежені праймерами, то ДНК синтезується лише на матрицях вихідних ланцюгів і накопичення вихідного матеріалу йде значно повільніше.

За допомогою ПЛР можлива ампліфікація необхідної ділянки ДНК, яка може знаходитись у суміші різних молекул або в дуже незначній кількості. Незважаючи на те, що використання ПЛР розпочалось відносно недавно, цей методичний прийом знайшов широке використання в практиці досліджень структури геному та окре-

мих генів. Крім того, цей метод значно збільшив можливості генної інженерії, ранньої діагностики спадкових захворювань, виявлення патогенів у клітині та ін. Дуже перспективним є застосування методів ПЛР для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму, тобто поліморфізму біологічних об'єктів на рівні молекул ДНК. Аналіз алельного складу мікросателітних локусів у складі ампліфікованих фрагментів ДНК дав цікаву інформацію про особливості структури геномів сільськогосподарських рослин південно-української селекції (Ю. М. Сиволап та інші дослідники).

Методи визначення нуклеотидної послідовності ДНК

Розробка методів дослідження первинної структури або **секвенування ДНК** (від англ. *sequence* — послідовність) мали революційне значення для теорії гена. Завдяки їм стало можливим з'ясування нуклеотидних послідовностей гена і його регуляторних ділянок, екзонів і інтронів, міжгенних проміжків тощо. Тим самим значно поглибилися і деталізувались уявлення про ген як функціональну одиницю.

Сучасні методи секвенування ДНК основані на тому, що отримують серію одноланцюгових фрагментів досліджуваної ДНК, які відрізняються один від одного розміром на одну основу. Ці фрагменти розділяють з допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Смуги, що відповідають молекулам різної довжини (до 300 нуклеотидів), утворюють у гелі «драбину», кожен «щабель» якої відповідає певному фрагментові досліджуваної ДНК.

Для отримання наборів зазначених фрагментів ДНК використовують в основному два підходи. В одному випадку ДНК хімічно розщеплюють на фрагменти, один кінець у яких фіксований (однаковий), а другий постійно зростає від одного фрагмента до іншого на один нуклеотид (**метод Максама—Гілберта**). Другий підхід полягає в тому, що ці фрагменти ДНК з необхідною довжиною і будовою синтезують *in vitro* на матриці ДНК, специфічно зупиняючи синтез на тій чи іншій основі (**метод Сенгера**).

За **секвенування по методу Максама—Гілберта** чотири окремих проби ДНК обробляють чотирма різними способами, кожен з яких приводить до розщеплення ДНК по місцю знаходження певної азотистої основи. Продукти деградації ДНК в цих чотирьох пробах розділяють електрофоретично на чотирьох сусідніх дорожках одного геля. Смуга, що відповідає фрагментові ДНК певного розміру, знаходиться лише на одній із чотирьох доріжок. Це дає можливість визначити нуклеотид, що знаходиться в певному положенні досліджуваної ДНК. Переходячи від однієї смуги до другої (більшо-

го розміру) в межах існуючих чотирьох електрофоретичних доріжок, можна визначити послідовність нуклеотидів у ДНК.

Використовуючи метод Максама—Гілберта, досліджувану ДНК спершу мітять з одного кінця радіоактивним фосфором, а потім специфічно розщеплюють по одній із чотирьох основ. Таким чином, спершу препарат ДНК містить ідентичні молекули, мічені з одного кінця. Після хімічної обробки кожна молекула ДНК буде розрізана лише в невеликій кількості сайтів, що містять основу, по якій йде розщеплення. Однак весь препарат у цілому буде складатись із набору молекул, у яких розрив здійснився фактично в кожному положенні даної основи (рис. 13.11). Отриману суміш молекул розділяють методом електрофорезу, і радіоактивні фрагменти ідентифікують радіоавтографічно. Кожний фрагмент, що утворює окрему

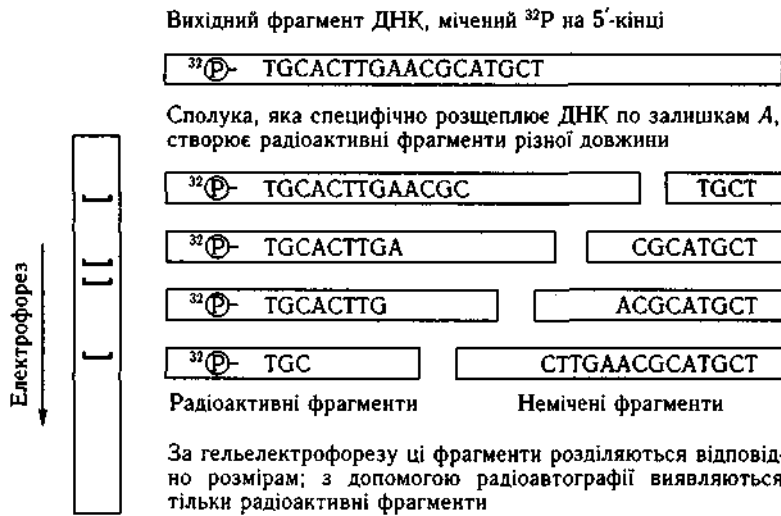


Рис. 13.11. Отримання фрагментів ДНК шляхом розщеплення нитки ДНК по певному нуклеотиду (в наведеному прикладі — по А)

смугу на радіоавтографі, має свій розмір, який вимірюється відстанню від місця розриву досліджуваної ДНК до міченого кінця цієї молекули. В результаті чотирьох типів хімічної обробки препарату ДНК виникає ціла серія смуг, що відображують положення відповідних основ у молекулі ДНК по відношенню до її міченого кінця.

У вихідному методі специфічне розщеплення по пуринах здійснювали диметилсульфатом. Останній метилує N⁷-положення гуаніну (G) приблизно у 5 разів ефективніше, ніж N³-положення аде-

ніну (A). За нагрівання метильована основа вилучається із ДНК, утворюючи розрив у полінуклеотидному ланцюгу. Оскільки реакція більш ефективна з гуаніном, продукти деградації по G утворюють

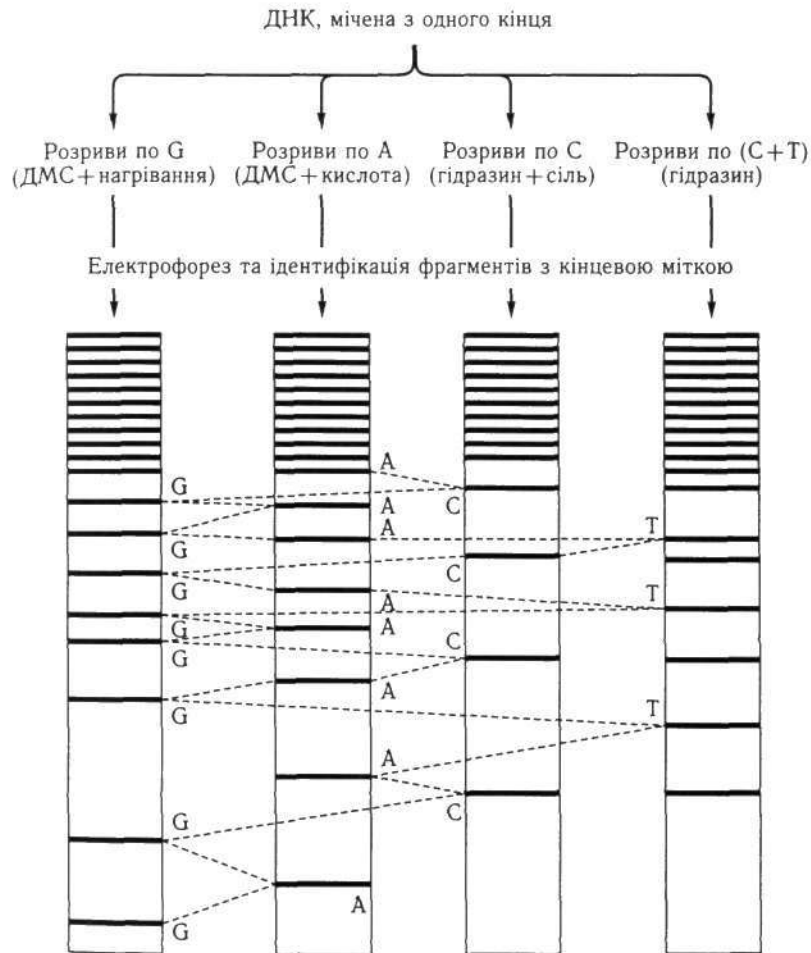


Рис. 13.12. Схема визначення послідовності ДНК за методом Максама—Гілберта

темні смуги, а по А — світлі (що відповідає менш частому розщепленню). Протилежні співвідношення інтенсивності забарвлення смуг спостерігаються у тому випадку, коли для вилучення метильо-

ваних основ замість нагрівання використовують обробку мурашиною кислотою. Це дає можливість окремо визначити місце знаходження основ А і G.

Для аналізу піримідинів використовують гідразин, який ефективно реагує з цитозином (С) і тиміном (Т). За наявності в середовищі високої концентрації NaCl реакція йде тільки з цитозином. Таким чином, можна отримати дві серії смуг, одна із яких відповідатиме розщепленню тільки по С, а друга — по С + Т.

Загальна схема процедур за методом Максама—Гілберта представлена на рис. 13.12. Чотири реакційні суміші (продукти деградації ДНК по кожній із чотирьох азотистих основ) піддають електрофоретичному розподілу на паралельних доріжках. На кожній із чотирьох доріжок виникають смуги, відповідні молекулам, специфічно розірваним у місцях розташування однієї із чотирьох основ. Послідовність ДНК читають від смуги до смуги по мірі збільшення розмірів фрагментів ДНК на один нуклеотид. Оскільки внизу геля знаходяться найкоротші фрагменти, послідовність читають знизу вгору.

Для підвищення точності дослідження можна незалежно здійснити аналіз обох ланцюгів ДНК і співставити результати.

Метод секвенування по Сенгеру передбачає не деградацію молекул ДНК до фрагментів певного розміру, а синтез таких фрагментів шляхом їх клонування в одниткових фагах. Синтез значених радіоактивних одниткових фрагментів здійснюється в напрямку від фіксованого олігонуклеотиду-затравки до певного нуклеотиду матриці за наявності нуклеотидспецифічних термінаторів синтезу ДНК. Сконструйована серія векторів на основі фага M13, в капсидах якого міститься одниткова ДНК. M13 реплікується в клітині у вигляді дволанцюгової реплікативної форми, яку можна виділити і використати для клонування сторонньої ДНК як звичайну плазмиду. Сконструйовані вектори на основі ДНК фага M13 містять полілінкер, тобто послідовність, що розрізається декількома рестриктазами. Це дає можливість вбудовувати в цю область фрагменти чужої ДНК і потім клонувати їх разом з фаговим геномом. Дуже важливо, що вставка чужорідної ДНК не зупиняє розмноження фага, і, крім того, призводить до зміни кольору фагових негативних колоній на середовищі з індикаторним барвником.

Для секвенування олігонуклеотид-затравку (15—20 нуклеотидів) гібридизують з гомологічною ділянкою ДНК фага M13, яка знаходиться поруч з сайтом, в який вбудована стороння ДНК, що клонується (рис. 13.13). Можна використати мічену з 5'-кінця затравку або вести синтез у присутності одного міченого в α -положенні нуклеотидтрифосфату. Комплекс матриця-затравка поділя-

ють на чотири проби і в кожній пробі нарощують затравку з допомогою великого фрагмента ДНК-полімерази I *E. coli* за наявності

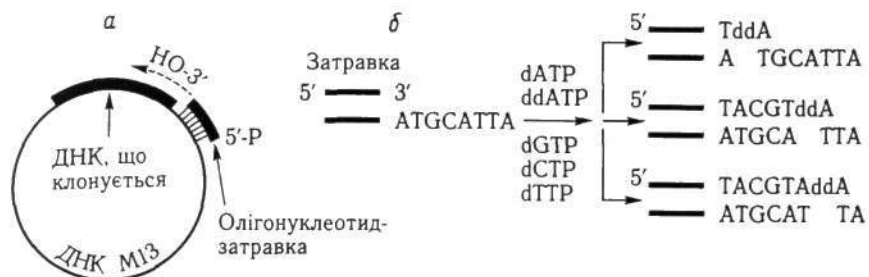


Рис. 13.13. Схема отримання фрагментів ДНК різної протяжності за Сенгером

a — вихідна структура одніткового вектора М13 зі вставкою клонуваної ДНК і олігонуклеотидом-затравкою, що використовується при секвенуванні по методу Сенгера. Пунктирна стрілка вказує напрям наступного синтезу комплементарної нитки; *b* — продукти елонгації затравки в присутності ddATP, зупиняючого ріст нитки в точках, що відповідають А (аденіну)

в середовищі всіх чотирьох радіоактивних дезоксирибонуклеозидтрифосфатів і одного специфічного для даної проби «термінатора» синтезу ДНК. В ролі «термінатора» використовують 3', 5'-дидезоксирибонуклеозидтрифосфати (ddNTP), які можуть включатися у ланцюг ДНК, але припиняють його подальший синтез. Внаслідок включення, наприклад, ddGTP замість dGTP у випадкові сайти на матриці будуть синтезуватися мічені олігонуклеотиди з фіксованим 5'-кінцем і 3'-кінцем, який виникає внаслідок обриву синтезу в будь-якому з сайтів розташування гуаніну.

Продукти реакції, яка провадиться окремо в присутності кожного «термінатора» — ddGTP, ddATP, ddCTP і ddTTP, денатурують і розділяють електрофоретично. Методом радіоавтографії отримують набір смуг, який читається знизу вгору з усіх чотирьох доріжок, як і за методом Максама—Гілберта.

Слід зазначити, що реакції елонгації, які лежать в основі методу Сенгера, потребують значно менше часу, ніж реакції хімічної деградації. Завдяки цьому розроблено методи секвенування досить довгих послідовностей ДНК, які можуть бути отримані після обробки ДНК рестриктазами або ультразвуком. Отримані фрагменти клонують у фагових частках М13, а потім визначають структуру всіх цих фрагментів.

Таким способом секвенують серію послідовностей ДНК, що перекриваються, і з допомогою комп'ютера визначають послідовність вихідного фрагмента ДНК.

Виявлення мозаїчних генів за допомогою електронної мікроскопії

Існування переривчастих генів було виявлено в експериментах по виділенню гена, що відповідає специфічній іРНК. Нуклеотидні послідовності ДНК і іРНК порівнювали з допомогою як рестрикційного картування, так і електронної мікроскопії. Саме за таких досліджень були знайдені послідовності, наявні в ДНК геному і відсутні в іРНК. Гібриди ДНК—РНК в місцях розташування інтронів не утворюються. Суть електронномікроскопічних досліджень полягає в тому, щоб відрізнити РНК—ДНК-гібриди від ділянок неспареної ДНК.

РНК можна гібридизувати з одноланцюговою ДНК. В цьому випадку комплементарні області утворюють дволанцюговий гібрид, а інші ділянки ДНК залишаються одноланцюговими. Дволанцюговий фрагмент має більшу товщину, ніж одноланцюговий, хоч іноді це важко помітити.

Інший електронномікроскопічний метод полягає в картуванні вже відомих нам *R*-петель, які виникають за гібридизації РНК з дволанцюговою ДНК. Гібрид РНК—ДНК більш стабільний, ніж вихідна дволанцюгова молекула ДНК. В зв'язку з цим один із ланцюгів ДНК-дуплекса замінюється на іРНК в тій області, де іРНК може спаруватися з комплементарною їй ділянкою. На рис. 13.14

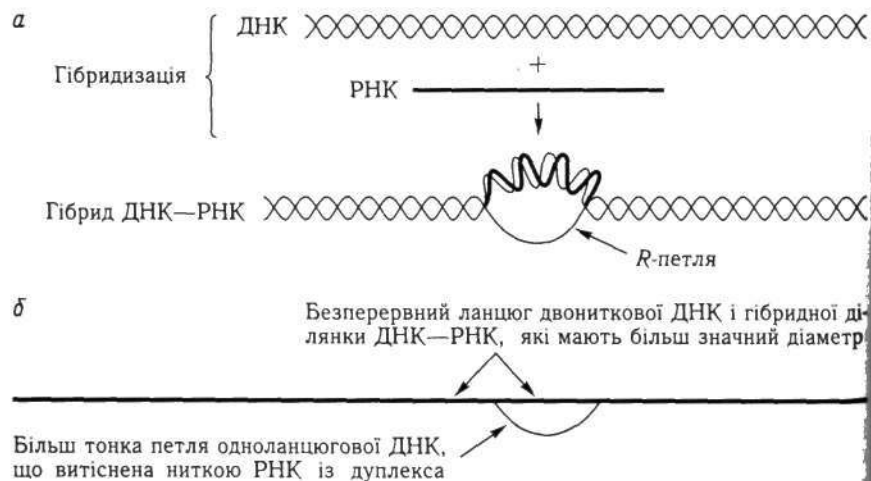


Рис. 13.14. Схема утворення (а) та електронномікроскопічної структури (б) ДНК—РНК-гібриду за взаємодії дволанцюгової ДНК та комплементарної їй одноланцюгової РНК

показано, що замінений на РНК ланцюг ДНК утворює петлю, фланковувану інтактною дволанцюговою ДНК.

Якщо РНК відповідає непереривчастій послідовності ДНК, тобто якщо молекули ДНК і РНК колінеарні, то в середині молекули ДНК утворюється єдина непереривчаста область гібриду. Якщо ж до складу гена входять послідовності, відсутні у складі іРНК, то ця частина ДНК не може гібридизуватися з РНК. Однак РНК може спаровуватися з послідовностями, що знаходяться по обидві сторони від додаткової некомплементарної ділянки ДНК. Це приводить до утворення характерних електронномікроскопічних структур, які можна виявити.

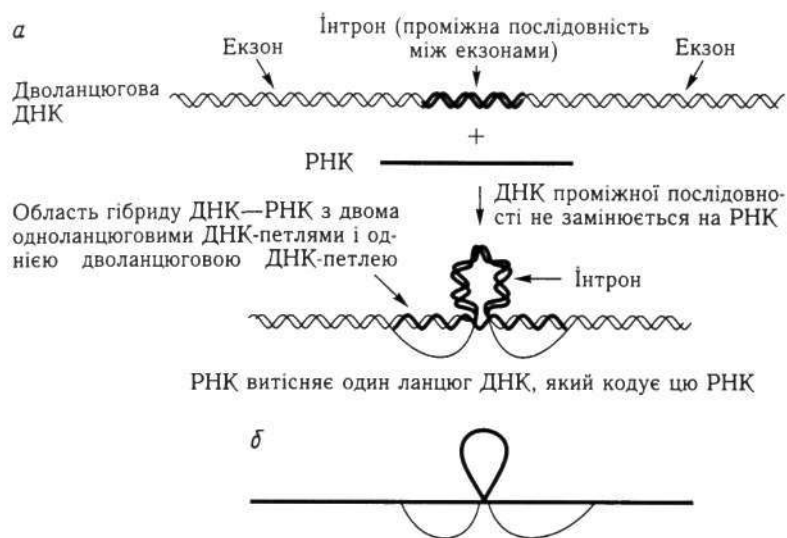


Рис. 13.15. Схема визначення локалізації інtronів і екзонів за допомогою комплементарної гену РНК:

a — гібридизація; *b* — картина, що спостерігається за електронної мікроскопії

За гібридизації РНК з одноланцюговою ДНК проміжна (некомплементарна) послідовність має вигляд одноланцюгової петлі ДНК. Якщо ж використовується метод картування R-петель, то РНК заміняє один ланцюг ДНК, гібридизуючись з ділянками ДНК з обох сторін від проміжної послідовності. Сама проміжна послідовність (тобто послідовність інtronу) залишається незмінною, зберігаючи дволанцюгову будову. В результаті виникає структура, зображена на рис. 13.15. При цьому дві ділянки гена, кодуєчі РНК, в гібриді

об'єднані. Це видно по двох витіснених із гібриду одноланцюгових петлях ДНК. В місці з'єднання цих петель назовні витісняється дволанцюгова петля ДНК, що відповідає проміжній послідовності (інтрону).

Перші електронномікроскопічні дослідження були проведені на геномах аденовірусу і вірусу SV40. Було показано, що пізня іРНК аденовірусу утворюється шляхом вилучення трьох проміжних послідовностей, що існують у геномі вірусу.

Електронномікроскопічне картування має непогану розрішальну здатність у межах 50—100 п. н. Ділянки меншого розміру на електронномікроскопічній карті можуть не знайти відображення.

Все вищесказане свідчить про те, що сучасна генетика має досить багатий арсенал методів, які дають можливість розпізнати в геномі досліджуваний ген, виділити його, за необхідності — клонувати і з'ясувати його структуру.

13.3.2. Ген як одиниця функції

Із морганівської «тріади» лише тезис, що ген є одиницею функції, не втратив свого значення і сьогодні, однак його зміст постійно змінюється і поглиблюється. Формула «один ген — одна ознака», якою визначали функцію гена в період становлення класичної генетики, виявилася неточною, бо існують складні фенотипові ознаки, які обумовлюються двома і більшою кількістю генів. Для з'ясування можливих шляхів реалізації генних функцій необхідні були глибокі дослідження на біохімічному і молекулярнобіологічному рівнях.

Ідея про те, що дія генетичних факторів опосередкована ферментами, виникла ще на початку ХХ ст. (1902—1908 р.), коли А. Геррод прийшов до думки, що спадкова хвороба людини — алкаптонурія — обумовлюється порушенням певної біохімічної реакції, яка каталізується ферментом. Подібні хвороби А. Геррод назвав «уродженими помилками метаболізму». Цей вираз містив у собі концепцію, згідно з якою генетичний дефект може призводити до порушення певного метаболічного процесу, обумовлюючи тим самим той чи інший мутантний фенотип. Однак ідеї А. Геррода, як і ідеї Г. Менделя, були надто передовими для свого часу, і тому вони мало вплинули на стан генетики того періоду.

Вивчення біохімічних механізмів дії генів розпочалось у 1935 р. з дослідження двох рецесивних мутацій забарвлення ока у дроздофіли — *vermilion* і *cinnabar*. Як уже зазначалося (розділ 7.3.2), у мух, гомозиготних по будь-якому з цих генів, очі не такі темно-червоні, як у мух дикого типу. Дж. Бідл і Б. Ефрусі імплантували

ембріональну тканину ока мутантних личинок у личинки інших мух і знайшли, що ембріональна тканина ока від мух з мутацією *vermillion*, імплантована в личинку з мутацією *cinnabar*, розвивається в око нормального кольору. В протилежність цьому, реципрокна імплантація ембріональної тканини ока (від мутантів *cinnabar* до мутантів *vermillion*) не призводить до реверсії норми.

На підставі зазначених дослідів було зроблено висновок, що нормальне червоне забарвлення очей дрозофіли виникає внаслідок серії дискретних реакцій і що блокування кожної з них приводить до мутантного фенотипу. Таким чином, появу останнього можна було розглядати як результат uszkodження мутацією того чи іншого ферменту — білка, який каталізує певну стадію біосинтезу пігменту ока. На жаль, шляхи біосинтезу зазначених пігментів у дрозофіли ще досить довго залишалися не з'ясованими, і підтвердити цю думку прямими дослідями на дрозофілі не вдалося.

В 1940 р. Дж. Бідл і Е. Татум скористалися новим підходом до вивчення генетичного контролю біохімічних реакцій. Свої дослідження вони провели на грибку *Neurospora crassa*. Рентгенівським опроміненням були індуковані мутанти нейроспори, не здатні рости на простому штучному середовищі. Було встановлено, що у кожного мутанта блокована певна метаболічна стадія і за кожен таку стадію у штаму дикого типу відповідає один певний фермент. Якщо субстрат метаболізується внаслідок цілої серії біохімічних реакцій, то мутація, що порушує будь-яку з цих реакцій, може блокувати процес у цілому. Про це свідчило накопичення метаболічного попередника тієї сполуки, яка утворюється на блокованій стадії синтезу.

Результати цих досліджень лягли в основу гіпотези «**один ген — один фермент**». Згідно з цією гіпотезою кожен біохімічну реакцію каталізує окремий фермент, за утворення якого відповідає один ген. Мутація в гені може привести до втрати активності відповідного білка. Однак інколи наслідком мутації є не втрата функції, а її зміна. З цих позицій легко пояснюється природа рецесивних мутацій: останні в гомозиготному стані виключають утворення нормального ферменту.

Прямих доказів того, що ген дійсно детермінує структуру білка, прийшлося чекати до 1957 р., коли Дж. Інгрем показав, що серповидноклітинна анемія обумовлена однією заміною в амінокислотному складі β -субодиниці гемоглобіну.

З'ясувалося, що чимало білків (мультимерів) складається із декількох субодиниць. Якщо всі субодиниці білка однакові — це **гомомультимер** і він кодується одним геном. Якщо ж субодиниці білка різні за первинною структурою, то такий білок називають **гетеромультимером**. Цілком зрозуміло, що він кодується не одним

геном, а більшою їх кількістю, бо кожний тип субодиниць гетеромультимера мусить мати власне генетичне визначення. В зв'язку з цими даними гіпотеза «один ген — один фермент» була сформульована в більш загальному вигляді: **«один ген — один поліпептидний ланцюг»**.

Введення в практику генетичних досліджень цис-транс-тесту (функціонального тесту на алелізм) на прикладі *rIII*-області геному фага T4 переконливо показало, що одиниці мутації і рекомбінації менші за одиницю функції, яка була названа **цистроном**. Аналіз даних рекомбінаційного і функціонального критеріїв дав переконливі докази того, що одиницю мутації (**мутон**) і одиницю рекомбінації (**рекон**) можна ототожнити з однією парою нуклеотидів дволанцюгової ДНК, в той час як одиниця функції (цистрон) являє собою досить значний фрагмент молекули геномної ДНК. Вже зазначалося, що термін «цистрон» фактично є синонімом терміну «ген».

З розвитком молекулярної генетики і з'ясуванням механізмів основних генетичних процесів (реплікації, транскрипції, трансляції та інших) структура і функція гена стали більш зрозумілими. Виправдалася гіпотеза, запропонована М. К. Кольцовим, згідно з якою явище спадковості забезпечується функцією макромолекул, яким властива редуплікація, тобто здатність до створення власних копій. Такими молекулами виявилися не білки, як вважав М. К. Кольцов, а генетичні нуклеїнові кислоти (розділи 2 і 3). Основуючись на синтезі даних класичної і молекулярної генетики, ген стали визначати як певну ділянку (фрагмент) молекули генетичної нуклеїнової кислоти, що має специфічну послідовність нуклеотидів і кодує будову одного поліпептидного ланцюга. Це визначення повністю відповідає формулі «один ген — один поліпептидний ланцюг». Однак не всі гени містять кодони, послідовність яких визначає первинну структуру білка. Деякі гени не кодують поліпептидів — це гени рРНК, тРНК, окремих мяРНК та інші.

М. С. Гершензон поділяє всі гени на **структурні** і **акцепторні**. Останні, за М. С. Гершензоном, слугують місцями специфічного приєднання певних білкових молекул, що грають важливу роль у реплікації, транскрипції і регуляції активності структурних генів. Структурні гени кодують різні молекули РНК. Одні з цих молекул (іРНК) є переносниками інформації (про первинну будову поліпептидів) від гена до місця білкового синтезу — рибосом. Інші молекули РНК, що теж є продуктами генів, мають інші специфічні функції (рРНК, тРНК тощо).

Те, що структурні гени реалізують свої функції завдяки синтезу на їх матриці специфічних молекул РНК, знайшло відображення у формулі **«один ген — одна РНК»**. Однак і таке трактування функції

гена з ряду причин виявилось неточним. На це вказують численні дані сучасної молекулярної генетики щодо особливостей організації геномів про- і еукаріотів (розділ 3). Найважливіші факти, які вимагають нового осмислення концепції гена, такі:

1. У складі вірусів і транспозонів відомі гени, що просторово перекриваються (фаги MS2, Q β , ϕ X174, вірус SV40 та ін.). Внаслідок зсуву рамки зчитування поліпептиди, що кодуються перекритими послідовностями, відрізняються один від одного первинною структурою.

2. На одній і тій же ділянці геномної ДНК шляхом ініціації транскрипції в різних стартових точках можливе утворення різних транскриптів.

Прикладом може бути вірус осповакцини, ранні гени якого розташовані групами. Транскрипти з цих генів перекриваються. Характерна ситуація, коли транскрипти мають ідентичні 3'-кінці, але відрізняються довжиною 5'-кінцевої послідовності. Очевидно, що в цих випадках використовуються різні промотори, а іРНК з різною довжиною 5'-кінця можуть обумовлювати синтез різних білків.

3. Багатьом РНК — вмішуваним вірусам властивий шлях розвитку з утворенням у клітині хазяїна не тільки геномних, але й субгеномних (+)РНК різної протяжності. Кожна з таких молекул може нести дещо іншу генетичну інформацію.

4. Відомі випадки, коли перекривання генів поєднується з явищем дивергентної (різноспрямованої) транскрипції на обох комплементарних ланцюгах даної ділянки ДНК, що значно збільшує економічність геному. Аналіз одного із мігруючих генетичних елементів бактерій — IS15 — показав, що один із ланцюгів дуплекса ДНК містить два гени, що перекриваються, а комплементарна до них ділянка іншого ланцюга являє собою третій ген. Таким чином, одна і та ж послідовність нуклеотидів кодує три різних білкових молекули.

5. Наявність екзонів і інтронів у складі більшості еукаріотних генів і можливість альтернативного сплайсингу істотно збільшує кількість різних іРНК, що транскрибуються з однієї послідовності ДНК. Так, наприклад, за експресії гена основного білка мієлінових мембран, які оточують аксон і забезпечують ефективну передачу сигналу на значну відстань, за рахунок сплайсингу утворюється чотири форми цього основного білка. Альтернативний сплайсинг забезпечує різні шляхи експресії генів деяких поліпептидних гормонів, білків йонних каналів, а також ядерних білків, які регулюють функцію генів ключових стадій розвитку.

Ці та інші факти свідчать про те, що одна і та ж ділянка молекули ДНК може нести різну генетичну інформацію залежно від особливостей транскрипції і процесингу. Тому формула «один ген —

одна РНК» є застарілою, так само, як і гіпотеза «один ген — один поліпептидний ланцюг». Вважають, що сьогодні більш відповідає дійсності ситуація «один поліпептидний ланцюг — один ген», або «одна РНК — один ген».

Однак і з цього правила є певні виключення. Вже зазначалося (розділ 12.1.6), що константні і варіабельні ділянки кожного ланцюга імуноглобуліну кодуються принаймні двома типами генів зародкових клітин, які потім шляхом соматичної рекомбінації утворюють спільний ген зрілого лімфоцита.

Таким чином, існуючі сьогодні дані про ген як одиницю функції не можна звести до якого-небудь одного знаменника. Ген виявився набагато складнішим, ніж просто фрагмент молекули генетичної нуклеїнової кислоти, який кодує відповідну молекулу РНК і здатний до мутування і рекомбінацій. Сучасні дані свідчать про те, що ген є подільною одиницею не тільки стосовно структури і мутаційних змін, але й у відношенні функціональних властивостей.

Слід нагадати, що структурний ген включає в себе не тільки фрагмент ДНК, який транскрибується, але й ряд послідовностей, що не транскрибуються, але дуже важливі для експресії гена. Серед них — більша частина промотора з його канонічними послідовностями і ділянками зв'язування РНК-полімерази і регуляторних білків, розташованими в більшості випадків до стартової точки транскрипції (+1).

Функція структурного гена залежить також від коротких незначущих повторів і регуляторних послідовностей, що локалізовані за межами або і в межах цього гена, — мікросателітів, мінісателітів, енхансерів, генів-глушників та інших. Великий вплив на експресію гена виявляє його оточення в хромосомі (**положення гена**), кількість його копій (**доза гена**), загальний стан метаболізму клітини тощо. Можна вважати, що відрізок ДНК або РНК, відповідний геніві, може виконувати свою функцію лише тоді, коли він знаходиться в тісній взаємодії з рештою компонентів генетичного апарату клітини, з системами регуляції на рівні клітини та організму. Г. Д. Бердишев підкреслює, що **ген має системну будову** і успішне вивчення його організації і функції можливе лише за системного підходу до цієї проблеми.

Все зазначене свідчить про те, що, незважаючи на великі успіхи сучасної генетики в розробці проблеми гена, остання потребує подальших досліджень. Проте вже сьогодні можна зробити висновок, що абсолютизація молекулярнобіологічного підходу до вивчення гена, його ізоляція від функцій клітини і організму, недооцінка цілісної, системної організації, як і дискретності гена, може лише зашкодити подальшому прогресу в цій області.

ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ОНТОГЕНЕЗУ

14.1. Онтогенетика. Об'єкти і методи

Розділ генетики, що вивчає генетичні основи індивідуального розвитку (онтогенезу), М. Ю. Лобашов назвав **онтогенетикою**. Це дуже багатобічний розділ, який включає дослідження в галузі генетики гамет, генетичної детермінації і диференціації клітин, становлення статі і певного фенотипу, взаємодії генів, розвитку систем імунітету, генетичних основ онтогенетичної адаптації, певних виявів поведінки і т. п. Відповідні напрями досліджень розвиваються досить самостійно і перетворюються в окремі розділи генетики (генетика статі, феногенетика, імуногенетика, генетика поведінки і т. ін.). Проте всі ці напрями мають спільну мету — з'ясувати, як реалізується генетична інформація зиготи в процесі індивідуального розвитку. Адже із **зиготи** — єдиної клітини, яка з'єднує всі покоління, виникає складний багатоклітинний організм, що може утримувати сотні різноманітних **гісто-** і **цитотипів**. Так, наприклад, тіло дорослої людини містить 10^{15} — 10^{16} клітин, які відносяться до більш ніж 250 різних типів. Частина клітин (**зародкові клітини**) відокремлюється від інших на ранніх стадіях розвитку і дає початок гонадам, які продукують статеві клітини — гамети. Саме гамети містять всю властиву даному виду генетичну інформацію і складають неперервний, потенційно безсмертний зародковий шлях. Соматичні клітини, які виникають із так званих **стовбурових клітин**, можна розглядати як відгалуження від зародкового шляху, які виникають після запліднення і існують лише певний час.

Питання про те, яким чином генетична інформація, характерна для виду, реалізується в процесі індивідуального розвитку і як здійснюється генетичний контроль за виникненням різних тканин та органів з їх різноманітними і дуже складними функціями, є найважливішою проблемою онтогенетики. Успішному вирішенню цієї проблеми дуже допомагає дослідження мутацій, які впливають на ті чи інші етапи розвитку. Виявлено мутації, які контролюють

перші поділи (дробління) зиготи, онкогени, що регулюють ростові процеси, сотні мутацій, що контролюють морфогенез (тобто становлення морфологічних ознак) в онтогенезі. Порівняльне вивчення окремих мутантів, у яких порушені різні стадії онтогенезу, дає науково обґрунтований спосіб аналізу того, як взаємодія різних процесів складається в неперервний процес індивідуального розвитку.

На основі генетичного аналізу який включає в себе схрещування зазначених мутантів, сформульовано численні гіпотези про те, як діють гени, що контролюють розвиток. Однак слід зазначити, що проведення такого аналізу можливе лише на декількох організмах. Цими організмами в першу чергу є лабораторна миша — модель для дослідження розвитку всіх ссавців (і людини), плодова мушка *D melanogaster* і ґрунтова нематода *Caenorhabditis elegans*. Два останніх об'єкти мають ряд переваг. Завдяки багатолітньому (біля 80 років) вивченню дрозофіли, для неї розроблено найбільш вдалі методики дослідження генетичного контролю розвитку. Щодо *Caenorhabditis*, яка стала об'єктом досліджень значно пізніше, то вона має свої переваги, а саме — просту будову і найпростіший шлях розвитку. Дорослі особини нематоди є гермафродитами і складаються лише із 959 соматичних клітин, які утворюються із зиготи внаслідок жорстко контрольованих мітотичних поділів. Виявлено мутації, що впливають на розвиток *Caenorhabditis*, чимало цих мутацій стали предметом вивчення. Однак лівова доля існуючих уявлень про те, як гени контролюють розвиток, отримана завдяки дослідженням на дрозофілі і мишах.

Локус *T* у мишей приковує увагу генетиків завдяки різноманітності виникаючих у ньому мутацій. Рецесивні мутації *t* в гомозиготному стані зупиняють ембріональний розвиток на певних стадіях. Ембріони, гомозиготні по t^{12} , розвиваються до стадії морули, інші алелі *t* в гомозиготному стані блокують наступні стадії розвитку. Гетерозиготи *Tt* являють собою збалансовані летали і дають можливість зберігати мутації *t* для подальшого вивчення. Аналіз комплементарності алелей є одним із основних генетичних засобів з'ясування ролі зазначених алелей в ембріогенезі мишей. Існує гіпотеза, що різні алелі *t* по-різному впливають на антигенні властивості клітинних мембран ембріонів і, отже, на утворення клітинних асоціацій в процесі розвитку.

На жаль, кількість виявлених мутацій, що впливають на розвиток миші, є недостатньою, а складність індивідуального розвитку у ссавців дуже значна. Тому більш помітні успіхи в дослідженні онтогенезу дав генетичний аналіз з використанням численних мутантів дрозофіли, деякі з яких відомі вже десятки років.

Незалежно від об'єкту дослідження вивчення генетики онтогенезу ведеться на різних рівнях — молекулярному, клітинному, а також на рівні організму.

В останні роки великого значення набула так звана **клітинна біотехнологія**, яка використовує методи трансплантації ядер, окремих хромосом, технології клонування клітин та організмів, злиття клітин різного походження тощо. За допомогою цих підходів можна виявити і локалізувати в тій чи іншій хромосомі певний ген, з'ясувати його роль у процесі розвитку, дослідити взаємодію алельних і неалельних генів, а також ядра і цитоплазми в онтогенезі.

Методики із застосуванням рекомбінантних ДНК сьогодні використовують для клонування генів, що грають важливу роль у процесі розвитку.

Незважаючи на різноманітність методів, що застосовуються в онтогенетиці, основними серед них залишаються генетичні, завдяки яким можна отримати різні комбінації генотипів і геномів.

14.2. Деякі загальні закономірності та стадії індивідуального розвитку

В поняття онтогенезу включають **гаметогенез**, а також **процес розвитку**, який розпочинається з акту запліднення яйцеклітини і закінчується смертю організму. Важливо, що ще на стадії визрівання статевих клітин у них здійснюється комплекс генетико-біохімічних перетворень, необхідних для подальшого розвитку, в процесі якого відбувається 1) ріст і **проліферація** (розмноження) клітин, 2) **диференціація** клітин і тканин і 3) **морфогенез**, тобто розвиток органів і систем.

За з'ясування генетичних основ індивідуального розвитку необхідно враховувати деякі узагальнення, які витікають із результатів досліджень у різних галузях біології (ембріології, генетиці, фізіології, біохімії та ін.):

1. *Онтогенез багатоклітинних організмів являє собою складну послідовність змін, що контролюються генами.* Це регульована реалізація в конкретних умовах **генетичної програми** розвитку, яка міститься в цитоплазмі і генотипі зиготи.

2. *Кожний організм в ембріогенезі в тій чи іншій мірі проходить фази розвитку, характерні для його предків,* що свідчить про генетичну зумовленість загального плану розвитку організмів і про спільність походження різних видів (**біогенетичний закон** Е. Геккеля).

3 В основі індивідуального розвитку багатоклітинних організмів лежить **генетична детермінація і диференціація** окремих клітинних клонів, що виникають внаслідок дробління зиготи і подальших мітотичних поділів

Диференціація — це набуття клітинами здатності до виконання специфічних функцій, пов'язаних з їх спеціалізацією. Щодо **генетичної детермінації** клітин, то вона настає ще до диференціації і являє собою стадію розвитку, після якої клітина втрачає здатність диференціюватися у напрямку, не передбаченому генетичною детермінацією

4 Характерні для розвитку **процеси росту, диференціації і морфогенезу** є нерівномірними в період росту переважають процеси, що сприяють мітотичній активності клітин (проліферації), а диференціація і морфогенез здійснюються на тлі високої активності інших генів, які забезпечують синтез специфічних білків, необхідних для формотворчих процесів і інтеграції спеціалізованих клітин. **Ріст і проліферація клітин зумовлюються функцією так званих загальноклітинних генів** (або «генів домашнього господарства»), а **диференціація і морфогенез — активністю тканинноспецифічних генів** (або так званих «генів роскоші»)

5 Диференціація соматичних клітин і тканин може бути зворотною і незворотною залежно від ступеня генетичної спеціалізації ядер і цитоплазми в клітинах. Буває, що окрема клітина або група клітин диференційованої тканини зберігають здатність шляхом зворотної дедиференціації і наступної нової диференціації відтворити цілісний організм або певну його частину. **Здатність клітин до такого зворотного диференціювання називають тотипотентністю**. Соматичні клітини, що пройшли певний критичний рубіж своєї диференціації, втрачають тотипотентність і не здатні до відтворення організму та його частин

6 В онтогенезі рослин і тварин існують так звані **критичні періоди**, які, як правило, випадають на час інтенсивної ембріональної диференціації або вираженого морфогенезу. В ці періоди виявляється найбільша чутливість організмів до дії зовнішніх чинників, з допомогою яких можна викликати характерні в основному лише для даної стадії розвитку зміни (мутації, фенкопії мутацій, морфози). У різних організмів, що знаходяться в одному і тому ж критичному періоді розвитку, з допомогою ушкоджуючих агентів можна викликати, як правило, однотипні мутації та морфози. Це вказує на **диференційну активність генів** на різних стадіях онтогенезу

7 **Детермінація і диференціація клітин в абсолютній більшості випадків не пов'язані з кількісними або якісними змінами геномів і ґрунтуються значною мірою на епігенетичній спадко-**

вості. Суть її полягає в постійному відтворенні в ряду поколінь соматичних клітин такої надмолекулярної регуляції функцій хромосом, яка дозволяє експресуватися суворо визначеним наборам генів у кожному типі клітин.

Онтогенез багатоклітинних організмів умовно поділяють на такі основні періоди:

а) **гаметогенез,**

б) **ранній ембріогенез** — дробління зиготи і проліферація клітин з моменту запліднення до перших виявів диференціації і морфогенезу;

в) **пізній ембріогенез** — процеси диференціації клітин, гісто- і органогенезу;

г) **постембріональний розвиток,** під яким розуміють всі більш пізні етапи онтогенезу аж до старіння і смерті.

За винятком гаметогенезу всі ці періоди важко розмежувати у часі, тому поділ неперервного процесу розвитку на зазначені періоди є дуже умовним, але вкрай необхідним для дослідницької роботи.

14.3. Генетична детермінація і диференціація клітин. Тотипотентність

В основі розвитку лежить генетична детермінація і диференціація соматичних клітин. *Різні тканини відрізняються станом хромосом, функціональною активністю окремих генів, а нерідко й кількісним складом хромосомних наборів у клітинах.* Саме тому диференційовані тканини одного і того ж багатоклітинного організму істотно відрізняються біохімічним складом і відповідно своїми функціями.

Слід зазначити, що перші продукти дробління зиготи (бластомери) морфологічно і за своїми потенційними можливостями можуть істотно не відрізнятися; помітні відмінності між клітинами виявляються у пізніші строки ембріонального розвитку.

Відомо, наприклад, що у морського їжака перші два бластомери, які утворюються після поділу зиготи, є генетично ідентичними: з кожного такого бластомера можна отримати окремий організм.

Проте слід враховувати, що цитоплазма і поверхневий шар яйцеклітини (кортекс) у більшості видів виявляють функціональну зональність. В яйці дрозофіли розрізняють анімальну зону, із якої

утворюється ектодерма, зону «сірого серпа», де закладається мезодерма, і вегетативну — попередника ендодерми. Отже, в більшості випадків яйцеклітина виявляється диференційованою ще до запліднення. Після запліднення ця диференціація стає ще більш виразною.

Бластомери, що виникають внаслідок мітотичних поділів зиготи, утримують однакові геноми, однак різняться за складом кортексу і цитоплазми. Це обумовлює в подальшому зчитування різних генів в окремих бластомерах, отже визначає напрямок диференціації клітин.

Процес диференціації, тобто здатності клітин розвиватися лише у певному напрямку (наприклад, в епітеліальні клітини, в нервові та інші), розпочинається в ранньому ембріогенезі і поступово зужує кількість можливих перетворень цих клітин до однієї або дуже небагатьох диференційованих форм. Диференційований стан клітин досить стабільний і успадковується їх нащадками. Кінцева диференціація часто супроводжується втратою здатності клітин до розмноження. Отже, активна проліферація і диференціація — процеси малосумісні. Нервові клітини ссавців поділяються востаннє в ембріональному і ранньому постембріональному періодах, а клітини нервових гангліїв дрозоді — на стадії личинки. В проліферуючих тканинах клітини диференційовані в різній мірі. Так, наприклад, камбіальні відділи епітелію кишечника, які знаходяться в криптах, містять клітини, що мають невисокий ступінь диференціації в порівнянні з клітинами епітелію верхівки ворсинок. Однак з недиференційованих клітин криптів можуть виникати лише епітеліальні клітини кишечника, що свідчить про високий рівень їх генетичної детермінації.

Для пояснення причин процесу диференціації було запропоновано дві основні теорії:

а) **теорія нерівномірного розподілу** спадкових детермінантів серед бластомерів зародка (**теорія мозаїчного розвитку**);

б) **теорія однакових генетичних потенцій** усіх бластомерів (теорія **еквіпотенціальності** клітин або **регуляційного типу розвитку**).

Думка про те, що мітотичні поділи зиготи є нерівнозначними відносно розподілу генетичних детермінантів між бластомерами, належить А. Вейсману. На користь цієї концепції, тобто теорії мозаїчного розвитку, свідчать такі безперечні факти:

1) у кінської аскариди та деяких інших видів безхребетних у процесі розвитку спостерігається **демінуція** хроматину, тобто втрата клітиною частини геному, що не потрібна для даного напрямку диференціації;

2) у деяких видів розподіл генетичного матеріалу між тотипотентними статевими клітинами і соматичними клітинами здійснюється нерівномірно,

3) у багатьох видів (наприклад, у асцидій *Styela*) спостерігається нерівномірний розподіл морфогенних детермінантів (активаторів, репресорів, деяких іРНК) по об'єму яйцеклітини, а, отже, зиготи і бластомерів,

4) в процесі розвитку і диференціації клітин можливі незворотні локальні зміни і перебудови генетичного матеріалу (делеції коротких послідовностей типу ТАТА-боксів, окремі транспозиції, транслокації тощо)

Дані цитогенетики вказують на те, що у переважної більшості організмів, у яких димінуція відсутня, каріотиби різних за функцією клітин однакові. Цитофотометрично ці клітини не відрізняються кількістю ДНК, а молекулярна гібридизація нуклеинових кислот свідчить про ідентичність спектрів нуклеотидних послідовностей у клітинах різних типів. Отже, якщо і є організми, у яких гени і їх продукти нерівномірно розподіляються між клітинами в період дробління зиготи, то цей феномен не є універсальним. Ембріональні клітини вищих еукаріотів, наприклад амфібій і людини, до стадії принаймні восьми бластомерів є тотипотентними, завдяки чому ембріони цих організмів називають регуляторними. Є і такі організми (приклад — морський іжак), ембріони яких іноді важко віднести до чисто регуляторних чи мозаїчних.

Один із прямих доказів еквівалентності клітин амфібій і ссавців є демонстрація тотипотентності шляхом трансплантації ядра із диференційованої соматичної клітини в яйцеклітину з вилученим власним ядром. Добре відомий дослід Дж. Гердона, який продемонстрував можливість розвитку південноафриканської жаби *Xenopus laevis* на основі генетичної інформації ядра соматичної клітини. В цьому досліді власні ядра незапліднених яйцеклітин руйнували ультрафіолетовим опроміненням, а потім у кожне із яєць вводили ядро із клітин кишкового епітелію пуголовка. В окремих випадках із таких штучно сконструйованих клітин розвивалися дорослі жаби. Для доказу того, що в розвитку приймало участь саме трансплантоване ядро, а не власне ядро яйцеклітини, яке могло і зберегтися після опромінення, використовували цитологічне маркування за кількістю ядерця у ядрі. Яйцеклітини отримували від особин, що мали два ядерця в ядрі кожної клітини. Донором ядер була особина, гетерозиготна по делеції ядерцевого організатора, і тому кожне клітинне ядро утримувало лише одне ядерце. Всі ядра в клітинах, отриманих внаслідок трансплантації в яйцеклітину чужого ядра, мали лише одне ядерце, що переконливо свідчило на

користь чистоти проведеного експерименту. Отже, можна вважати, що інформація, необхідна для нормального розвитку, за мітотичних поділів ядром соматичної клітини не втрачається і може бути використана для повторного процесу розвитку.

Спроби клонування ссавців за рахунок генетичної інформації ядер соматичних клітин довгий час були марними. Сенсаційним стало повідомлення групи вчених, які під керівництвом Яна Уілмута (Шотландія) у 1997 р. отримали копію вівці за кличкою Доллі шляхом пересадки ядра її соматичної клітини в енуклеювану яйцеклітину цієї вівці. Така штучно отримана клітина після введення її в матку гормонально підготовленої вівці реципієнта поділялася, як нормальна зигота. Це призвело до народження ягняти, яке за генотипом не відрізнялося від вівці донора ядра.

Подібне клонування сільськогосподарських та інших тварин сьогодні стає буденною справою і має велике практичне значення. Щодо клонування людини, то в технологічному відношенні воно стало цілком можливим, проте стикається з рядом етичних і психологічних проблем. Гарантувати відтворення індивідуальної особистості клону дуже важко, бо інтелект і все, що з ним пов'язане, принаймні на 50% залежить від умов життя та виховання. Слід зважити і на те, що реалізація потенційних можливостей ядерних генів певною мірою може залежати від особливостей цитоплазми яйцеклітини реципієнта та досконалості технології клонування.

Варто зазначити, що клонування сільськогосподарських тварин вже давно здійснюється штучним поділом раннього зародка на частини з наступним вирощуванням із них монозиготних близнюків.

Оскільки ембріональні клітини теплокровних тварин є генетично детермінованими, то це можна використати для отримання органів та тканин, необхідних для трансплантації в ветеринарії та медицині. Все більшого значення набуває розробка технології вирощування спеціалізованих тканин та органів із ізольованих стовбурових клітин, генетично детермінованих на певний тип диференціювання. Цим способом можна отримувати гістосумісний матеріал для трансплантацій без клонування самих організмів і без отримання монозиготних близнюків.

Відомо, що контроль первісних етапів диференціації клітин визначається позаядерними компонентами яйцеклітини, які накопичуються у ній в процесі оогенезу. Деякі із таких компонентів — наприклад, детермінанти зародкових клітин дрозофіли — ідентифіковані. Визначена їх локалізація в яйці, встановлено, що вони поступають лише в клітини майбутньої генеративної лінії.

У дрозофіли зазначені клітини походять від **полярних клітин** (рис. 14.1), які утворюються в задній частині яйця перед формуван-

ням клітинної бластодерми. На цій стадії деякі із ранніх ядер дробління мігрують у задню частину яйцеклітини, де є специфічні детермінанти полярних клітин. Існування цих детермінантів було показано дослідями, в яких ооплазму задньої частини яйця вводили в передній кінець інших яйцеклітин. За цих умов виникав ембріон, що мав полярні клітини як на задньому, так і на передньому кінці. Під час гастрюляції, коли розпочинається впорядкований рух клітин, полярні клітини мігрують у середину ембріона, нащадки цих клітин приймають участь в утворенні гонад і гамет дорослих мух.

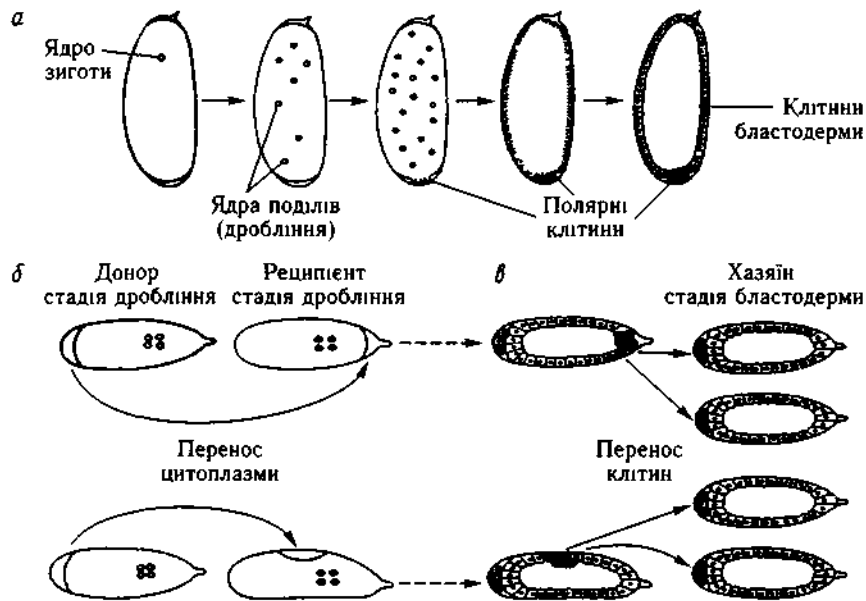


Рис. 141. Формування полярних клітин за поділів дробління ядра зиготи у дрозофіли (а) виникнення цих клітин в аномальних місцях бластодерми за введення в ці місця цитоплазми задньої частини яйця (б). Пересадка індукованих полярних клітин у дорсальний відділ бластодерми забезпечує їх нормальну функцію — розвиток із них зародкових клітин (в).

Контрольні дослідження показують, що ооплазма, взята не з задньої, а з інших частин яйцеклітини, за трансплантації не призводить до утворення полярних клітин.

Детермінація соматичних клітин зародка, тобто вибір ними певного шляху розвитку, здійснюється іншим способом, ніж детермінація полярних клітин. Головну роль в їх диференціації грає просторове розташування клітин ембріона. Останні використовують

так звану **позиційну інформацію**, яка виникає ще в яйцеклітині за рахунок градієнтів концентрації певних сполук (морфогенів).

Морфогени — це детермінанти та індуктори, які кодуються спеціальними генами і забезпечують формотворчі процеси за розвитку ембріона. Один із таких морфогенів — продукт гена *hedgehog* — відповідає за детермінацію полярності сегментів ембріона дрозофіли.

Морфогени накопичуються вже в яйці дрозофіли, в цьому випадку вони є продуктами генів материнського організму. Крім морфогенів, які регулюють експресію генів клітин ембріона, в яйцеклітині накопичуються також про запас синтезовані іРНК, тРНК та ін. Все це обумовлює **генетичну предетермінацію цитоплазми**

(розділ 10.3), завдяки якій дробління зиготи та ранній ембріогенез здійснюються з виявом материнського ефекту.

Незважаючи на те, що ядра клітин на стадії бластодерми опиняються в неоднакових умовах з причини гетерогенності хімічного складу різних областей ооплазми, в більшості випадків це не викликає незворотних змін у генетичній інформації хромосом. Досліди свідчать, що *основним механізмом розвитку соматичних клітин є диференційна, тобто різна у просторі і часі, експресія генів.*

Висока тотипотентність соматичних клітин рослинних організмів надає великі можливості для дослідження диференційної активності генів в онтогенезі. Цілі рослини можуть регенерувати із клітин калюса, отриманого шляхом культивування *in vitro* соматичних клітин і тканин, особливо клітин меристеми або флоєми, що мають найбільшу тотипотентність і добре розмножуються (рис. 14.2). За досить тривалого культивування недиференційовані клітини калюса іноді дають початок окремим органам рослини або навіть повністю всій рослині (**регенерація**) завдяки так званому **соматичному ембріогенезові**, як його назвав Б. П. Токін. Регенерація цілих організмів шляхом соматичного ембріогенезу влас-

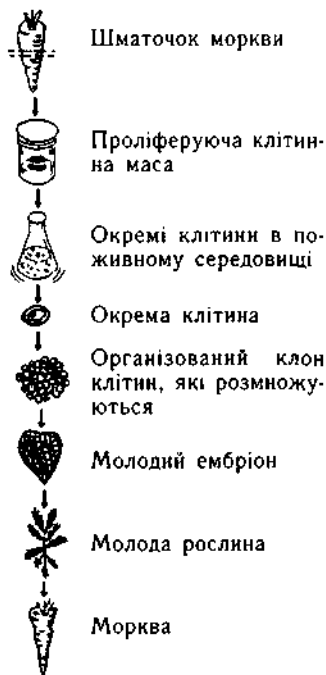


Рис. 14.2. Приклад соматичного ембріогенезу як доказ тотипотентності диференційованих клітин флоєми моркви

Регенерація цілих організмів шляхом соматичного ембріогенезу влас-

тива не тільки рослинам, але й деяким іншим організмам — губкам, кишковопорожнинним, нематодам та ін.

Порівнюючи спектри ізозимів, наприклад пероксидази, в недиференційованій калюсній тканині і в диференційованих клітинах регенерантів, можна отримати важливу інформацію про механізми забезпечення диференційної експресії генів.

14.4. Диференційна активність генів і її регуляція в процесі розвитку

Диференційна активність генів обумовлюється регуляцією їх експресії зовнішніми сигналами. Існує чимало механізмів, з допомогою яких один і той же набір генів на різних стадіях розвитку і в різних умовах життєдіяльності організму детермінує синтез різних білків і в різній кількості. Регуляція експресії генів може здійснюватися на рівні будь-якого матричного процесу: реплікації, транскрипції, трансляції, а також таких нематричних процесів, як рекомбінація, дозрівання синтезованих іРНК і поліпептидних ланцюгів тощо. Молекулярні механізми цих найважливіших генетичних процесів добре з'ясовано (розділи 4—6); зараз необхідно звернути увагу на роль кожного з них у регулюванні експресії генів за розвитку.

Диференційна реплікація забезпечує зміну якості та кількості генів, що контролюють розвиток певних ознак. Прикладом даного типу регуляції є ампліфікація генів рРНК, яка спостерігається в ядерцях ооцитів багатьох тварин, а також за мегаспорогенезу в рослинному світі. Це значно прискорює синтез рибосом в ооциті, необхідних для ранніх етапів розвитку. У *Xenopus laevis* по закінченні ампліфікації вміст рДНК в яйцеклітині майже дорівнює кількості ДНК у диплоїдному наборі хромосом.

Про те, що реплікація в різних соматичних клітинах здійснюється диференційовано, свідчить факт утворення політенних хромосом лише в деяких типах клітин організмів. Відомо також, що в окремих ділянках гігантських хромосом слинних залоз двокрилих спостерігається різний ступінь політенізації. Важливість диференційної реплікації для процесу розвитку підтверджується і тим, що розміри репліконів на різних етапах диференціації клітин істотно змінюються.

Диференційна транскрипція генів в онтогенезі забезпечує зміни кількісного і якісного складу іРНК, необхідні на кожній стадії розвитку. В цьому легко переконатися, спостерігаючи за утворен-

ням профазних хромосом типу лампових щіток, які можна бачити на електронномікроскопічних препаратах ооцитів амфібій і птахів. По локалізації структур типу лампових щіток можна розпізнати активно функціонуючі гени ооцитів, а в окремих випадках — і деякі гени інших клітин. Оскільки хромосоми типу лампових щіток виникають у диплонтені мейозу, вони складаються із чотирьох хроматид, і кожна ділянка таких хромосом представлена чотирма петлями.

Петля — це ділянка ДНК з інтенсивною транскрипцією. В кожній з них можна знайти тонкий кінець, де розпочинає свій рух РНК-полімераза, і товстий кінець, де транскрипція закінчується (див. рис. 2.16).

Щойно синтезована РНК має вигляд гранул або фібрил, що оточують випетлену ДНК. З'ясовано, що в ооцитах тритонів кількість петель у хромосомах типу лампових щіток приблизно дорівнює кількості типів іРНК цитоплазми яйця. Більша частина цих іРНК не зв'язана з рибосомами і використовується лише після запліднення. Запаси іРНК в яйцеклітині поповнюються, крім того, молекулами іРНК, які проникають із клітин яєчника. Через це у нащадків можуть виявлятися деякі ознаки, що не обумовлені ні генами яйця, ні сперматозоїда, але були властиві гетерозиготній матері.

В зрілих статевих клітинах генетична інформація повністю блокована і не транскрибується. В цитоплазмі зрілого яйця містяться репресори транскрипції: пересадка в незапліднену енуклеювану яйцеклітину ядра соматичної клітини, як правило, призводить до зупинки в ньому транскрипції, яка до цього була досить активною. Репресія транскрипції в сперматозоїді є, очевидно, наслідком тісної взаємодії його ДНК з білками протамінами.

За запліднення здійснюється взаємна дерепресія геномів матері і батька внаслідок так званої ембріональної індукції, проте реалізація інформації генів зиготи розпочинається значно пізніше.

Перші поділи (дробління) зиготи обумовлюються виключно інформацією, що міститься у цитоплазмі. При цьому реплікується ДНК, йде активний синтез білка за рахунок отриманого із яйця запасу рибосом і РНК, але нові молекули РНК не синтезуються. Відомо, що в ембріогенезі жаб синтез іРНК, заблокований в кінці оогенезу, відновлюється лише після десяти поділів (дробління) зиготи, тобто посеред стадії бластули, коли зародок містить вже більше 1000 клітин; синтез тРНК розпочинається в кінці стадії бластули, а рРНК і нові рибосоми вперше утворюються тільки на стадії гастрული. В ембріогенезі мишей синтез різних типів РНК здійснюється значно раніше — на стадії 2—4 бластомерів, але і в цьому випадку перші стадії розвитку зародка спочатку виключно, а потім головним чином забезпечуються інформацією, отриманою

від матері через цитоплазму яйця у складі інформосом та інших молекулярних структур. Встановлено, що зиготи амфібій і безхребетних тварин з вилученими ядрами здатні нормально розвиватися до стадії бластули.

Експресія генів батьківського геному здійснюється дещо пізніше, ніж материнського; у мишей це відбувається на стадії бластули.

На перших стадіях ембріогенезу (у амфібій — до пізньої бластули) реалізується головним чином та частина генетичної інформації, що має відношення до загальних процесів метаболізму, властивих всім проліферуючим клітинам. Потім відбувається поступова дерепресія тканинносцифічних генів, тобто розпочинається диференціація клітин зародка. На стадії гастрული і пізніше відокремлюються так звані стовбурові клітини, клони яких дають початок різним тканинам і органам. Ці перетворення здійснюються шляхом диференційного зчитування генетичної інформації хромосом, а в деяких випадках — ще й шляхом незворотних перебудов генетичного матеріалу.

Існують надійні критерії визначення активних і неактивних ділянок геному в еукаріотних клітинах. Відомо, що активно функціонуючі гени відносяться до ДНК з неметильованими CCGG-послідовностями. Рестриктаза Нра II розрізає послідовності CCGG за умови, що другий атом С у цій послідовності не метильований. Іншими словами, фермент Нра II розрізає послідовності CCGG у складі активних генів, але не займає їх в неактивних (метильованих) ділянках геному. Тому, щоб виявити активні гени, проводять скринінг ДНК на неметильовані «С-островки» з допомогою Нра II.

Крім того, активні гени набагато чутливіші до ДНКазі I, ніж звичайний хроматин. Явище підвищеної чутливості до ДНКазі I розповсюджується на сотні та тисячі пар основ, оточуючих активний ген. Інше явище — надчутливість до ДНКазі I — спостерігається в тих місцях ДНК, де відсутні нуклеосоми.

Можливо, надчутливість пов'язана з фазуванням нуклеосом і має відношення до механізмів регуляції активності генів.

Цитологічним показником диференційної активності генів на різних стадіях розвитку соматичних клітин слугує явище **пуфінгу** (набухання) політенних хромосом (розділ 2.3.2). Простежуючи стан окремих дисків гігантських хромосом у клітинах слинних залоз двокрилих (хірономуса, дрозофіли), дослідники виявили, що поява та зникнення пуфів відображують відповідно включення або виключення транскрипції певних генів. Легко переконатися, що на різних стадіях розвитку дрозофіли пуфи виявляються і зникають у різних ділянках політенних хромосом, а також у тому, що цей процес регулюється гормонами і залежить від умов існування мух. Так,

наприклад, за впливу стероїдного гормону екдизону можна спостерігати появу пупків у тих місцях хромосом, де знаходяться гени білків, необхідних для процесу линяння.

Таким чином, **гормони** можна вважати факторами, відповідальними за переключення експресії певних генів в онтогенезі і за зміну фаз і стадій індивідуального розвитку еукаріотів. Особливо важливою в цьому відношенні вбачається роль стероїдних та інших гормонів у вищих тварин. Окремі гормони активують гени не в усіх клітинах, а тільки в **клітинах-мішенях**, які містять спеціальні білки — **рецептори** для відповідного гормону. Утворення комплексу «гормон—рецепторний білок» здійснюється, як правило, в цитоплазмі, а потім цей комплекс взаємодіє в ядрі з певними ділянками ДНК, які називаються **гормон-чутливими елементами**. В ролі останніх найчастіше виступають **енхансери** — підсилювачі експресії генів. Комплекс «гормон-рецепторний білок» приєднується до сусіднього з геном енхансера, і це супроводжується активацією відповідного гена.

Прикладом може бути рецептор ретіноевої кислоти (РК) — гормона, дуже важливого для процесу розвитку. Цей рецептор приєднується до специфічної ділянки ДНК — гормон-чутливого елемента. Пізніше до цього комплексу приєднується РК, і це стимулює сусідній ген. З'ясовано, що разом з іншими гормонами РК регулює активність надзвичайно важливих для розвитку генів, серед яких — ген гормону росту, що функціонує в епітуітарних клітинах гіпофіза. Продукт цього гена стимулює ріст тварин до і після народження. Функція гена активується також тиреоїдними гормонами, рецептори яких здатні приєднуватися до тих же послідовностей ДНК, з якими взаємодіє РК. Не виключено, що рецептор тиреоїдних гормонів і рецептор ретіноевої кислоти утворюють димер і разом приєднуються до енхансера, виявляючи синергічний вплив на активність гена гормону росту.

Інший приклад сумісної дії гормонів в онтогенезі — регуляція активності гена остеокальцину, продукт якого необхідний для поглинання кальцію кістками в процесі їх розвитку. Цей ген одночасно стимулюється як ретіноевою кислотою, так і вітаміном D₃, причому білки-рецептори цих гормонів приєднуються до одних і тих же енхансерів. Саме у такий спосіб ці два гормони спричиняють диференціацію незрілих клітин-остеобластів у зрілі клітини кісток. Ген остеокальцину регулюється також ще двома білками, які утримують недиференційовані остеобласти у стані постійного поділу. Ці білки — продукти генів *jun* і *fos* — конкурують з рецепторами РК і вітаміну D₃ за одні і ті ж енхансери, однак викликають протилежний ефект, гальмуючи диференціацію остеобластів. Мутації в генах

jun і *fos* спричиняють стимуляцію росту клітин аж до перетворення їх у злоякісні.

Слід зазначити, що в протилежність іншим гормонам, ретіноева кислота виявляється активною майже в усіх типах клітин. Відомі принаймні три різних рецептори цього гормону у хребетних тварин, і один із них — α -рецептор — є майже повсюдним. Цей факт добре узгоджується з думкою про фундаментальну важливість ретіноевої кислоти як морфогена в процесі розвитку.

Важливо підкреслити, що рецептори різних гормонів є білками — продуктами генів, функціонування яких є ознакою певного ступеня диференціації клітин. Подальша диференціація цих клітин, пов'язана з активацією нових генів, неможлива без гормональних впливів і, отже, без функціонування генів рецепторів. Вважають, що комплекс «гормон-рецепторний білок» знімає блокуючу дію негістонового білка-репресора, внаслідок чого включається транскрипція конкретного гена або групи генів. За такою ж приблизно схемою здійснюється регуляція транскрипції циклічними нуклеотидами та іншими сполуками.

Стосовно еукаріотів важливо з'ясувати механізми координації експресії генів, які знаходяться в різних локусах хромосом, але разом обумовлюють певний фенотип. Можливо, що в тих випадках, коли необхідна координована регуляція розкиданих у геномі генів, у кожному локусі функціонує один і той же регуляторний елемент.

Для тих випадків, коли в геномі існує лише одна копія гена, а його експресія необхідна в різних ситуаціях, постулюють наявність для одного і того ж гена численних регуляторних елементів, кожен з яких може незалежно забезпечити транскрипцію. Отже, якщо ген експресується за різних обставин у комбінації з різними іншими генами, то в його регуляції, можливо, приймають участь різні регуляторні елементи.

Ця загальна схема координації функцій різних генів у еукаріотів була деталізована в моделі Р. Бріттена і Е. Девідсона (рис. 14.3). В зазначеній моделі позитивну регуляцію активності структурного гена забезпечує безпосередньо примикаючий до нього **рецепторний сайт**. Останній може взаємодіяти з молекулою **активатора**, яка є продуктом **гена-інтегратора** і являє собою РНК або білок. Ген-інтегратор у цій моделі є аналогом бактеріального гена-регулятора з тією, однак, різницею, що ген-інтегратор сам підлягає зовнішній регуляції. Остання стає можливою завдяки наявності у гена-інтегратора **сенсорного сайту**, який може взаємодіяти з хімічними сполуками, здатними регулювати функцію генів (наприклад, з білками-рецепторами гормонів).

Якщо декілька або багато локусів-мішеней мають однакові рецептори, то один і той же активатор може контролювати роботу багатьох генів. Сукупність розкиданих у геномі генів, що мають однакові рецепторні сайти, у випадку бактерій названа **регулоном**, у еукаріотів вони утворюють так званий **набір генів**. Є підстави вважати, що до складу останнього входять гени білків із близькими функціями, наприклад, гени ферментів одного метаболічного шляху.

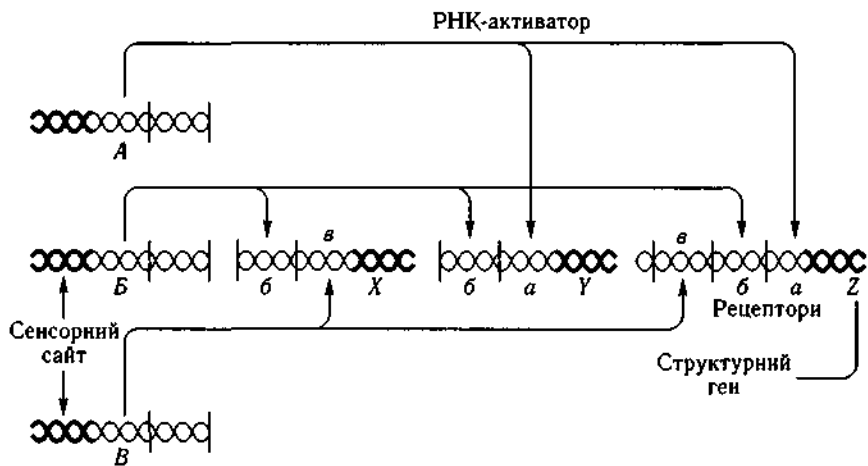


Рис. 14.3. Схема координації функцій різних структурних генів у еукаріотів за Р. Бриттенем і Е. Девідсоном.

X, Y, Z — структурні гени; A, Б, В — гени-інтегратори; a, б, в — рецепторні сайти структурних генів.

Структурний ген може експресуватись у різних умовах, якщо він має більш ніж один рецепторний сайт. У цьому випадку ген одночасно належить декільком наборам, як показано на рис. 14.3. В залежності від ступеня повторності рецепторів кожний із зображених на рисунку трьох структурних генів (X, Y, Z) відноситься принаймні до двох із трьох показаних наборів генів, які частково перекриваються.

Запропоновано ще один механізм регуляції структурних генів, який передбачає утворення в клітині молекул РНК-репресорів з оберненою (антизмистовною) послідовністю нуклеотидів. Такі РНК можуть регулювати транскрипцію у тому випадку, коли ген орієнтований протилежно положенню промотора, але може зчитуватись ще й з іншого промотора у прямому напрямку.

Диференційна трансляція як механізм регуляції генної активності полягає в тому, що синтез білка здійснюється в клітині лише на певних молекулах іРНК або регулюється на одній і тій же молекулі іРНК. Так, наприклад, незапліднені яйця морського їжака містять велику кількість нетрансльованої іРНК у вигляді рибонуклеопротеїдних комплексів — **інформосом**. Ці молекули починають транслюватися лише тоді, коли виникає потреба у відповідних білках.

Диференційна трансляція виявлена у РНК-бактеріофагів, а також за синтезу глобінів на стабільних РНК без ядерних ретикулоцитів ссавців. В останньому випадку з'ясовано, що надлишок геміну стимулює синтез α - і β -ланцюгів глобіну. В дослідях на цих же клітинах Г. Стентом показано, що певні тРНК можуть виконувати роль модуляторів, які визначають темп трансляції іРНК за наявності в останніх деяких унікальних кодонів.

Істотний вклад у з'ясування ролі тРНК у регуляції транскрипції та трансляції внесли українські вчені (Г. В. Єльська та інші). Специфічна регуляція трансляції іРНК у цитоплазмі може здійснюватися також за допомогою білкових факторів. Саме такий механізм виявлено в деяких ембріональних клітинах. При цьому блокується ініціація трансляції деяких інших іРНК.

Диференційне дозрівання продуктів транскрипції і трансляції для процесів розвитку має не менше значення, ніж диференційна реплікація і транскрипція.

Дозрівання транскриптів включає в себе **модифікацію** («редагування») їх пуринових і піримідинових основ, **альтернативний сплайсинг** та ін. (розділ 6.1.4). Коливання стабільності молекул РНК або ефективності їх процесингу можуть мати велике значення для регулювання відносної кількості певних іРНК після їх транспорту із ядра в цитоплазму. Основні відмінності щодо складу іРНК на різних стадіях розвитку мають скоріше кількісний, ніж якісний характер. В проліферуючих клітинах міститься більше іРНК, ніж у клітинах у стані спокою. Однак в обох типах клітин не спостерігається значних відмінностей у швидкості транскрипції і в накопиченні гетерогенних ядерних РНК (гяРНК). Вважають, що змінюється в основному ефективність перетворення полі(А)⁺-гяРНК в полі(А)⁺-іРНК. В клітинах, що знаходяться у стані спокою, ці перетворення менш ефективні.

Досліди на морських їжаках свідчать, що в ядрах клітин кишечника утримуються в основному ті ж іРНК-попередники, що і в клітинах бластули, однак вони не підлягають процесингу, не утворюють зрілої іРНК і не виходять у цитоплазму. В протилежність цьому в клітинах бластули із цих попередників утворюються зрілі

іРНК, і це призводить до експресії відповідних генів. Можливо, що в процесі розвитку еукаріотних організмів регуляція експресії генів на рівні транскрипції здійснюється для відносно невеликої кількості генів; загалом переважає **добір транскриптів для процесингу і транспорту** із ядра в цитоплазму залежно від напрямку диференціювання клітин.

Не менш важливим для розвитку є посттрансляційний рівень регуляції експресії генів, який здійснюється шляхом **біохімічної модифікації** (фосфорилування, метилування, ацетилювання та ін.) синтезованих поліпептидів, а також розщеплення різних білків-попередників на їх кінцеві функціонально активні продукти. Так, наприклад, із синтезованого в клітинах підшлункової залози преінсуліну після відщеплення від нього пептидів утворюється гормон інсулін.

Протеолітична модифікація первинних пептидів, що отримала назву **обмеженого протеолізу**, в живій природі дуже розповсюджена. Дуже важливим є обмежений протеоліз, що здійснюється в процесі синтезу деяких білків у еукаріотів. Він полягає у вилученні приблизно 20 амінокислот на N-кінці синтезованого білка. Ця частина білкової молекули, так званий **сигнальний пептид**, виконує роль «якоря», який утримує наростаючу молекулу білка і відповідну полісому на мембрані ендоплазматичного ретикулула. Крім того, в окремих випадках сигнальний пептид слугує «голкою», необхідною для проникнення синтезованого білка в середину структур ендоплазматичного ретикулула, після чого сигнальний пептид відокремлюється, а вкорочений білок транспортується до апарату Гольджі.

Інший варіант обмеженого протеолізу виявляється за синтезу так званих **поліпротеїнів**. Цей термін вперше був використаний для найменування поліфункціональних продуктів РНК-геномів вірусів. Декілька вірусних білків синтезуються у вигляді спільного попередника, який потім розщеплюється в певних місцях з утворенням індивідуальних функціонально активних продуктів.

Така ж ситуація спостерігається в еукаріотних клітинах, у яких внаслідок одного акту трансляції може синтезуватися попередник декількох білків або поліпептидів. Прикладом може бути ген проопіомеланокортину (ПОМК). У двох різних тканинах, в яких експресується ген ПОМК, розщеплення попередника трипсиноподібними протеазами здійснюється в різних місцях.

У передній долі гіпофізу в білок ПОМК спочатку вноситься один розтин, внаслідок якого утворюється N-кінцевий фрагмент і β -ліпотропін (C-кінцевий фрагмент). Потім N-кінцевий фрагмент розщеплюється з утворенням адренкортикотропного гормону

(АКТГ), і на цьому в зазначеній тканині обмежений протеоліз завершується.

В проміжній долі гіпофізу АКТГ розпадається далі, утворюючи α -меланотропін (α -МСГ), а β -ліпотропін розщеплюється з утворенням аналгетика β -ендоморфіну.

Крім цих добре відомих гормонів, за протеолізу ПОМК виникають ще дві послідовності, які потенційно можуть виявляти меланоцитстимулюючу активність і тому отримали назву β -МСГ і γ -МСГ.

Наведені дані вказують на те, що один ген навіть у відсутність альтернативного сплайсингу може кодувати продукти з різними амінокислотними послідовностями шляхом **варіабельного процесингу** білка-попередника. Важливо й те, що наявність численних копій і алелів генів, кодуючих протеїни у еукаріотів, може призводити до того, що один і той же білок в різних типах клітин може синтезуватися сумісно з різними іншими білками. Доведено, що в різних типах клітин можуть експресуватися різні копії даного гена.

14.5. Взаємодія генів у процесі розвитку

Становлення певного фенотипу в онтогенезі є наслідком не тільки диференційної експресії генів, але й складної взаємодії останніх у процесі розвитку. Основні типи взаємодії алельних і неалельних генів у клітині вже було розглянуто (розділ 7.3.2).

Взаємодія генних продуктів у еукаріотів може відбуватися на різних рівнях — не тільки внутрішньоклітинному, але й міжклітинному, а також на рівні органів і систем. Одна із найбільш складних міжклітинних форм взаємодії генів в онтогенезі — це гормональна регуляція біологічних процесів, в першу чергу таких, як транскрипція і трансляція. Однак є чимало і інших прикладів взаємодії генів на міжклітинному рівні.

У ссавців синтез пігменту меланіну контролюється багатьма генами, добре вивченими у мишей. Домінантний ген *C* кодує фермент тирозиназу, яка грає важливу роль у синтезі меланіну; у гомозигот *cc* тирозиназа відсутня, і тому вони є альбіносами. Меланоцити мишей здатні синтезувати меланін різних кольорів — чорний, коричневий і жовтий. Домінантний ген *B* визначає чорний колір меланіну, а його рецесивний алель *b* — коричневий. Домінантний ген *A^v* є епістатичним по відношенню до алельної пари *B—b* і його наявність завжди обумовлює жовте забарвлення шерсті. Відомі і інші гени, які контролюють пігментацію меланоцитів у мишей.

З'ясовано, що забарвлення меланіну залежить не тільки від генотипу самого меланоцита, але й від генотипу оточуючих його клітин. Це виявляється в дослідях з трансплантацією шматочків шкіри (рис. 14.4). Реципієнтами були мишата-альбіноси двох генотипів — $ssA^y a BB$ і $ssaa BB$. Першим трансплантували шматочки

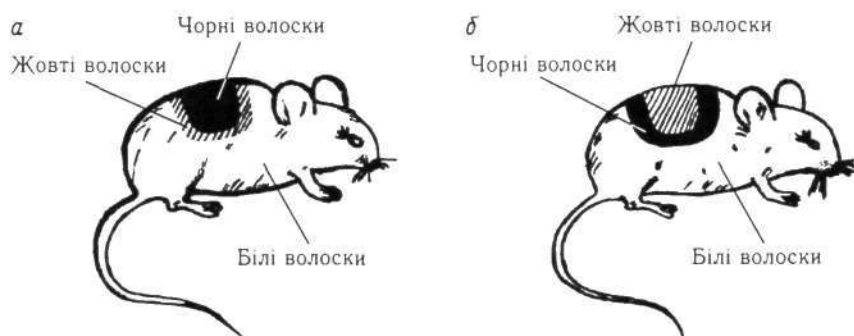


Рис. 14.4. Ілюстрація дослідів по пересадці шкіри чорних (а) та жовтих (б) мишей мишенят-альбіносам двох різних генотипів

шкіри чорних мишей (генотип $SSaaBB$). Меланобласти із чорного трансплантата мігрували у волосяні фолікули альбіноса-реципієнта, внаслідок чого навкруги пересадженого шматочка шкіри виникла кайма забарленої шерсті, проте не чорної, а жовтої. Причиною цього була наявність у клітинах реципієнта епістатичного гена A^y .

Реципієнтам-альбіносам другого генотипу (без гена A^y) трансплантували шкіру жовтих мишей (генотип $SSA^y a BB$). У цьому випадку навкруги пересадженого шматочка виникла кайма чорної шерсті. Як і в першому випадку, наявність пігменту в волоссинах кайми була обумовлена генотипом меланоцитів трансплантата, а колір цього пігменту (чорний, а не жовтий) визначав генотип клітин реципієнта.

У ссавців синтез меланіну регулюється гормонами. Тому забарвлення шерсті у деяких тварин змінюється в залежності від пори року (заєць-русак, білка, песець та ін.). Ці зміни значною мірою залежать від концентрації в крові тварин гормонів гіпофізу, активність якого визначається тривалістю світлового дня. Існує думка, що гормони впливають на меланоцити через клітини оточуючих тканин.

Дуже важливу інформацію про взаємодію генів різних клітин вдалось отримати завдяки дослідженням на алофенних тваринах (рис. 14.5). Алофенними називають химерні організми, які розвива-

ються із суміші бластомерів двох або декількох генетично відмінних зародків.

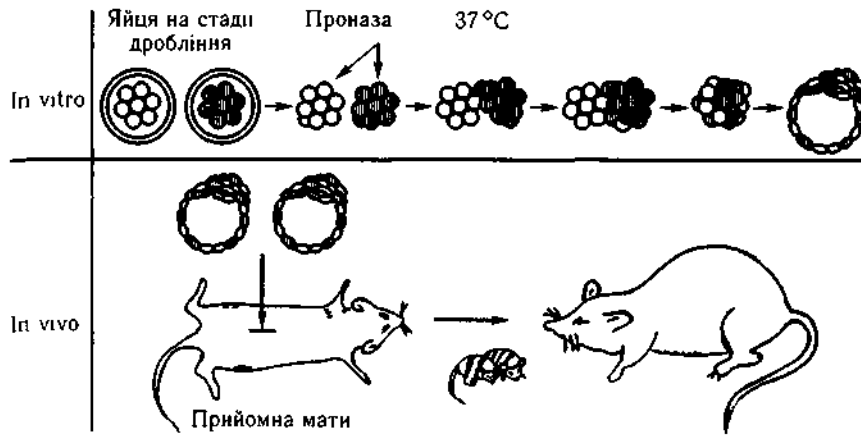


Рис 145 Схема отримання алофенних мишей

У мишиного ембріона на стадії восьми бластомерів всі клітини є рівноцінними, а в більш пізні строки виявляються біохімічні та інші відмінності, пов'язані з диференціюванням клітин трофоектодерми і внутрішньої клітинної маси.

Про те, що клітини раннього зародка ссавців у генетичному відношенні є рівнозначними, свідчать факти народження ідентичних близнюків. Останні утворюються із бластомерів, які виникають внаслідок поділу однієї зиготи.

Якщо взяти два мишиних ембріони на стадії восьми бластомерів і об'єднати їх в одну гігантську морулу, то із останньої в матці названої матері може розвинути мишеня нормальної величини, але з генетично неоднорідними сегментами тіла (алофенна миша). Наприклад, якщо одна пара батьків належить до лінії з білим забарвленням шерсті, а друга пара — до лінії з чорною шерстю, то їх химерні нащадки будуть строкатими: в забарвленні шерсті мишенят чередуються білі і чорні плями у відповідності з розподілом в тілі клонів генетично неоднорідних клітин (рис. 14.5).

Такі химерні організми можна також отримати, ін'єкуючи клітини ранніх ембріонів у бластоцисти іншого генотипу. Химеру можна отримати навіть після ін'єкції однієї клітини. Цей методичний підхід дає можливість з'ясувати, наскільки та чи інша клітина зародка зберегла тотипотентність. Результати таких досліджень переконливо свідчать про те, що клітини ранніх зародків ссавців (при-

наймні восьмиклітинної стадії) є тотипотентними і взаємно сумісними. Із цього можна зробити висновок, що імуногенетичні механізми гістонесумісності формуються у ссавців на більш пізніх стадіях розвитку.

Були проведені дослідження, в яких у різних співвідношеннях змішували бластомери мишей, що відрізняються багатьма парами маркованих генів. За своїм проявом у алофенних мишей досліджувані гени поділялися на дві групи — **автономної** і **неавтономної** дії.

До першої групи відносяться такі гени, домінуючі алелі яких не подавляють вияву рецесивних алелей цього ж самого гена, що знаходяться в гомозиготному стані у сусідніх клітинах. В протилежність цьому продукти домінуючих генів неавтономної дії, проникаючи у сусідні клітини, визначають їх фенотип, подавляючи вияв рецесивних генів зазначених клітин. Отже, взаємодію генних продуктів у процесі розвитку на міжклітинному рівні можна вважати встановленою.

Приклади особливо складної взаємодії генів за диференціації клітин дає **імуногенетика** — наука, яка з'ясовує спадкові фактори імунітету, включаючи ті, що визначають різноманітність і специфічність імуноглобулінів. Крім прикладів комплементарності генів, які кодують легкі та важкі субодиниці антитіл, імуногенетика дає переконливі докази можливості незворотних онтогенетичних перебудов структури геному шляхом рекомбінацій, делецій та інших змін (розділ 12.1.6).

14.6. Летальна диференціація клітин за розвитку еукаріотів

Важливе значення в онтогенезі більшості еукаріотів має генетично запрограмоване швидке розмноження одних типів клітин і летальна диференціація клітин інших типів. Відмирання певних диференційованих клітин властиве нормальному розвитку вищих організмів. Прикладами можуть бути: руйнування тканин і органів личинки за метаморфозу у комах, клітин хвоста і зябер за перетворення луголовка у жабу, клітин міжпальцевих перепон у ембріонів хребетних тварин і т. п. В усіх цих та інших прикладах генетично запрограмована смерть клітин настає на чітко визначеній стадії онтогенезу і контролюється генами, мутації яких можуть істотно змінити хід розвитку. Так, уроджена виродливість — ластопалість — у людини визначається домінуючим мутантним геном, за

наявності якого клітини ембріона, що з'єднують пальці, не відмирають, і пальці залишаються з'єднаними.

Є підстави вважати, що у вищих організмів процес старіння і тривалість життя значною мірою визначаються генетично. Про це свідчать дослідження на дрозофілі, мишах та інших об'єктах. Показана можливість селекції мух і мишей на затримку старіння і тривалість життя. Мухи ліній, отриманих таким добром, живуть у середньому вдвоє довше, і ця їх особливість успадковується разом з відповідними генами. Механізм дії генетичних факторів, обумовлюючих старіння, остаточно не з'ясований, хоч на цей рахунок існує чимало цікавих гіпотез.

Одна із них полягає в тому, що кількість послідовних поділів соматичних клітин генетично обмежена. В процесі розвитку клітини виконують генетично зафіксовану програму і при цьому незворотно змінюються. Багато клітин відмирає; такими є клітини ксилеми рослин і рогового шару епітелію. Інші клітини за час диференціювання втрачають ядро; такими є еритроцити ссавців і клітини флоєми рослин, які мають обмежену тривалість життя. Ще одна група диференційованих клітин, хоч і зберігає ядро, але втрачає здатність до поділів; останнє властиве клітинам м'язів і нервових тканин.

Гіпотеза запрограмованої загибелі клітин передбачає, що в клітині шляхом диференційованої експресії генів незворотно здійснюється генетична програма, яка приводить до смерті. Ця гіпотеза ґрунтується на численних дослідженнях, які на початку 60-х років провадив Л. Хейфлік. Він встановив, що фібробласти людини ростуть у культурі лише обмежений час. Після певної кількості поділів вони втрачають мітотичну активність і відмирають. Кількість поділів клітин у культурі залежить від віку донора. Якщо клітини беруть у плода, то вони можуть поділитися приблизно ще 50 разів; клітини новонародженого поділяються в культурі не більше 20—30 разів, а клітини людей зрілого віку на штучному середовищі дають лише декілька поколінь. Отже, кількість поділів клітин *in vitro* приблизно відповідає тій, яка властива даним клітинам протягом життя людини.

Тільки пухлинні (трансформовані) клітини і клітини з аномальною кількістю хромосом можуть відхилятися від заданої програми і поділятися необмежено довго. Прикладом можуть бути культури ракових клітин, отриманих від негритянки на ймення Генрієта Лекс, яка померла від рака матки в 1951 році. Ці клітини сьогодні використовують майже в усіх лабораторіях світу, де їх знають як клітини HeLa. Вони є анеуплоїдними, містять приблизно 60—70 хромосом і культивуються краще більшості інших клітин, введених у культуру пізніше. Є підстави вважати, що в даному випадку

із невідомих причин не діє генетична програма, яка обмежує міотичну здатність нормальних соматичних клітин і призводить їх до старіння і смерті.

Для пояснення механізмів старіння запропоновано ряд гіпотез, жодну з яких, взяту окремо, не можна вважати задовільною. Одна із них — **гіпотеза маргіномії** — ґрунтується на припущенні, що поділ клітин супроводжується частковим вкороченням теломерних ділянок хромосом і поступовою втратою генетичного матеріалу, необхідного для нормальної життєдіяльності. Інтенсивність цих втрат визначає швидкість старіння і строки життя. Сьогодні є докази того, що у злоякісних клітин довжина молекули ДНК в теломерній області хромосоми після її реплікації відновлюється за допомогою спеціальних ферментів — **теломерази**. Штучним введенням гена теломерази в ізолювані клітини людей вдається досягти безмежних поділів цих клітин без ознак старіння. Це відкриття ще не вирішує проблему подовження життя людини, але вселяє щодо цього певний оптимізм.

Важливу роль у старінні грає зміна активності багатьох ферментів. Однією з причин старіння може бути накопичення в ДНК передмутаційних та мутаційних змін у зв'язку з інтенсивним перекисним окисненням макромолекул у старіючому організмі.

У деяких рослин і тварин генетично запрограмована смерть настає у суворо визначений момент життєвого циклу. Деякі риби, наприклад лососеві і вугри, гинуть зразу ж після нересту. Обов'язковий процес відмирання після цвітіння та плодоношення властивий багатьом рослинам, не виключаючи і багатолітніх (бамбук, алое та ін.). Тому є підстави стверджувати, що старіння та смерть є генетично запрограмованими складовими розвитку, хоч з цього приводу є і інші думки.

14.7. Генетичні моделі на прикладі дрозофіли та інших об'єктів

Сьогодні існують обґрунтовані уявлення про те, як діють гени за контролю процесу розвитку. Досить добре з'ясована послідовність експресії генів у процесі розвитку деяких фагів. Як приклад можна згадати літичний та лізогенний цикли розвитку фага λ , генетична обумовленість яких добре вивчена (розділ 12.2).

Геноми багатьох фагів організовані так, що їх генетична карта досить точно відображає послідовність експресії генів за літичного

розвитку. При цьому принцип оперонної організації геному досягає крайнього вираження: гени, що кодують білки із спорідненими функціями, згруповані і управляються з максимальною економією невеликою кількістю регуляторних генів. Серед раних (надраних), затримано раних (середніх) та пізніх генів вірусів завжди є принаймні один ген, продукт якого необхідний для запуску транскрипції наступної групи генів. Принцип такої **каскадної** регуляції функцій оперонів базується на дерепресії промоторів, на антитермінаторній дії продуктів регуляторних генів (як у випадку фага λ) або на заміні сигма-факторів РНК-полімерази (як у фага SP01). Зміною сигма-факторів, що синтезуються у клітині, пояснюється переключення у деяких бактерій нормального вегетативного розвитку на процес споруляції (розділ 6.1.5).

У *D. melanogaster* після запліднення яйцеклітини ядро зиготи, а потім і виникаючі дочірні ядра проходять дев'ять синхронних поділів, утворюючи групу ядер, що знаходяться в спільній для них цитоплазмі. Після дев'ятого поділу більшість цих ядер мігрує до оболонки яйця, поділяється ще чотири рази і утворює **синцитіальну бластодерму**, яка містить ядра в загальній цитоплазмі (рис. 14.6).

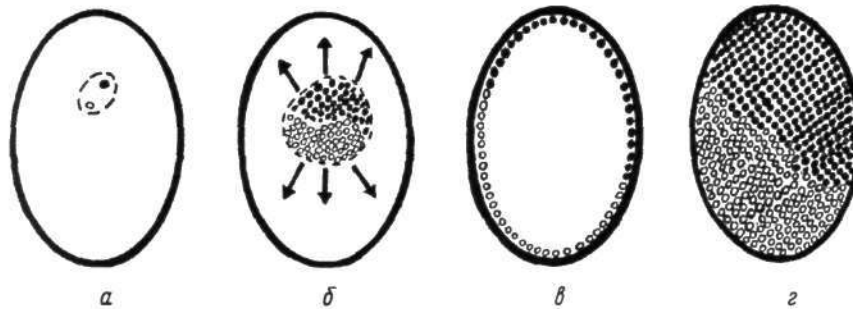


Рис. 14.6. Схематичне зображення поділів дробління, що призводять до формування синцитіальної бластодерми у гінандроморфа дрозофіли:

а — два ядра, що виникли за першого поділу дробління, із яких одне (зображене білим) втратило X-хромосому; б — зигота після декількох поділів дробління; ядра з генотипом XX затемнено, а з генотипом XO зображено білим; в — зигота після міграції ядер до оболонки (синцитіальна бластодерма); г — поверхня синцитіальної бластодерми перед утворенням клітинних оболонок, яка складається із ядер XX і XO в рівних співвідношеннях. Є чітка межа між ділянками, зайнятими ядрами XX і XO

Незабаром навкруги кожного ядра формуються клітинні оболонки, внаслідок чого виникає **клітинна бластодерма**. Потім здійснюється гастрюляція і органогенез. Із яйця виходить личинка, яка містить два типи клітин: личинкові та імагінальні. Під час росту і линяння

личинки їх клітини не поділяються, а тільки збільшуються у розмірах, а імагінальні клітини, в протилежність цьому, поділяються, їх кількість збільшується і з них формуються **імагінальні диски**. Клітини останніх генетично детерміновані; на стадії лялечки вони диференціюються і дають початок різним органам дорослої комахи. Цікаво, що кожен диск залежно від його положення в тілі личинки чітко запрограмований на розвиток лише певного органу — ноги, крила, ока і т. п. Стан зазначеної детермінації успадковується за мітотичних поділів. У цьому можна переконатися, пересаджуючи імагінальні диски в черевну порожнину дорослих самок, де гормональні умови виключають диференціацію дисків, проте вони добре зберігаються і не втрачають своєї здатності розвиватись у відповідні органи. Це виявляється зразу ж після їх ретрансплантації в порожнину тіла личинки, яка готова перетворитись у лялечку. Пересаджений диск перетворюється в додатковий орган незалежно від місця трансплантації, але в повній відповідності з тим, який саме диск було взято у вихідній личинки (імагінальний диск ока започатковує око, диск ноги — ногу і т. д.).

Стан детермінації дисків, який формується у дрозозфілі ще на стадії клітинної бластодерми, порушується так званими **гомейозисними мутаціями**. Прикладами останніх слугують: *Ophthalmoptera* — розвиток крила із імагінального диску ока, *Proboscipedia* — розвиток ноги або частки антени замість хоботка, *Antennapedia* — перетворення антен у ноги і т. п.

Згадані мутації випадково виникають у так званих **гомейозисних генах**, які за структурою виявилися дуже подібними у різних видів еукаріотів, а деякі ділянки цих генів взагалі ідентичні. Ці еволюційно консервативні ділянки отримали назву **гомеобоксів**, а ділянка іРНК або регуляторного білка, що кодується гомеобоксом, називається **гомеодоменом**. Так, у миші (ген *MA-10*), жаби (ген *MM3*) і дрозозфілі (ген *Antennapedia*) є спільний гомеобокс.

Крім гомейозисних мутацій, напрямок розвитку клітин імагінальних дисків може порушувати їх **трансдетермінація**. Остання полягає в тому, що шлях диференціації диска змінюється, але не випадково, як у випадку мутацій, а в чітко певному напрямку (наприклад, імагінальний диск геніталій може перетворитись у диск ноги, але ніколи не перетворюється безпосередньо в диск органу зору). Вважають, що **трансдетермінації** — це **фенокопії гомейозисних мутацій**, які виникають іноді в процесі культивування дисків у черевній порожнині дорослих мух.

Після того, як А. Стертевант описав метод картування зачатків імагінальних структур шляхом врахування частот, з якими в популяції гіандроморфів лінія розділу статевої належності клітин

розмежовує два органи дорослої мухи, цей метод використали для побудови карти зачатків бластодерми, яка відображує фізичний зв'язок між ними.

Встановлено, що просторове розташування клітин у бластодермі визначає долю цих клітин на весь період розвитку. Дослідження гінандроморфів показало, що проліферуючі ядра, які мігрують до поверхні заплідненого яйця (рис. 14.6) є тотипотентними і детермінуються у відповідності із своїм положенням на поверхні бластодерми. Отже, в яйці міститься позиційна інформація, яка грає вирішальну роль у детермінації ядер, а потім і клітин бластодерми. Таким чином, процес оогенезу, який передуює заплідненню, грає важливу роль у розвитку зиготи.

Знайдено чимало мутацій з материнським ефектом, за яких мутантна самка відкладає яйця, не здатні до нормального розвитку. Зародки в таких випадках неминуче гинуть на ранніх стадіях ембріогенезу. Наявність таких мутацій вказує на те, що розвиток не може здійснюватися нормально у відсутність певним чином підготовленої (предетермінованої) цитоплазми яйцеклітини під контролем материнського генотипу. Відомо, що Х-хромосома дрозофіли, яка складає біля 20% усього геному, містить близько 160 генів, здатних утримувати летальні мутації з материнським ефектом. Біохімічні порушення, що супроводжують ці мутації, в більшості випадків ще не з'ясовані, але безпосередній вплив цих мутацій на розвиток ембріона є безперечним.

Найбільший інтерес являють мутації, що порушують позиційну інформацію уздовж передньо-задньої (подовжньої) і дорсо-вентральної (поперечної) осі яйця. Ці порушення є причиною зміни вмісту в клітині деяких **морфогенів**, які утворюють в нормі (за рахунок градієнтів концентрацій у двох взаємно перпендикулярних напрямках) добре скоординовану систему регуляції морфогенезу.

Самки, гомозиготні по мутації *bicaudal*, відкладають яйця, із яких незалежно від генотипу зиготи розвиваються виродливі ембріони з двома черевцями, одне з яких розвивається замість передньої частини ембріона. Цікаво, що полярні клітини, які звичайно знаходяться в задній частині зародка, в аномальній передній частині мутанта *bicaudal* не утворюються. Отже, детермінація полярних клітин і клітин бластодерми здійснюється різними механізмами. Вважають, що у мутанта *bicaudal* позиційна інформація передньої частини ембріона змінюється на позиційну інформацію його задньої частини.

Інша мутація з материнським ефектом — *dorsal* — в гомозиготному стані спричиняє порушення розвитку у ембріонів внутрішніх органів, які в нормі формуються внаслідок інвагінації вентральних

клітин. Очевидно, у мутанта *dorsal* всі клітини бластодекти, які знаходяться нижче дорсо-вентральної лінії, розвиваються не як вентральні, а як дорсальні. Вважають, що у такого мутанта порушена концентрація морфогену, який створює градієнт уздовж дорсально-вентральної осі яйця.

Реалізація позиційної інформації є функцією ядер, які мігрують у периплазму (кортикальний шар цитоплазми яйця) під час формування бластодекти. Тому така реалізація мусить залежати не тільки від особливостей предетермінації цитоплазми, але й від генетичної інформації ядра зиготи. Якщо це так, то мусять бути мутанти, які інтерпретують позиційну інформацію неправильно і впливають на розвиток зародка залежно від генотипу зиготи, а не матері. Саме такими мутаціями є вже згадані гомейозисні мутації. Їх наявність свідчить про існування генів, нормальною функцією яких є вибір або підтримка певного шляху розвитку відповідних клітин. Кожен напрямок розвитку (диференціації) обумовлюється експресією певного набору гомейозисних генів, сумісна дія яких приводить до кінцевого результату — формування того чи іншого органу із парасегментів та сегментів ембріона.

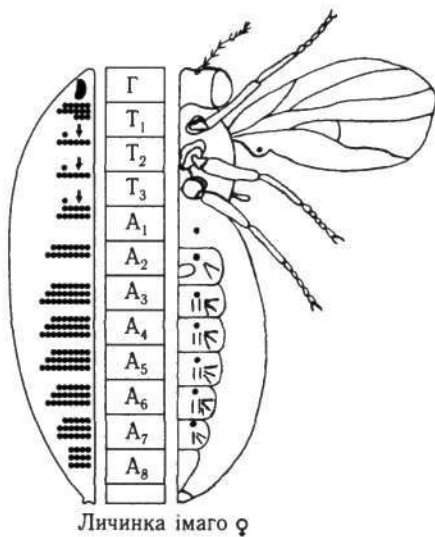


Рис. 14.7. Вигляд з вентральної сторони нормальної сегментації зовнішніх органів дрозофіли.

Г — голова, Т — торакс, А — абдомен

різних часових класів. Кожний клас більш ранніх генів контролює більш пізній клас, аж поки не спрацює останній з них. Ця каскадна

експресією певного набору гомейозисних генів, сумісна дія яких приводить до кінцевого результату — формування того чи іншого органу із парасегментів та сегментів ембріона.

На рис. 14.7 показана сегментація тіла у шойно вилупленої із яйця личинки та у імаго. Крім головного сегмента, тут розрізняють три грудних (торакальних) та вісім черевцевих (абдомінальних) сегментів.

В більш ранньому ембріогенезі зони активності різних ферментів чітко співпадають з розташуванням 14 парасегментів. Кожен такий парасегмент у пізньому ембріогенезі перетворюється в задню частину одного сегмента личинки і в передню частину іншого.

Гени, відповідальні за формотворчі процеси, утворюють чітку ієрархію і відносяться до

регуляція пояснюється тим, що багато генів із ієрархії кодують фактори транскрипції, які стимулюють (або репресують) активність інших генів. До того ж ці фактори утворюють градієнти концентрацій у передньо-задньому або дорсо-вентральному напрямку ембріона і спрацьовують як регулятори лише за певного (надпорогового) їх вмісту (пороговий феномен).

Шляхи каскадної регуляції генів за розвитку дрозоді були з'ясовані завдяки дослідженням, які провели Х. Ньюслейн-Волард, Е. Вішаус, а також Е. Льюїс — вчені, які у 1995 р. за досягнення у вивченні розвитку дрозоді отримали Нобелівську премію.

Першими двома авторами було з'ясовано, що ранній розвиток мухи включає каскад генних взаємодій, який розпочинається з функціонування **генів материнського ефекту** і досягає кульмінації з включенням так званих **відбірних (гомейозисних) генів**. Ранні гени каскаду, до яких відносяться гени материнського ефекту, гени збитку (*gap*-гени) і спарено регулюючі гени (*pair rule genes*), діють на стадіях ембріона, коли ще немає мембранних структур. Пізні гени, серед них гени поляризації сегментів (*segment polarity genes*) і відбірні гени (*selector genes*), функціонують після утворення клітинних мембран.

Гени материнського ефекту експресуються тільки у матері в період оогенезу. Вони функціонують в так званих клітинах-нянях, які оточують ооцит. Саме ці клітини транспортують в ооцит продукти (іРНК і білки) генів материнського ефекту. В передній кінець ооцита транспортується іРНК гена *bicoid*, а в задній кінець — іРНК гена *staufen*. Після трансляції цих материнських іРНК виникає градієнт концентрації білка *bicoid* у передньо-задньому напрямку ембріона. Разом з продуктами інших трьох генів материнського ефекту (*nanos*, *torso* і *Toll*) білок *bicoid* формує позиційну інформацію ембріона у двох взаємно перпендикулярних вісях — передньо-задній і дорсо-вентральній. По цих чотирьох та по десятках інших генів материнського ефекту отримано чимало мутантів мухи, схрещування яких з наступними аналізом F_2 дало надзвичайно корисну інформацію про генетичні засади розвитку. Подібні дослідження були названі F_2 -скрінінгом.

Продукти генів материнського ефекту визначають ранні стадії ембріогенезу. Для подальшого розвитку ембріона вони мають взаємодіяти з власними генами ембріона, які були названі **зиготичними генами**.

Першими із зиготичних генів функціонують так звані *gap*-гени (гени збитку), мутації в яких призводять до втрат частин структури ембріона. Найважливішим *gap*-геном є *hunchback*-ген, здатний зчитувати передньо-задній градієнт білка *bicoid*. Цей ген включає

ється в області високої концентрації білка *bicoid* — між переднім кінцем ембріона і точкою, яка відповідає приблизно середині його довжини. Білок *bicoid* є одним із багатьох факторів транскрипції (гомеодоменом), який приєднується до енансера гена *hunchback* і стимулює транскрипцію останнього. Чим вища концентрація білка *bicoid*, тим активніше здійснюється транскрипція гена *hunchback*.

Останній в свою чергу контролює активність трьох інших *gap*-генів — *Krüppel*, *knirps* і *giant*. Кожний з цих генів реагує на певний градієнт концентрації білка *hunchback* і тому експресується неоднаково в різних місцях передньо-задньої і дорсо-вентральної вісей ембріона.

Продукти цих та інших *gap*-генів є факторами транскрипції, які визначають зони активності наступного класу генів — так званих **спарено регулюючих генів** (*pair rule genes*). Останні відповідають за розподіл клітин по парасегментах ембріона. Так, ген *eve* визначає розподіл клітин по непарних парасегментах, а ген *ftz* — по парних.

Після визначення парасегментів розпочинається дія іншого класу генів, який контролює основні параметри і характеристики парасегментів. Найбільш важливим з цих генів є ген *engrailed*, який активується білком гена *ftz*. Ген *engrailed* з допомогою інших генів, які називаються **генами поляризації сегментів** (*segment polarity genes*), відповідає за формування переднього і заднього компартментів кожного парасегмента, іншими словами — за розмежування сегментів.

З утворенням компартментів клітини останніх генетично детермінуються на подальший розвиток в певні структури, характерні для кожного компартмента. Ця детермінація здійснюється так званими **відбірними генами** (*selector genes*), які переключають клітини на чітко визначений напрямок диференціювання. Відбірні гени кодують групу факторів транскрипції, більшість яких мають дуже консервативний ДНК-зв'язуючий домен із 61 амінокислотної послідовності. Гомеодомени кодуються гомеобоксами, до складу яких входить 183 п. н. Ці фактори транскрипції контролюють активність багатьох інших генів, які в ході ембріогенезу забезпечують формотворчі процеси. Таким чином, відбірні гени утворюють чітку ієрархічну піраміду, на вершині якої знаходиться головний відбірний ген, так званий «ген-староста». Порушення структури саме цього гена призводять до гомеозисних мутацій типу *Antennapedia* та інших.

Відомо дев'ять головних відбірних генів, які відносяться до двох дуже великих кластерів. Один із них, *Antennapedia* — комплекс *ANT-C* — містить ДНК із 100 кб і включає ген *Antp* і чотири ін-

ших. Другий комплекс — *Bithorax* (*BX-C*) — містить три основних гени: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) і *abdominal-B* (*abd-B*). Якщо всі ці три гени мутовані, то майже всі сегменти личинки виглядають як сегмент T2. Активація гена *Ubx* призводить до утворення сегментів T1—T3 і серії сегментів A1. Сумісна функція генів *Ubx* і *abdA* сприяє утворенню нормальних сегментів T1—A3, а потім серії A4; активація всіх трьох генів призводить до формування, крім того, сегментів A5—A8. Таким чином, чим більше генів активовано, тим більш задні сегменти формуються у личинки. Цікаво, що гомейозисні гени у хромосомі дрозофіли розташовані зліва направо в порядку їх експресії від переднього до заднього кінця личинки. Ця закономірність властива також для гомейозисних генів вищих еукаріотів. Миша і людина мають по чотири кластери гомейозисних генів — *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* і *HoxD*. Кожний кластер є колінарним щодо порядку експресії генів від переднього до заднього кінця ембріона і відповідає порядку зчитування гомологічних генів у дрозофіли.

Вважають, що активація гомейозисними генами тих чи інших наборів генів може поділити компартменти ембріона на субкомпартменти, кожен з яких здатний дати початок тій чи іншій частині тіла.

Фундаментальні дослідження генів групи *Bithorax* проведені Е. Льюїсом, який розробив схему досить зв'язаної координації функцій цих генів за сегментації ембріона. В районі *BX-C* локалізовано цілий ряд рецесивних і домінантних точкових мутацій, здатних приводити до сегментно-специфічних гомейозисних трансформацій у дорослих мух. За допомогою хромосомних делецій можна отримати генотипи, у яких відсутні всі або певна частина генів *BX-C*. Такі мутанти дають можливість з'ясувати функції всіх цих генів. Делеції в районі *BX-C* летальні: розвиток мухи здійснюється лише до стадії виходу із лялечки. Однак на цій стадії вже можна визначити функцію втрачених генів по сегментаційній трансформації мутантних личинок.

На рис. 14.8 показана сегментація тіла нормальної личинки, а також сегментація за делецій у різних ділянках району *BX-C* третьої хромосоми. Генотип, гомозиготний по мутації *Df-Pg*, у якого відсутній весь район *BX-C*, обумовлює фенотип, за якого сегменти T3 і A1—A7 являють собою повтори сегмента T2. Крім того, аномальну структуру має сегмент A8: в його задній частині наявні хітинові структури, що нагадують ротовий відділ головного сегмента. Отже, у відсутність генів *BX-C* всі сегменти, крім A8, розвиваються як сегмент T2. Це означає, що гени району *BX-C* необхідні для визначення сегментно-специфічних шляхів розвитку всіх сегментів, розташованих після T2.

Інші делетовані генотипи виявляють інші порушення сегментації. Точкові мутації району *BX-C*, що порушують розвиток певних сегментів, картуються послідовно зліва направо у відповідності з розташуванням аномальних сегментів від переднього до заднього кінця личинки.

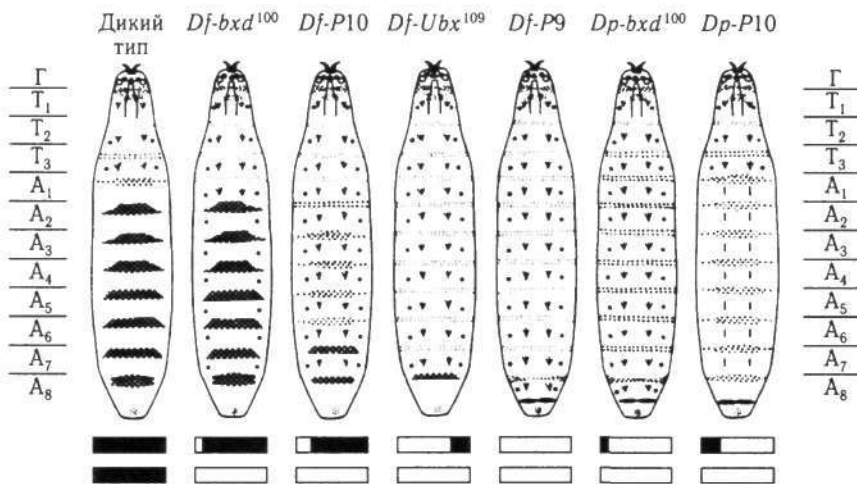


Рис. 14.8. Сегментація тіла ранніх личинок дрозофіли, що мають генотипи з делеціями частини або всіх генів *BX-C*:

Втрачені ділянки третьої пари хромосом зображено внизу рисунка незафарбленими квадратами

Функціональний стан генів комплексу *BX-C* в клітинах певних сегментів *E. Льюїс* пов'язує з наявністю в градієнті передньо-задньої осі бластодерми репресора генів *BX-C*. Концентрація цього репресора найвища в районі бластодерми, який відповідає сегментові T₂, а найнижча — в районі сегмента A₈. Репресор здатний приєднатися до активних у цис-положенні контролюючих ділянок генів, причому кожна така ділянка уздовж *BX-C* має різну спорідненість до репресора. Таким чином, в сегментах від T₂ до A₈ активується все більша кількість генів *BX-C*, що визначається концентрацією репресора в кожному сегменті і спорідненістю контролюючих ділянок *BX-C* до репресора. В районі бластодерми, відповідному сегментові T₂, інактивуються всі гени *BX-C*, тому клітини цього сегмента диференціюються по типу T₂. В протилежність цьому в районі сегмента A₈, де концентрація репресора найнижча, експресуються всі гени *BX-C*, і тут клітини розвиваються по типу A₈.

Існування репресора для генів комплексу *BX-C* підтверджено за дослідження мутацій гена *extra sex combs (esc)*. Мутація *esc⁻* призводить до того, що всі ембріональні сегменти розвиваються по типу А8, тобто виникає фенотип, властивий мутації, за якої повністю інактивується репресор генів *BX-C*.

Продукт гена *esc⁺* регулює також функцію тих гомейозисних генів, які утворюють комплекс *Antennapedia (ANT-C)* і контролюють розвиток голови і сегмента Т1. Отже, ген *esc⁺* регулює експресію генів як комплексу *BX-C*, так і комплексу *ANT-C*, визначаючи напрямки диференціювання клітин усіх сегментів.

Експресія генів *BX-C* регулюється також геном *polcomb (Pc)*. Подібно *esc⁺*, дія *Pc* також супроводжується материнським ефектом на детермінацію клітин ембріона. Проте в протилежність *esc⁺*, який функціонує недовго, продукт гена *Pc⁺* потрібний протягом всього періоду розвитку для забезпечення нормальної функції генів *BX-C* у клітинах різних сегментів.

Таким чином, модель Льюїса щодо загального механізму детермінації клітин ембріона дрозофіли на стадії бластодерми коротко зводиться до наступного. Позиційна інформація уздовж передньо-задньої осі зиготи реалізується через градієнт концентрації морфогену, який являє собою репресор генів комплексів *BX-C* і *ANT-C*. Цей репресор зв'язується з активними у цис-положенні регуляторними послідовностями ДНК і визначає рівень експресії відповідних генів. Кількість активних генів комплексу *BX-C* у нормі зростає по-сегментно в напрямку від Т2 до А8. У відповідь на їх продукти в клітинах кожного сегмента експресується певний набір генів, дія яких визначає шлях подальшого розвитку кожної клітини і всіх дочірніх клітин, що виникають за мітотичних поділів.

Таким чином, механізми детермінації і диференціації клітин у процесі розвитку дрозофіли складаються із каскадів подій позитивної і негативної регуляції активності генів, які добре взаємодіють між собою. Слід зауважити, що у вищих еукаріотів детермінація і диференціація клітин може здійснюватися за подібною схемою, але дуже залежить від того чи іншого гормонального фону за процесу розвитку.

Крім позиційної інформації для формотворчих процесів в ембріогенезі вищих тварин дуже важливе значення має так зване **позиційне значення** клітин. Під цим терміном розуміють неоднозначну реакцію ембріональних клітин на одну і ту ж позиційну інформацію. Наслідком цього явища є те, що на перший погляд однаково диференційовані клітини (наприклад, клітини хряща) можуть бути нееквівалентними. Відомо, що хрящові клітини зачатків різних кісток миші або курчати ростуть з різною швидкістю і зберігають

цю особливість навіть в умовах культури тканин за повної ізоляції від інших частин зародка. Така ж нееквівалентність виявлена у клітин шкіри, нервової системи та ін.

Вважають, що позиційне значення клітин визначається конкретним їх оточенням і тривалістю їх перебування в зоні прогресивного розвитку — популяції недиференційованих клітин, які бурхливо поділяються і з яких потім утворюються зародки окремих органів та їх частини.

14.8. Деякі узагальнення щодо генетичної регуляції розвитку

Узагальнюючи всю раніше викладену інформацію, можна зазначити, що регуляція розвитку у вірусів, бактерій і еукаріотів здійснюється головним чином завдяки:

1) оперонній і регулонній організації генів у вірусів і бактерій, що забезпечує сумісний контроль їх експресії шляхом негативної і позитивної регуляції на рівні промоторів, операторів, атенуаторів, термінаторів та інших структур (розділ 6.1);

2) антитермінаторній дії продуктів деяких генів у фагів (розділ 3.2);

3) каскадній або багатоступеневій регуляції експресії генів, за якої здійснюються елементи позитивного і негативного контролю, послідовно обумовлюючи один одного (розділи 3 та 6);

4) касетному механізмові регуляції онтогенетичних змін, як це описано для визначення клітинних типів спаровування у деяких дріжджів і для переключення поверхневих антигенів у трипаносом і гонококів (розділ 12.1.5);

5) позиційній інформації яйця і позиційному значенню проліферуючих клітин у еукаріотів;

6) кластерній організації деяких структурно або функціонально споріднених генів, а також їх численних копій у еукаріотів (розділ 3);

7) груповій регуляції експресії генів, за якої досягається дозова компенсація генів Х-хромосом (розділ 9.1.5.);

8) взаємодії в онтогенезі алельних і неалельних генів (розділ 7.3.2);

9) перебудовам геному шляхом ампліфікації генів, ендомітозу і поліплоїдизації деяких клітин, делецій, транслокацій, транспозицій, рекомбінацій, конверсії генів та інших змін (розділ 11);

10) генетично запрограмованому розмноженню одних типів клітин і летальній диференціації інших, що є важливою рисою нормального онтогенезу вищих організмів і здійснюється як протягом ембріонального розвитку, так і в постембріональному періоді;

11) індукції генної активності гормонами росту і диференціації, а також іншими епігенетичними чинниками.

Ці та інші генетичні механізми регуляції розвитку з'ясовані лише в загальних рисах. Одні з них властиві головним чином прокаріотам, інші — еукаріотам. Однак немає сумніву в тому, що в кожному випадку чимало зазначених механізмів діє сумісно і що розвиток є сумарним виявом всіх генетичних і епігенетичних подій. З'ясування системних логічних зв'язків між цими подіями залежно від особливостей генотипу і умов середовища можна розглядати як актуальну, але ще не зовсім вирішену проблему онтогенетики.

ГЕНЕТИКА ПОПУЛЯЦІЙ

15.1. Генетика популяцій і її значення

Цей напрям генетики з'ясовує генетичні закономірності, що виявляються в популяціях рослин, тварин та мікроорганізмів. Основна мета генетики популяцій (або популяційної генетики) полягає у вивченні законів і закономірностей, які визначають генетичну структуру популяції, співвідношення частот (питомих долей) генотипів і окремих алельних генів, а також динаміку генетичної структури популяції в умовах впливу факторів зовнішнього середовища.

Генетичні перетворення в популяції (або **мікроеволюція**, як назвав їх Ю. О. Філіпченко) складають основу походження видів, тобто **макроеволюції**, а також штучного створення нових сортів і порід людиною. Саме тому успіхи популяційної генетики лежать в основі розвитку еволюційної теорії, практики народного господарства і медицини.

Знаючи генетичну структуру популяцій і основні закони, за якими здійснюються генетичні перетворення в них, можна досить точно визначити стан цих популяцій у даний момент, спрогнозувати його на майбутнє і розробити ефективні заходи по збереженню біокомплексів в умовах несприятливих впливів антропогенних чи інших факторів. Отже, генетика популяцій — дуже важлива наука з точки зору біоценології, охорони природи і раціонального використання природних ресурсів. Не менш істотним є значення генетики популяцій для медицини, бо генетичний стан популяцій людини визначається тими ж законами, що й інших об'єктів. Знаючи ці закони, можна, наприклад, розрахувати концентрацію мутантного гена, що визначає спадкову хворобу в популяції людей міста, області чи країни, отримати інформацію про ефективність профілактичних чи лікувальних заходів, правильно спланувати їх тощо.

Інколи популяційногенетичні дослідження допомагають спеціалістам, далеким від біології, — історикам, етнографам, археологам та іншим. З'ясовуючи частоту розповсюдження на Землі тих чи

інших антигенів крові, вдалося простежити шляхи міграції людей у далекому минулому — циган, норманів та ін.

Отже, генетика популяцій — це надзвичайно цікавий і дуже важливий розділ генетики, основи якого мусить знати кожна освічена людина.

15.2. Популяція — одиниця еволюційного процесу

Всяке біологічне дослідження, писав у свій час Ф. Г. Добжанський, має певну ціну залежно від того, в якій мірі воно сприяє розумінню процесу еволюції. З цієї точки зору генетика популяцій є одним із найцінніших наукових напрямів, бо вона слугує основою сучасних еволюційних теорій.

Біологічна еволюція — це процес змін і дивергенції біологічних форм у плінні часу. **Елементарною одиницею** біологічної еволюції є **популяція**. Такою одиницею не може бути окремих організм, бо він представляє лише одне покоління і не може спадково змінюватись у часі, який в еволюції вимірюється багатьма поколіннями. Індивідуальні варіації, навіть спадкові, можуть не виявлятися у даної особини і навіть у цілого покоління у відповідності з домінантно-рецесивними співвідношеннями алельних генів та з інших причин. Види також не можуть бути елементарними еволюційними структурами, бо вони нерівномірно розподілені у просторі, найчастіше у вигляді локальних популяцій, кожна з яких має свої генетичні особливості і еволюціонує на свій лад. Таким чином, лише популяція відповідає всім вимогам елементарної одиниці еволюційного процесу, і генетичні зміни, що в ній відбуваються протягом поколінь, складають так звану **мікроеволюцію**.

Будь-яку спадкову зміну в популяції називають елементарною еволюційною подією. Вважається, що генетичні процеси, які відбуваються в популяціях, тобто елементарні події мікроеволюції, лежать в основі макроеволюції, яка оперує видами і більш високими таксономічними одиницями.

Популяцією називають певним способом відокремлену від інших сукупність особин одного виду, яких об'єднує спільність походження, місця існування, а також механізмів розмноження і адаптації. Отже, **популяція** — це група організмів одного виду, що заселяє певну територію і розмножується ізольовано від інших популяцій того ж виду.

Генетики користуються поняттями **ідеальних** і **реальних** популяцій. **Ідеальна** популяція складається із безмежної кількості особин, між якими можливі вільні випадкові схрещування без будь-яких обмежень, тобто в такій популяції здійснюється **панміксія**. Така популяція повністю ізольована і на неї не діють ніякі чинники, що можуть змінювати її структуру. Ідеальних популяцій у природі немає. Природні популяції завжди підлягають дії факторів зовнішнього середовища, вони завжди обмежені як чисельністю особин, так і ступенем вираженості панміксії. Остання може бути повною, частково обмеженою і цілком відсутньою за самозапліднення та безстатевого розмноження. Однак поняття ідеальної популяції дуже важливе, бо його використовують для порівняльних оцінок, а також як модель для математичних розрахунків, що так необхідні в генетиці популяцій.

Природні популяції називають **реальними**. Саме вони і є об'єктом безпосереднього вивчення як генетиками, так і іншими спеціалістами. Ці популяції в залежності від способу розмноження особин поділяють на три типи:

- 1) популяції самозапильних рослин і автогамних тварин;
- 2) популяції перехреснозапильних рослин і алогамних тварин;
- 3) популяції форм, що розмножуються вегетативно (апогамне розмноження).

Зрозуміло, що генетична структура цих типів популяцій дуже відрізняється і в кожній з них генетична перебудова у часі йде за своїми власними законами.

*Популяції, що розмножуються статевим способом і в межах яких здійснюються вільні випадкові схрещування, називаються **панміктичними** або **менделівськими**. В них діють менделівські закони успадковування і розщеплення, чого, наприклад, немає в популяціях організмів, що розмножуються вегетативно.*

15.3. Методи вивчення структури популяцій

Дослідження генетичної структури популяції, а також змін (або динаміки) цієї структури за певних умов можна здійснювати різноманітними методами залежно від об'єктів дослідження та його мети. Слід зазначити, що в популяційногенетичних дослідженнях використовується весь арсенал методів, що належить генетиці і деяким іншим наукам.

Серед цих методів основними є: гібридологічний, цитогенетичний, біохімічний, молекулярногенетичний, еколого-фізіологічний та математичний.

Особливе значення мають методи, що дають можливість виявляти алельний склад генних локусів у особин популяції, бо саме так визначають ступінь генетичної гетерогенності останньої. У диплоїдних організмів менделівських популяцій рецесивні алелі в основному знаходяться в гетерозиготному стані і в своїй більшості не проявляються у фенотипі. Для їх виявлення необхідно проводити детальний гібридологічний аналіз, при можливості здійснювати аналізуючі схрещування і т. п. Враховуючи те, що популяційна генетика має справу не з чистими лініями і не з індивідуальними схрещуваннями, а з успадковуванням у великих сукупностях генетично гетерогенних організмів, класичний гібридологічний аналіз не завжди є зручним і можливим. Лише в тих випадках, коли алельні гени взаємодіють за принципом кодомінантності або проміжного успадковування, розподіл особин популяції на фенотипові та генотипові класи не викликає особливих утруднень. Тому, крім класичних гібридологічних методів, застосовують біохімічні та молекулярногенетичні дослідження, які мають ряд переваг у вивченні особливостей фенотипів і генотипів особин популяції. Ці переваги полягають у більш об'єктивних оцінках фенотипів і генотипів, у спостереженні переважно елементарних ознак, у можливості проведення масових аналізів у порівняно короткі строки, використанні комп'ютерної техніки і т. п.

Одним із таких методів, який широко використовується в популяційній генетиці, є **електрофоретичний розподіл** (електрофорез) білків, нуклеїнових кислот та їх фрагментів у поліакриламідному, крохмальному або іншому гелі. Ідея цього методичного підходу полягає в тому, що за наявності в генотипі мутантного гена змінюється структура відповідного фрагмента ДНК і відповідних генних продуктів, внаслідок чого змінюються і їх фізико-хімічні властивості.

Так, наприклад, інша маса і форма РНК та молекул білків за вставок або делецій у відповідних структурних генах, інший заряд поліпептидів за можливих амінокислотних замін, деякі інші структурні перебудови в мутантних генних продуктах можуть істотно впливати на їх електрофоретичну рухливість, що реєструється зміною положення відповідних плям на електрофореграмах. Якщо порівняти електрофореграми даного білка, отримані за дослідження особин генетично гетерогенної популяції, то можна виявити істотні відмінності між гомозиготами і гетерозиготами.

В тому випадку, коли досліджуваний білок є мономером, тобто не має четвертинної структури, на електрофореграмах білків гете-

розигот після специфічного забарвлення виявляється дві смуги (або фракції), в той час як у випадку доміантних та рецесивних гомозигот спостерігається лише по одній фракції на різній відстані від лінії старту, тобто з різними значеннями R_f (рис. 15.1, а).

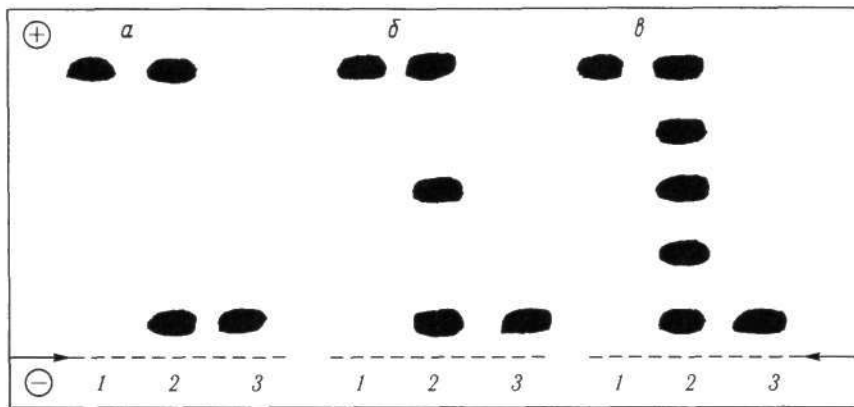


Рис. 15.1. Електрофоретичні варіанти (ізоформи) білків, що кодуються двома генами:

a — білок-мономер; *б* — димер; *в* — тетрамер; 1, 3 — гомозиготи, 2 — гетерозиготи. В усіх випадках стрілка вказує на старт

Якщо білок складається із двох ідентичних субодиниць, то електрофоретичних варіантів цього білка у гетерозиготи буде три. Вони утворюються шляхом вільної перекомбінації згаданих субодиниць (рис. 15.1, б).

Із збільшенням кількості ідентичних і особливо неідентичних субодиниць у молекулі білка з четвертинною будовою зростає кількість його електрофоретичних форм у гетерозиготи і аналіз електрофореграм стає значно складнішим (рис. 15.1, в).

Визначення генетичної гетерогенності популяцій за допомогою електрофоретичного аналізу екстрактів тканин зручно провадити, виявляючи множинні молекулярні форми ферментів, які можна специфічно забарвити (метод зимограм). В цьому випадку інші білки, які є в екстракті тканини, на електрофореграмах не виявляються або їх плями мають інше забарвлення, і це значно полегшує подальший аналіз.

Прикладом таких білків можуть бути індивідуальні ферменти, які виявляються в гелі завдяки здатності цих білків або продуктів їх дії реагувати з субстратами, що дають кольорові реакції. Внаслідок цього множинні молекулярні форми (ММФ) одного фермен-

ту виявляються на електрофореграмах у вигляді забарвлених плям або смуг на різній відстані від лінії старту.

Слід зазначити, що електрофореграми багатьох ферментів виявляють велику кількість забарвлених смуг, які відображують не тільки кількість алельних та неалельних генів, що кодують відповідний мономерний чи полімерний білок. Справа в тому, що можливі біохімічні модифікації субодиниць чи готових молекул ферментів на епігеномному рівні, і це призводить до значного збільшення кількості їх ММФ. З урахуванням механізмів виникнення ММФ у клітині їх поділяють на **ізоферменти** та **біохімічні модифікації**.

Серед ізоферментів (ізозимів) іноді виділяють **алоферменти** або **алозими** — білки з однаковою каталітичною функцією, але такі, що кодуються різними алельними генами.

Оскільки чітко розмежування ізозимів і алозимів не завжди можливе, зручно всі ізоферменти називати **ізоформами**. Зрозуміло, що виявити гомозиготність чи гетерозиготність відповідних локусів за наявності біохімічних модифікацій генних продуктів значно складніше. В цих випадках необхідні додаткові дослідження з використанням інших методів, наприклад, гібридологічного аналізу, визначення первинної структури досліджуваних білків і т. п. Слід, однак, зазначити, що модифіковані форми ферментів можуть бути досить інформативним показником взаємодії генів у окремих особин популяції і адаптивної здатності генотипів.

Електрофоретичний метод оцінки ступеня гетерозиготності особин популяції значно ефективніший, ніж вивчення їх різноманітності за морфологічними чи фізіологічними ознаками. Проте існують ММФ ферментів з однаковою або дуже близькою електрофоретичною рухливістю, що зменшує розрізняльні можливості цього методу, бо в цих випадках неповністю враховуються можливі варіанти алельних генів, що є в популяції. Це буває, наприклад, у випадку таких амінокислотних замін, які не впливають на електричний заряд відповідного білка-мутанта. Можливі також варіанти алелів, що відрізняються нуклеотидами в третьому положенні кодонів. У зв'язку з виродженістю коду генетичний зміст кодонів при цьому може й не змінитися і загальний вигляд електрофореграм залишається без змін, незважаючи на наявність точкових мутацій у генах. Особливо важко виявити у гетерозигот так звані нульові алелі, що несуть нонсенс-мутації. Це пов'язано з відсутністю відповідного активного білка в клітинах таких особин.

Існують і інші причини, що зменшують розрізняльну здатність електрофоретичного аналізу білків. Ці утруднення часто можна усунути, якщо провадити електрофорез не цілих білкових молекул в їх суміші, а пептидів, отриманих протеолізом відповідних ізолюва-

них білків. Дуже добрі результати дає при цьому двомірний електрофорез або двомірна хроматографія. Цей метод, який ще називають **методом пептидних карт** або методом «відбитків пальців» із-за хаотичного розташування плям на електрофореграмах, в поєднанні з методами вивчення амінокислотного складу окремих пептидів дає

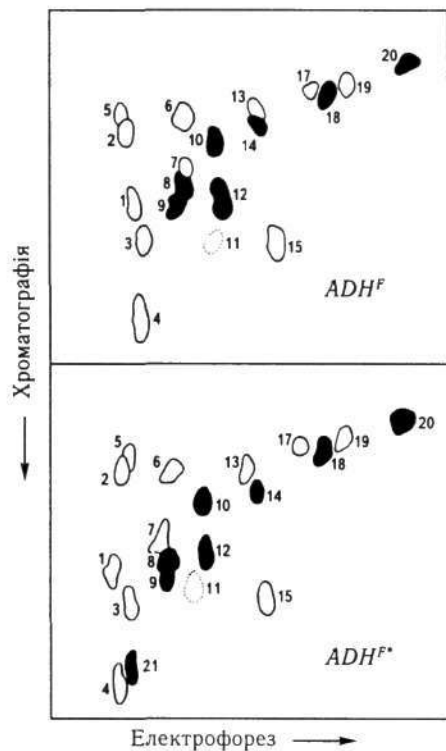


Рис. 15.2. «Відбитки пальців» (fingerprinting) двох ферментів алкогольдегідрогенази:

За звичайного електрофорезу ці два ферменти (ADH^F і ADH^{F*}) розпізнати не можна. Метод «відбитків пальців» виявляє наявність у складі ADH^{F*} ще одного пептиду (21)

Крім згаданих, є чимало інших методів, що дають можливість виявляти спадкові порушення в структурі окремих білків і визначати ступінь поширення відповідних мутацій серед особин популяції.

змогу не тільки виявити мутацію, але й досить точно локалізувати її. В 1957 році В. М. Інгрем, автор цього методу, розщепив трипсином молекулу гемоглобіну людини на 15 пептидів і розділив отриману суміш за допомогою електрофорезу і хроматографії, проведених у двох взаємно перпендикулярних напрямках. Автор показав, що аномалія, характерна для серповидноклітинного гемоглобіну (HbS), локалізована в шостому положенні β -поліпептидного ланцюга його молекули. Глутамінова кислота, яка займає це положення в нормальному гемоглобіні, у хворих серповидноклітинною анемією виявилася заміненою на валін, що призвело до істотної зміни в положенні однієї із плям на пептидній карті. Це був перший випадок, коли причина одного із генетичних захворювань, що розповсюджене серед деяких популяцій людини, була з'ясована на молекулярному рівні.

Як приклад, схема одної із пептидних карт («відбитки пальців») показана на рис. 15.2.

З відкриттям ферментів рестриктаз, що розрізають ланцюги ДНК у специфічних місцях, і розробкою методів радіоактивних зондів, стало можливим виявляти і локалізувати мутації безпосередньо на рівні ДНК. Одним із таких методів, що сьогодні широко використовується, є метод визначення **поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ)** молекул ДНК. При цьому у різних особин популяції порівнюють кількість та електрофоретичну рухливість отриманих рестрикційних фрагментів геномної ДНК, а конкретні гени і їх фрагменти визначають шляхом їх гібридизації із специфічними радіоактивними зондами.

В останні роки в генетиці популяцій успішно застосовують також методи з використанням ПЛР — полімеразної ланцюгової реакції (розділ 13.3.1). Остання лежить в основі багатьох сучасних методик визначення поліморфізму ДНК, серед яких — геноспецифічна ПЛР, ПЛР з застосуванням неспецифічних праймерів (RAPD-ПЛР), ПЛР з мікро- і мінісателітними праймерами (SSR- і ISSR-ПЛР), дослідження поліморфізму довжин ампліфікованих фрагментів ДНК тощо.

Особливо важливе значення для генетичної оцінки популяції мають математичні методи з використанням комп'ютерної техніки.

15.4. Генетична гетерогенність природних популяцій, її визначення та оцінка

Природні популяції організмів у своїй переважній більшості **генетично гетерогенні**, тобто складаються із особин з різними генотипами. Ця генетична неоднорідність популяцій в першу чергу пояснюється явищем існуючого в них множинного алелізму і постійним виникненням нових (здебільшого рецесивних) алелей генів у мутаційному процесі. Саме мутації є первинним джерелом генотипової мінливості організмів. Слід зазначити, що мутаційний процес діє на кожну популяцію незалежно від способу розмноження її особин. Тому мутаційна мінливість вносить істотний вклад у генетичну структуру як менделівських, так і неменделівських популяцій.

Якщо припустити, що якийсь ген знаходиться в популяції у вигляді лише двох алелей — домінантного (A) і рецесивного (a), то особини менделівської популяції за алельним складом відповідного локуса хромосом поділяться на три класи: гомозиготні доміанти (AA), гетерозиготи (Aa) і гомозиготні рецесиви (aa). В дійсності

ген у популяції може бути представлений значно більшою кількістю алельних варіантів, тому кількість генотипових класів також може бути значно більшою трьох.

Співвідношення гомозигот та гетерозигот у популяції залежить від багатьох причин і в першу чергу від способу розмноження (статевого чи нестатевого, перехресного запилення чи самозапилення), від чисельності особин у популяції, виду мінливості, темпу і напрямку добору, типу ізоляції і таке інше. Безумовно, ступінь гетерозиготності завжди вищий у випадку панміктичної популяції, в той час як популяції самозапильних рослин в основному складаються із особин чистих (тобто гомозиготних) ліній. Останнє встановив датський фізіолог рослин і генетик В. Йогансен. Його класична робота «Про успадковування в популяціях і чистих лініях» була початком досліджень у галузі генетики популяцій. Вивчаючи успадковування ознак ваги і розмірів насіння у самозапильних рослин (ячмінь, горох, квасоля), Йогансен на протязі 6—7 поколінь відбирав важкі і легкі насінини від кожної рослини окремо, тобто провадив добір у межах чистих ліній. Наслідком цих дослідів був чіткий висновок про те, що добір у чистих лініях не має сенсу, оскільки мінливість у межах чистої лінії в основному є неспадковою, модифікаційною. Отже, *популяції автогамних рослин і тварин складаються із чистих, але генетично різноманітних ліній, які не схрещуються між собою і не обмінюються генетичною інформацією. Зміна генетичної структури таких популяцій здійснюється головним чином за рахунок мутаційного процесу й добору спадково відмінних ліній і клонів, які мають певні адаптивні переваги за даних умов.*

Отже, кожний автогамний організм може бути засновником нової раси, підвиду і виду, а також сорту або породи. Слід зазначити, що висока гомозиготність у чистих лініях не може бути абсолютною, бо навіть у популяціях рослин-самозапильників (наприклад, пшениці, томатів та ін.) з тою чи іншою частотою трапляється перехресне схрещування і відбувається обмін новою інформацією. Крім того, вже за одне покоління в чистих лініях самозапильників виникає істотна кількість різноманітних мутацій, що порушують гомогенність згаданих ліній. Саме тому сорти рослин-самозапильників через декілька поколінь втрачають частину своїх сортових якостей і потребують сортооновлення.

Вегетативне розмноження агамних (тобто таких, що не утворюють статевих клітин) організмів (деякі найпростіші гриби, водорості) призводить до виникнення клонів відповідних клітин або організмів. *Клон — це сукупність нащадків, що походять від одного попередника. Отже, популяція організмів, які розмножуються лише вегетативним способом, складається із окремих*

клонів. Генетична структура кожного клону, ступінь його гомозиготності чи гетерозиготності визначаються особливостями генотипу попередника, тобто вихідної батьківської форми. Цілком зрозуміло, що особини кожного окремого клону в ідеалі повинні мати однакові генотипи, в той час як генотипи різних клонів можуть істотно відрізнятися. Слід, однак, зауважити, що навіть у межах одного клону можлива генетична неоднорідність організмів у зв'язку з виникненням мутантних форм.

Якщо в популяціях алогамних організмів об'єктами добору є певні лінії, то в популяціях з вегетативним розмноженням особин генетична адаптація здійснюється шляхом виживання краще пристосованих клонів.

У випадку алогамних організмів популяція формується шляхом вільного схрещування різностатевих особин з різними генотипами, тобто на основі панміксії. Отже, *різноманітність генотипів панміктичної популяції є наслідком не тільки мутаційної, але й комбінаційної мінливості*. В такій популяції доля особин того чи іншого генотипу в кожному поколінні визначається частотою утворення відповідних зигот і, отже, співвідношенням різних класів гамет у загальній їх кількості. Фактично це означає, що ознаки і властивості особин зберігаються і розподіляються в популяції за закономірностями розповсюдження алейних і неалельних генів. Ці закономірності, як відомо, встановлені ще Г. Менделем і Т. Морганом. На їх підставі було з'ясовано основні правила розповсюдження генів і генотипів у менделівських популяціях.

Алейні гени, що виникають у популяціях внаслідок мутацій, у переважній більшості є рецесивними по відношенню до гена дикого типу і тому фенотипово проявляються лише у гомозигот. Останні в популяції вищеплюються лише за достатньо високої концентрації гетерозигот, у складі яких мутантні гени, що виникають, зберігаються і розмножуються. Саме тому природні менделівські популяції виявляються насиченими різними мутаціями, які найчастіше знаходяться у гетерозиготному стані. Вірогідність гомозиготизації цих мутантних генів тим менша, чим більша чисельність особин популяції.

На ці та деякі інші особливості панміктичних популяцій вперше звернув увагу С. С. Четвериков, роботи якого виявилися провісниками сучасних популяційно-генетичних уявлень. Висновки цього вченого про *генетичну гетерогенність природних популяцій*, а також численні дослідження інших авторів (Д. Джонс і Є. Іст, Р. Фішер, С. Райт, М. П. Дубінін, Д. Д. Ромашов, С. М. Гершензон та ін.) привели до виникнення в науці так званої *балансової моделі* структури менделівської популяції. Згідно з останньою в популяції не існує стандартних генів «дикого» типу. Більшість генних локусів, а може

й усі, що є в хромосомах особин, зайняті генами, що належать до серій множинних алелів. Еволюційні зрушення в популяції йдуть не шляхом добору якогось гена, а шляхом добору багатьох генів, алелі яких перебувають у певному співвідношенні (балансі) один до одного.

Зазначена балансова модель структури менделівської популяції досить добре пояснює накопичені сучасною генетикою факти в протилежність іншій, класичній, моделі, що існувала в науці до праць С. С. Четверикова. **Класична модель**, що виникла під впливом переконливих досліджень В. Йогансена, базувалась на уявленні, що природні популяції головним чином є сукупністю гомозигот по домінантних (диких) алелях, бо саме домінантні гени, як тоді вважалося, мають селективну перевагу. В подальшому з'ясувалося, що домінантні гомозиготи досить часто поступаються життєздатністю іншим генотипам, особливо гетерозиготам. Вважають, що широке розповсюдження останніх у популяціях призводить до виникнення явища **гетерозису** (гібридної могутності) у ряду особин. Слід зазначити, що гетерозиготний стан алельних генів може виявляти більшу адаптивність навіть тоді, коли мутантний алель є напівлетальним або летальним. Прикладом може бути ген серповидноклітинної анемії, який в гомозиготному стані ($Hb^S Hb^S$) призводить до смерті людей ще у дитячому віці. Проте гетерозиготи, що несуть цей алель ($Hb^A Hb^S$) і частково виявляють ознаки хвороби, значно рідше хворіють тропічною малярією. Внаслідок цього на фоні останньої здійснюється добір гетерозигот, кількість яких у популяції може стати значно більшою, ніж гомозигот $Hb^A Hb^A$. Це явище виявлено в деяких країнах північної Африки та тропічної Азії.

Таким чином, генетична гетерогенність менделівських популяцій не є випадковістю. Вона є результатом цілком передбачуваних генетичних процесів, що здійснюються за певними правилами і законами. Висока гетерозиготність цих популяцій сприяє збереженню в них множинного алелізму і збільшує їх адаптивний, а, отже, й еволюційний потенціал.

15.5. Деякі показники генетичної мінливості популяцій

Кількісну оцінку генетичної мінливості популяцій провадять на підставі двох показників — поліморфності (P) і гетерозиготності (H).

Ці показники можна вирахувати після виявлення алельних і неалельних генів у особин популяції шляхом вивчення їх морфоло-

гічних, біохімічних, молекулярногенетичних, цитологічних та інших фенотипових проявів. Для популяційної генетики, яка має справу з великими вибірками особин, класичний метод — визначення груп комплементарності — є трудомістким і незручним. Більш ефективними є методи сучасної біохімії і молекулярної біології.

Після того, як проведені необхідні спостереження та дослідження (їх бажано провадити із врахуванням найбільшої кількості показників і на якомога більшій вибірці), визначають кількість **мономорфних** (без алельних варіантів) і **поліморфних** (з алельними варіантами) генних локусів як у окремих особин, так і у всіх особин вибірки, і розраховують значення поліморфності або поліморфізму.

Поліморфність (P) популяції — це доля поліморфних локусів із числа всіх досліджених.

Припустимо, що з допомогою електрофорезу проведено аналіз генотипів *D. pseudoobscura* по 20 різних локусах і знайдено, що із них 8 представлених в популяції серіями множинних алелів, а 12 локусів не виявляють мінливості. В цьому випадку поліморфність популяції складатиме:

$$P = \frac{8}{20} = 0,4 \text{ або } 40\%.$$

Приблизно саме таким виявився показник поліморфізму природних популяцій *D. pseudoobscura* за електрофоретичного розподілу ізоформ ферментів у крохмальному гелі. Оскільки різні популяції одного виду ступенем поліморфізму можуть істотно відрізнятися, то розраховують **середню поліморфність**, яка є усередненим значенням окремих визначень. Так, наприклад, якщо відповідним чином аналізувати чотири популяції дрозофіли і поліморфність цих популяцій дорівнюватиме 0,38, 0,36, 0,32 і 0,34, то середня поліморфність складе:

$$P_{\text{сер}} = \frac{0,38 + 0,36 + 0,32 + 0,34}{4} = 0,35.$$

Рівень поліморфізму популяцій у різних видів організмів дуже відрізняється. Найменша кількість поліморфних локусів виявлена у птахів, найбільша — у морських безхребетних. У людини, за даними Ф. Фогеля і А. Мотульського, поліморфними є 28,2% локусів. За даними Г. Харріса і деяких інших авторів, у кавказької, негроїдної і монголоїдної рас людей доля поліморфних локусів досягає 30%. Яке ж значення має генетичний поліморфізм для біологічних систем?

Існує думка, що наявність у клітині двох або більшої кількості ізоформ білка є механізмом гомеостазу, що забезпечує більш ви-

соку адаптивність у широкому діапазоні навколишніх умов. Цьому дуже сприяє явище наддомінантності ($Aa > A$), яке обумовлює явище гетерозису.

За множинного алелізму, що є в популяції, можлива її адаптація до певних умов середовища шляхом добору найбільш сприятливих алельних генів, їх сукупностей або комплексів. Саме цей процес є основою так званої **генетичної (філогенетичної) адаптації**. В протилежність цьому **онтогенетична адаптація** здійснюється головним чином через механізми регуляції функцій наявних у генотипі генів.

Добір тих чи інших алельних генів за генетичної адаптації популяції визначається найбільш сильними і постійно діючими факторами зовнішнього середовища. Про це свідчать серйозні географічні (або **клінальні**) відмінності в розповсюдженні тих чи інших алелей одного гена. Відомо, що алельний склад локусів естерази, алкогольдегідрогенази та інших ферментів у популяціях рослин та тварин закономірно змінюється з півночі на південь. Виявлена залежність розповсюдження у популяціях певних алелей від температури, клімату, сезону року, вихідної генетичної структури популяції та інших причин (табл. 15.1).

Таблиця 15.1

Частота алельних варіантів (AdhF і AdhS) гена алкогольдегідрогенази за різних умов утримання експериментальних популяцій *D. melanogaster* (В. М. Тоцький, Н. Д. Хаустова, Н. А. Стрельцова)

Умови експерименту, покоління	Лінії популяції	n	Частота генотипів		
			AdhF/AdhF	AdhF/AdhS	AdhS/AdhS
Стандартні	<i>cn</i>	50	0	0	1
	<i>vg</i>	50	1	0	0
F_0	<i>cn'</i>	50	0	$0,06 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,05$
	<i>vg'</i>	50	$0,92 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,04$	0
F_{30}	<i>cn'</i>	80	$0,28 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$
	<i>vg'</i>	85	$0,52 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,04$	0
Селекція на затримку старіння (F_{30})	<i>cn'</i>	86	0	0	1
	<i>vg'</i>	78	$0,05 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,05$
Селекція на стійкість до гіпертермії (F_{30})	<i>cn'</i>	92	0	$0,09 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,05$
Селекція на стійкість до етанолу (F_{30})	<i>cn'</i>	98	$0,72 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,03$
	<i>vg'</i>	95	1	0	0

Примітка. *cn*, *vg* — мухи вихідних мутантних ліній; *cn'*, *vg'* — мухи експериментальних популяцій.

Однією з причин генетичного поліморфізму природних популяцій є так звані **нейтральні мутації**, виникнення яких не змінює або

майже не змінює функцію відповідних білків С Райт, М П Дубінін, Д Д Ромашов та інші прийшли до висновку, що саме така мінливість, яка не підлягає добору, може бути основою не тільки мікроеволюції, але й макроеволюції В 1969 р Дж Кінг і Т Джунс запропонували назвати цей процес «недарвінівською еволюцією» Мається на увазі, що поряд з еволюцією, яка здійснюється під спрямовуючим впливом добору, в молекулах ДНК накопичуються перетворення шляхом випадкової фіксації нейтральних мутацій Ці мутації виникають внаслідок можливих неточностей у роботі ферментів реплікації, рекомбінації, репарації тощо, а основним механізмом їх розповсюдження в популяції є генетико-автоматичні процеси (дрейф генів), що постійно відбуваються в популяції і які будуть розглядатися трохи далі

Отже, рядом вчених визнається існування неадаптивної еволюції структур ДНК, що йде одночасно з дарвінівською еволюцією Таким чином, принципи «недарвінівської еволюції», які виникли на підставі досягнень молекулярної генетики, не суперечать класичним ідеям Ч Дарвіна, а доповнюють їх

Все сказане свідчить про те, що показник генетичного поліморфізму є одним із мірил генетичної мінливості популяцій, від якої залежать їх адаптивні та еволюційні можливості Однак слід зважити на те, що методи визначення поліморфності мають певні недоліки

По перше, деякі ізоформи білків, що кодуються різними алельними генами, не відрізняються електрофоретичною рухливістю, і, отже, не можуть бути визначені методом зимограм

По-друге, кількість виявлених поліморфних локусів дуже залежить від кількості досліджуваних організмів, тобто від вибірки

По третє, генетична мінливість локусів не однакова, однак показник поліморфності цього не відображує Локус вважають поліморфним, якщо найбільш поширений його алель зустрічається не більш як у 95% досліджених особин, а у 5% або у більшій кількості генотипів виявляються інші алелі При цьому, на жаль, не враховується, скільки конкретно різних алелів даного гена є в популяції Припустимо, що до одного з локусів відносяться два алелі з частотами 0,95 і 0,05, а до другого — 20 алелів з частотами 0,05 кожний Зрозуміло, що генетична мінливість по другому локусу значно більша, однак за 95% критерієм обидва локуси в однаковій мірі вважаються поліморфними

Більш надійним показником генетичної мінливості може слугувати *середня частота особин, гетерозиготних по певних локусах*, тобто *гетерозиготність (H) популяції* Цю величину *вираховують відношенням гетерозигот до загальної кількості досліджених генотипів* Спершу визначають частоти особин, гетерозиготних по

кожному локусу, а потім вираховують середнє арифметичне, яке приймається за середню гетерозиготність популяції (табл 15 2)

Таблиця 15 2

Розрахунок середньої гетерозиготності ($H_{сер}$) по п'яти локусах

Локус	Число особин		Гетерозиготність локуса (H)
	гетерозиготних	всього	
1	40	200	$40/200 = 0,20$
2	34	200	$34/200 = 0,17$
3	82	200	$82/200 = 0,41$
4	16	200	$16/200 = 0,08$
5	0	200	$0/200 = 0$
			$H_{сер} = 0,17$

Ступінь гетерозиготності є надійною мірою генетичної мінливості популяції, дає можливість об'єктивно оцінити її адаптивні можливості. Як правило, гетерозиготність призводить до кращої життєздатності особин. Саме з гетерозиготністю пов'язують широко поширене у природі явище гетерозису, а також збереження в популяції множинного алелізму, який є основою генетичної адаптації.

Слід, однак, пам'ятати, що реальна гетерозиготність популяцій дуже коливається залежно від багатьох причин і в першу чергу від ступеня панмісії. Для популяцій автогамних тварин та рослин-самозапилюючих, які в переважній більшості складаються із гомозигот, реальна гетерозиготність взагалі не може бути показником генетичної мінливості. З урахуванням цих обставин визначають так звану очікувану гетерозиготність для даного локуса, яка б могла бути у популяції за умов повної панмісії. Для цього загальну кількість досліджуваних генотипів з даним локусом приймають за 1 (100%) і віднімають від неї теоретично можливі частоти відповідних гомозигот у менделівській популяції. Як буде показано далі, частота гомозигот у такій популяції дорівнює частоті відповідного алельного гена, зведений у квадрат (a^2). Якщо в популяції існує чотири алелі для даного локуса, і їх частоти складають a_1, a_2, a_3 і a_4 , то очікувана гетерозиготність по цьому локусу буде дорівнювати

$$H_{ок} = 1 - (a_1^2 + a_2^2 + a_3^2 + a_4^2)$$

Наведемо конкретний приклад. Якщо частоти чотирьох алелів відповідно складають 0,50, 0,30, 0,10 і 0,10, то очікувана гетеро-

зиготність локуса

$$H_{\text{оч}} = 1 - (0,50^2 + 0,30^2 + 0,10^2 + 0,10^2) = 0,64.$$

В табл. 15.3 наведено дані щодо гетерозиготності 10 локусів із 71, яких досліджували у представників європейської популяції людини. Всього, за даними авторів, було знайдено 20 поліморфних і 51 мономорфний локус, а середня гетерозиготність складала 0,067.

Таблиця 15.3

Гетерозиготність деяких локусів у популяції європейців за даними електрофорезу (по *H. Harris, D. A. Herkinson*)

Локус	Відповідний фермент	Гетерозиготність
ACPI	Кисла фосфатаза	0,52
PGM1	Фосфоглюкомутаза-1	0,36
PGM2	Фосфоглюкомутаза-2	0,38
AK	Аденілаткіназа	0,09
PEPA	Пептидаза-A	0,37
PEPC	Пептидаза-C	0,02
PEPD	Пептидаза-D	0,02
ADA	Аденозіндезаміназа	0,11
PGD	6-фосфоглюконатдегідрогеназа	0,05
AMY2	Амілаза (підшлункова залоза)	0,09
$H_{\text{сер}}$ по 71 дослідженому локусу		0,067

Якщо прийняти цифру 0,067 за середню гетерозиготність популяції людини, то варто розглянути цей показник практично. Вважають, що геном людини утримує як мінімум 30 000 структурних генів, і, отже, кожна людина гетерозиготна в середньому по $30\,000 \times 0,067 = 2010$ локусах. Теоретично можливе число різних типів гамет у такої людини складатиме 2^{2010} , оскільки гетерозигота по n локусів утворює 2^n різних гамет. Таку велетенську чисельність (10^{605}) важко собі уявити. Досить сказати, що загальна кількість протонів і нейтронів у Всесвіті не перевищує 10^{76} . Цілком зрозуміло, що потенційна комбінаційна мінливість організмів ніколи не реалізується, але вона складає невичерпний резерв еволюційного процесу.

Ще один параметр, який використовується для оцінки генетичної мінливості, називається **ефективним числом алелей** (n_e). З гетерозиготністю (H) цей показник пов'язаний формулою:

$$n_e = 1/(1 - H),$$

тобто n_e — це величина, зворотна долі гомозиготних локусів. Якщо спостерігається зростання генетичної мінливості із-за збіль-

шення в популяції числа алельних генів даного локуса, і це зростання мінливості необхідно оцінити кількісно, то використовують показник n_e , а не H .

Наведемо приклад подібного розрахунку. Хай в популяції відбувся перехід від двох алелей, кожний з яких зустрічався з частотою 0,5, до чотирьох алелей, частота кожного з яких склала 0,25. Гетерозиготність у випадку двох вихідних алелей, розрахована за вже відомою нам формулою, складе: $H = 1 - (0,5^2 + 0,5^2) = 0,5$. З утворенням чотирьох алелей гетерозиготність значно зросте: $H' = 1 - (0,25^2 + 0,25^2 + 0,25^2 + 0,25^2) = 0,75$. Кількісна оцінка цього зростання за відношенням показників гетерозиготності $H'/H = 0,75/0,50 = 1,50$ буде неточною. В дійсності перехід від двох алелей, що зустрічаються в популяції з однаковою частотою, до чотирьох являє собою подвоєння генетичної мінливості. Саме це й виявляється за рахунок ефективного числа алелей. За наявності двох алелей

$$n_e = \frac{1}{1-H} = \frac{1,0}{0,5} = 2.$$

З виникненням чотирьох алелей

$$n'_e = \frac{1}{1-H'} = \frac{1,0}{1-0,75} = 4.$$

Кількісне порівняння (відношення) цих величин $n'_e/n_e = 4/2 = 2$ свідчить про збільшення генетичної мінливості вдвоє, що і було в дійсності.

Слід зазначити, що середня поліморфність (P), середня гетерозиготність (H) та інші показники генетичної мінливості популяцій значно коливаються у різних видів. Так, наприклад, безхребетні тварини в середньому генетично більш мінливі, ніж хребетні, а самозапильні рослини у цьому відношенні значно поступаються перехреснозапильним.

15.6. Частоти генів та генотипів у популяції

За вивчення генетичної будови та мінливості популяцій дуже важливим є поняття **генофонду**.

Генофондом популяції називається сукупність генів усіх її особин. Для диплоїдних організмів генофонд популяції із N особин складається із $2N$ гаплоїдних геномів. Особини цієї популяції містять $2N$ генів кожного локуса і N пар гомологічних хромосом. Включення складають статеві хромосоми і зчеплені зі статтю гени,

які у гетерогаметних особин можуть бути представлені лише одним екземпляром.

Мінливість генофонду виражається або частотами генів, або частотами генотипів. За частоту алельного гена приймають відношення його кількості у всіх особин популяції до загальної суми генів, що є в даному локусі цих особин.

Частота генотипу — це його доля (частка) в загальній сукупності особин популяції.

Безпосередньо ми спостерігаємо лише фенотипи, а не генотипи чи гени. Однак, якщо співвідношення між генотипами і відповідними фенотипами не викликає сумніву, то із частот спостережених фенотипів можна легко розрахувати частоти генотипів, а потім і частоти алельних генів.

Зробимо це на прикладі груп крові системи MN. Існує три групи крові — M, N і MN, які визначаються двома алелями одного локуса — L^M і L^N .

За обстеження 730 аборигенів Австралії у 22 чоловік була знайдена група крові M, у 216 — MN і у 492 — N. Зрозуміло, що генотипи цих людей — відповідно $L^M L^M$, $L^M L^N$ і $L^N L^N$.

Частоту кожного генотипу визначають відношенням кількості людей з відповідною групою крові до загальної суми обстежених. Отже, частота генотипу $L^M L^M$ (група крові M) складе $22/730 = 0,030$, частота генотипу $L^M L^N$ (група крові MN) — $216/730 = 0,296$, а доля генотипу $L^N L^N$, розрахована тим же способом, дорівнює 0,674. Якщо обстежені люди складають випадкову і репрезентативну (тобто досить значну) вибірку корінного населення Австралії, то наведені частоти генотипів можна вважати характеристикою мінливості генофонду всіх аборигенів материка. Як показали дослідження, частота одного і того ж генотипу і відповідних алельних генів дуже різна в окремих популяціях (табл. 15.4).

Таблиця 15.4

Частоти генотипів і алельних генів по групах крові системи MN в різних популяціях людини (Ф. Айала, Дж. Кайгер)

Популяція	Кількість людей з групами крові				Частоти генотипів			Частоти алелів	
	M	MN	N	Всього	$L^M L^M$	$L^M L^N$	$L^N L^N$	L^M	L^N
Аборигени Австралії	22	216	492	730	0,030	0,296	0,674	0,178	0,822
Індіанці навахо	305	52	4	361	0,845	0,144	0,011	0,917	0,083
Білі США	1787	3039	1303	6129	0,292	0,496	0,213	0,539	0,461
Іспанці	726	1677	697	3100	0,234	0,541	0,225	0,505	0,495

Частоти алелів можна визначити або через число представників різних генотипових класів, або через частоти генотипів. У першому випадку необхідно підрахувати кількість алелів досліджуваного типу у всіх особин вибірки і поділити її на загальну кількість усіх алелів даного локуса. В наведеному прикладі популяції людей з генотипами $L^M L^M$, $L^M L^N$ і $L^N L^N$ загальна кількість алельних генів у досліджуваному локусі складає $2N = 730 \times 2 = 1460$. Індивіди з генотипом $L^M L^M$ утримують по два алелі L^M , генотипи $L^M L^N$ — по одному алелю L^M і L^N , генотипи $L^N L^N$ — по два алелі L^N . Кількість алелів L^M у наведеній вибірці аборигенів дорівнює $(22 \times 2) + 216 = 260$, а частота алеля L^M складе $260/1460 = 0,178$. Аналогічно можна розрахувати частоту алеля L^N : $[(492 \times 2) + 216]/1460 = 0,822$.

Враховуючи те, що гомозиготи утримують по два однакових алелі, а гетерозиготи — по одному алелю кожного типу, частоти алелів можна також легко вирахувати із частот генотипів. У цьому випадку частота досліджуваного алеля буде дорівнювати частоті відповідних гомозигот у сумі з половиною частоти гетерозигот (Aa). В нашому прикладі частота алеля L^M , розрахована за цим способом, складе: $0,030 + 0,296/2 = 0,178$, а частота алеля L^N — $0,674 + 0,296/2 = 0,822$.

Якщо кількість алелів даного локуса в популяції більша двох, то розрахунок частот алелів ґрунтується на тих же правилах. Як приклад можна навести частоти генотипів по локусу *Lap5* у *D. willistoni*. Ген *Lap5* кодує фермент лейцинамінопептидазу; кожен алель цього гена можна ідентифікувати за показником електрофоретичної рухливості відповідного поліпептиду (табл. 15.5). Як видно з наведе-

Таблиця 15.5

Частоти генотипів по локусу *Lap5* у популяції *Drosophila willistoni* (Ф. Айала)

Генотип (за рухливістю поліпептидів)	Число особин з цим генотипом	Частота генотипу
98/98	2	0,004
100/100	172	0,344
103/103	54	0,108
98/100	38	0,076
98/103	20	0,040
100/103	214	0,428
Всього	500	1,000

деної таблиці, за зазначеним показником виявляються три алелі *Lap5*, які в різних комбінаціях утворюють шість генотипів.

Виходячи із частот цих генотипів (табл. 15.5), легко розрахувати частоти алельних генів за вже відомою нам методикою.

Слід зазначити, що мінливість генофонду часто зручніше вимірювати частотою алелів, а не генотипів, бо різних алелів завжди значно менше, ніж генотипів. Якщо алелів даного локуса два, то кількість можливих генотипів — три; якщо алелів три, то генотипів шість; за чотирьох алелів можливе утворення десяти генотипів. За n алелів одного локуса кількість можливих генотипів розраховують за формулою: $n(n + 1)/2$.

15.7. Закон Харді—Вайнберга

Якщо провести порівняльний аналіз генетичної будови споріднених популяцій, які спочатку були генетично ідентичними, але протягом поколінь утримувалися в різних умовах, то можна виявити істотні відмінності в показниках гетерозиготності і поліморфізму, частот окремих генотипів і алельних генів тощо. Виникає питання, чим пояснити подібні зрушення, — чи то особливостями процесів успадковування в популяції, чи впливом на її генетичну структуру чинників зовнішнього середовища. Чітку і однозначну відповідь на це запитання дали незалежно один від одного англійський математик Х. Харді і німецький лікар В. Вайнберг у 1908 році. На підставі математичного аналізу ці автори встановили, що *в ідеальній панміктичній популяції частоти алельних генів, а отже і генотипів, залишаються незмінними від покоління до покоління*. Таким чином, процес успадковування як такий не впливає на частоту алелів у популяції і можливі зміни її генетичної будови є наслідком інших причин. В цьому і полягає основний зміст **закону Харді—Вайнберга**, який слугує основним знаряддям для аналізу генетичних процесів, що здійснюються у популяціях.

Математичне виведення цього закону ґрунтується на засадах, які витікають із законів Г. Менделя, праць Т. Моргана та інших генетиків: частоти алельних генів визначають частоти відповідних гамет, а частоти гамет — частоту генотипів. Х. Харді і В. Вайнберг виходили з того, що частота генотипів у популяції пов'язана з частотою алельних генів простими (квадратичними) співвідношеннями.

Якщо в ідеальній панміктичній популяції якийсь гіпотетичний локус містить два алельних гени — домінантний (A) і рецесивний (a), то, позначивши відповідно концентрацію (частоту) цих алелів бук-

вами p і q , суму останніх у популяції можна визначити як $p + q = 1$, звідки $p = 1 - q$, а $q = 1 - p$. Частота гамет, що несуть алелі A і a , відповідно буде складати pA і qa . За вільного сполучення цих гамет в умовах панміксії частота генотипів дорівнює $(pA + qa)^2 = p^2AA + 2pqAa + q^2aa$, в чому легко переконатися, скориставшись решіткою Пеннета:

	Частоти гамет у самців	
Частоти гамет у самок	pA	qa
	Частоти генотипів	
pA qa	p^2AA $pqAa$	$pqAa$ q^2aa

Отже, сума зазначених частот генотипів у популяції складає:

$$p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1.$$

Якщо в популяції для даного гена існує три алелі з частотами відповідно $p + q + r = 1$, то частоти генотипів також відповідають формулі біноміального розподілу: $(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$. За ще більшої кількості алелів розрахунок частот генотипів здійснюється за подібною формулою, але з відповідно більшою кількістю членів у біномі.

В тому, що частота алельних генів A і a в ідеальній популяції з плином поколінь не змінюється, легко переконатися, якщо в біномі $(pA + qa)^2$ підставити конкретні числа. Хай у батьківського покоління $pA = 0,4$, а $qa = 0,6$. Тоді частота генотипів в F_1 буде такою: $(0,4A + 0,6a)^2 = 0,4^2AA + 2 \times 0,4 \times 0,6Aa + 0,6^2aa = 0,16AA + 0,48Aa + 0,36aa$. Розрахуємо в F_1 частоту генів A і a , виходячи із частот генотипів:

$$pA = 0,16 + \frac{0,48}{2} = 0,4; \quad qa = 0,36 + \frac{0,48}{2} = 0,6.$$

Отже, з плином одного покоління частота алельних генів у популяції не змінилася. Продовжуючи розрахунки, переконаємось, що співвідношення A і a залишається незмінним і в подальших поколіннях.

З цього ж розрахунку видно, що за панміксії рівновага частот генотипів по будь-якому локусу досягається вже в першому поколінні. Однак це буває тоді, коли співвідношення частот алелів у самців і самок батьківського покоління однакове. Якщо ж частоти алелів у особин різної статі не співпадають (що може бути за пев-

них умов у реальних популяціях), то рівновага у співвідношеннях частот алелів і генотипів по аутосомних локусах у популяції настає не зразу, а в наступних поколіннях.

Ще один дуже важливий висновок із закону Харді—Вайнберга полягає в тому, що *чим менша частота алеля у популяції, тим більша доля цього алеля знаходиться в гетерозиготному стані*. Оскільки частота рецесивного алеля у популяції дорівнює q , то частота рецесивних алелів у складі гетерозигот — pq (половина від $2pq$), а у складі гомозигот — q^2 . Відношення цих частот $pq/q^2 = p/q$. Ця величина за малих значень q приблизно складає $1/q$. Зрозуміло, що чим менше значення q , тим більше число отримаємо за даною формулою. Так, наприклад, частота людей, що хворіють алкаптонуриєю, складає $q^2 = 0,000\ 001$, тобто один хворий на 1 млн населення. Частота гетерозигот $2pq$ — біля 0,002. Отже, число рецесивних генів алкаптонурії (a) у гетерозигот приблизно в 1000 разів перевищує вміст цього алеля у гомозигот.

15.8. Практичне використання формули Харді—Вайнберга

Закон Харді—Вайнберга є дієвим у відношенні ідеальних популяцій, які безмежно чисельні, панміктичні і не зазнають ніякого впливу з боку чинників зовнішнього середовища. Очевидно, що жоден з цих параметрів не витримується у випадку природних популяцій, на які постійно діють зовнішні і внутрішні фактори. Ступінь порушень генетичної рівноваги таких популяцій визначають, скориставшись формулою Харді—Вайнберга, за якою можна збудувати математичну модель ідеальної популяції з заданою частотою генів. Щоб добре зрозуміти, як це робиться, скористаємося конкретним прикладом.

Припустимо, що мисливцями певного материка за сезон здобуто 16 000 шкурок лисиць, з них рудих (AA) — 10 400, чорно-бурих (Aa) — 4900 і чорних (aa) — 700. Перед нами випадкова і досить значна вибірка популяції лисиці. Слід визначити, чи в задовільному стані знаходилася ця популяція до промислу і чи можна вважати виправданим її промислове використання. Для відповіді на ці запитання слід знати, яким було б співвідношення зазначених трьох генотипів лисиць у вибірці, якби популяція була ідеальною. Отже, слід збудувати математичну модель ідеальної популяції з тими ж частотами алельних генів, що є в реальній вибірці. Частоту але-

лей A і a у наведеній вибірці розрахуємо через частоту генотипів (табл. 15.6):

Таблиця 15.6

Генетична структура досліджуваної популяції лисиць

Генотип (та фенотип)	Кількість особин	Частота генотипів	Частота алелів (гамет)
AA (руді)	10 400	$10\,400/16\,000 = 0,65$	$pA = 0,65 + 1/2 \times 0,30 = 0,80$ $qa = 0,05 + 1/2 \times 0,30 = 0,20$
Aa (чорно-бурі)	4900	$4900/16\,000 = 0,30$	
aa (чорні)	700	$700/16\,000 = 0,05$	
Всього	16 000	1,00	1,00

Тепер, скориставшись формулою Харді—Вайнберга, розрахуємо кількість особин відповідних генотипових класів в аналогічній вибірці ідеальної популяції:

$$p^2AA = (pA)^2 \times 16\,000 = 0,80^2 \times 16\,000 \approx 10\,240;$$

$$2pqAa = 2(pA)(qa) \times 16\,000 = 2 \times 0,8 \times 0,2 \times 16\,000 = 5120;$$

$$q^2aa = (qa)^2 \times 16\,000 = 0,2^2 \times 16\,000 = 640.$$

Отже, аналогічна за чисельністю вибірка із ідеальної популяції складалася б із 10 240 рудих, 5120 чорно-бурих і 640 чорних лисиць, і приблизно таке ж співвідношення шкурок повинно бути в здобутку мисливців. За допомогою методу χ^2 переконуємось, що розподіл особин між окремими класами лисиць у даній реальній популяції достовірно не відрізняється від теоретично розрахованого ($p > 0,50$). Практично це означає, що генетична структура досліджуваної популяції лисиць не порушена і можна вести промисел у цій популяції.

Дуже важливо, що закон Харді—Вайнберга дає змогу розрахувати частоти деяких генів і генотипів навіть тоді, коли не всі генотипи у вибірці можуть бути ідентифіковані внаслідок домінантності певних алелей.

Нехай в якійсь людській популяції частота альбіносів (aa) складає 0,0001; генотипи нормально пігментованих людей — AA і Aa . Згідно з законом Харді—Вайнберга, частота гомозигот aa дорівнює q^2 . В нашому прикладі $q^2 = 0,0001$, звідки $q = \sqrt{0,0001} = 0,01$. Оскільки $p = 1 - q$, то $p = 1,00 - 0,01 = 0,99$. Частоти нормально пігментованих людей складають $p^2 = 0,99^2 = 0,98$ для генотипу AA і $2pq = 2 \times 0,99 \times 0,01 \approx 0,0198$ для генотипу Aa .

За допомогою формули Харді—Вайнберга можна розрахувати частоту алельних генів і в тих випадках, коли існує множинний але-

лізм. За приклад можемо взяти локус з трьома алельними генами, які визначають групи крові системи АВО. Припустимо, що в якійсь популяції спостерігаються наступні частоти груп крові:

$$\begin{aligned} \text{А (генотипи } I^A I^A \text{ і } I^A i^o) &= 0,45 \\ \text{В (генотипи } I^B I^B \text{ і } I^B i^o) &= 0,13 \\ \text{АВ (генотип } I^A I^B) &= 0,06 \\ \text{О (генотип } i^o i^o) &= 0,36. \end{aligned}$$

Якщо позначити частоту алелів I^A , I^B і i^o буквами p , q і r , то згідно з законом Харді—Вайнберга, частота генотипу $i^o i^o = r^2$, звідки $r = \sqrt{0,36} = 0,6$.

Частоти генотипів з цими алельними генами складають:

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1.$$

Легко помітити, що сумарна частота груп крові В і О дорівнює $(q + r)^2$, а сумарна частота груп А і О — $(p + r)^2$. Знаючи величину r , легко знайти інші величини.

У випадку генів, зчеплених зі статтю, врівноважені частоти генотипів у гомогаметної статі теж підлягають формулі $p^2 AA + 2pq Aa + q^2 aa = 1$. Частоти генотипів і фенотипів гетерогаметних особин, у яких є лише одна хромосома X, співпадають з частотами відповідних алелей: p для А і q для а. Отже, фенотипи, що визначаються рецесивними генами статевих хромосом, у гетерогаметних самців зустрічаються набагато частіше, ніж у гомогаметних самок (у самців частота рецесивних фенотипів дорівнює q , у самок — q^2 , співвідношення цих величин $q/q^2 = 1/q$).

Дуже важливо те, що за частотою фенотипів гетерогаметної статі можна розрахувати частоту всіх алельних генів і генотипів у популяції. Так, наприклад, якщо рецесивний ген є зчепленим з X-хромосомою, то, знаючи частоту спадкової хвороби серед чоловіків, можна розрахувати кількість гетерозиготних жінок.

Наведемо конкретний приклад. Частота рецесивного зчепленого зі статтю гена, що визначає наявність дальтонізму у чоловіків (нездібність розпізнавати червоний і зелений кольори), складає 0,08. Це означає, що частота рецесивного алеля (q) в популяції дорівнює 0,08. Частота домінантного (А) алеля $p = 1 - q = 1 - 0,08 = 0,92$. Знаючи частоти алельних генів, легко вирахувати частоти генотипів у популяції за формулою Харді—Вайнберга. Доля гетерозигот у нашому випадку $2pq = 2 \times 0,92 \times 0,08 = 0,147$. Подібні розрахунки вкрай необхідні для визначення розповсюдженості генів тих чи інших спадкових захворювань у популяції з метою планування та проведення профілактичних чи лікувальних заходів.

15.9. Фактори динаміки генетичної структури популяцій і мікроеволюція

Природна популяція завжди підлягає тиску тих чи інших чинників, які з часом призводять до змін і дивергенції біологічних форм. В основі генетичної мінливості популяцій лежать процеси мутаційної та комбінаційної мінливості, які є причиною змін частот алелів і генотипів. Цілком очевидно, що ці процеси можуть супроводжуватися певними відхиленнями від формули Харді—Вайнберга. Найбільш значні порушення генетичної структури популяцій спричиняють такі фактори:

1. Відсутність або обмеження панміксії;
2. Значне обмеження чисельності популяцій (дрейф генів);
3. Міграція особин (змішування популяцій або потік генів);
4. Мутаційний процес (тиск мутацій);
5. Вплив добору.

Зрозуміло, що на реальну популяцію діють якщо не всі, то принаймні декілька цих найважливіших факторів, проте вирішальне значення може мати один із них. Тому є сенс розглянути дію кожного з факторів зокрема.

15.9.1. Відсутність або обмеження панміксії

Як відомо, вільні випадкові схрещування, тобто панміксія, відсутні в популяціях рослин-самозапильників і автогамних тварин. Вже зазначалося, що такі популяції в основному складаються із чистих ліній. Переконатися в цьому можна на такому простому прикладі. Уявімо собі, що поодинокі самозапильні рослини (Aa) є засновником (F_0) нової популяції (F_1), яка складається лише із чотирьох рослин ($1AA + 2Aa + 1aa$), кожна з яких теж дасть по 4 нащадки (F_2):

F_1		F_2
1AA		4AA
2Aa	→	2AA + 4Aa + 2aa
1aa		4aa
		Всього в F_2 6AA + 4Aa + 6aa Співвідношення генотипів 3AA : 2Aa : 3aa

Кожна із рослин F_2 дасть по 4 дочірніх рослини в F_3 :

F_2	F_3	
6AA 4Aa 6aa	24AA 4(1AA + 2Aa + 1aa) 24aa	→ 24AA 4AA + 8Aa + 4aa 24aa
	Всього в F_3 Співвідношення генотипів	28AA + 8Aa + 28aa 7AA : 2Aa : 7aa

Для наглядності зведемо ці результати до табл. 15.7. Наведені дані свідчать про те, що за самоzapлiднення з кожним поколінням доля гетерозигот у популяції зменшується наполовину, а частота гомозигот невпинно зростає, поки вся популяція не розпадеться на чисті лінії. Математично долю гетерозигот у такій популяції можна визначити як $2pq \times (1/2)^n$, де n — число поколінь, а $2pq$ — частота гетерозигот в F_0 . Отже, повна відсутність панміксії істотно впливає на співвідношення генотипів; частоти алельних генів при цьому не змінюються. Легко розрахувати, що у восьмому поколінні гетерозиготність популяції за самоzapлiднення зберігається на рівні $(1/2)^8 = 1/256 = 0,37\%$, тобто досягається майже повна гомозиготність. Ця особливість самоzapлiднення використовується за виведення нових сортів і ліній.

Таблиця 15.7

Наслідки самоzapлiднення в популяції гетерозигот (Aa)

Покоління (F)	Кількість особин	Співвідношення генотипів AA:Aa:aa	Частоти		Частота алеля a
			гетерозигот (Aa)	гомозигот (AA + aa)	
F_0	1	0:1:0	1,0	0,0	0,5
F_1	4	1:2:1	1/2 (2/4)	1 - 1/2 = 1/2	0,5
F_2	16	3:2:3	1/4 (2/8)	1 - 1/4 = 3/4	0,5
F_3	64	7:2:7	1/8 (2/16)	1 - 1/8 = 14/16	0,5
...					
F_n	4^n	$(2^n - 1):2:(2^n - 1)$	$(1/2)^n$	$1 - (1/2)^n$	0,5
∞	∞	1/2:0:1/2	0	1	0,5

Реальним менделівським популяціям завжди властива панміксія, однак дуже часто вона буває обмеженою. Може бути порушена випадковість схрещувань, і особини з певними генотипами (подібними чи різними) злучаються між собою частіше, ніж цього варто чекати на основі теорії ймовірності. Ці так звані **асортативні схрещування** самі не змінюють частот генів, але змінюють частоти генотипів.

Дуже важливою формою асортативного схрещування є **інбридинг**, за якого схрещування між спорідненими особинами трапля-

ються значно частіше, ніж це прогнозує теорія ймовірності. Самим крайнім виявом інбридингу є самозапліднення. Слід зазначити, що якщо для автогамних організмів інбридинг — природне явище, то наявність інбридингу в менделівських популяціях не бажана, бо це супроводжується вищепленням шкідливих рецесивних алелів у гомозиготному стані. В людських популяціях це проявляється збільшенням частоти тих чи інших спадкових хвороб, а в загальнобіологічному сенсі — виникненням **інбредної депресії**, тобто зниження життєздатності — енергії росту, плодючості, продуктивності тощо.

Мірою гомозиготизації (або інбредності) окремої особини слугує коефіцієнт інбридингу (F), який вказує на ймовірність знаходження в даному локусі двох ідентичних за походженням алелів, тобто двох точних копій одного із генів, що знаходився в генотипі одного із прабатьків цієї особини. Якщо спільні предки не інбредовані, то цей коефіцієнт можна розрахувати за спрощеною формулою С. Райта:

$$F = (1/2)^{n_s + n_d + 1},$$

де F — коефіцієнт інбридингу досліджуваної особини, n_s — кількість поколінь від батька до спільного предка A (враховуючи і його), n_d — кількість поколінь від матері до A (враховуючи і його). На рис. 15.3 наведена схема схрещування або родовід, де рідні брат і сестра (сисби C і D) дали нащадка E . Необхідно визначити коефіцієнт інбридингу F .

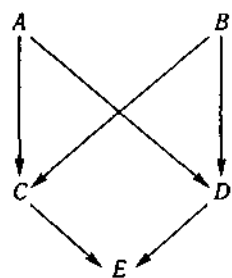


Рис. 15.3. Родовід нащадка від схрещування брата і сестри

Кожна стрілочка на малюнку означає одне покоління. Кожного батька (C і D) від спільного предка A відділяє лише одне покоління, тому за формулою С. Райта $F = (1/2)^{1+1+1} = (1/2)^3 = 1/8$. Фактично це означає, що саме з такою ймовірністю нащадок E буде гомозиготним по одному із двох алелів, що були у спільного предка A .

Така ж ймовірність гомозиготизації по одному із двох можливих алелів, що були в генотипі спільного предка B . Тому ймовірність того, що в нашому прикладі внук E буде гомозиготою по одному із чотирьох теоретично можливих алелів даного локуса (два різних алелі у A і два інших алелі у B), складатиме $1/8 + 1/8 = 1/4$.

Коефіцієнти інбридингу для нащадків від схрещування особин, що знаходяться у різних родинних зв'язках, представлені в табл. 15.8.

Якщо в популяції частина особин розмножується самозаплідненням або близькородинним схрещуванням, а інші схрещуються ви-

падково, то ступінь інбредності популяції (коефіцієнт інбридингу) відображує ступінь надлишку в популяції особин, гомозиготних по досліджуваному локусу, або збільшення долі гомозиготних локусів у генотипах окремих особин. Отже, коефіцієнт інбридингу (F) дає певне уявлення про інбредну депресію популяції, яка корелює з інтенсивністю вищеплення гомозигот.

Таблиця 15.8

Коефіцієнт інбридингу (F) нащадків від родинних схрещувань

Тип схрещувань	F
Самозапилення	1/2
Сибси (брати і сестри)	1/4
Дядя × небога, тітка × небіж, або «подвійні» двоюрідні брати і сестри	1/8
Двоюрідні брати і сестри	1/16
Триюрідні брати і сестри	1/64
Чотириюрідні брати і сестри	1/256

Підсумовуючи, зазначимо деякі найважливіші наслідки інбридингу для популяції і окремих особин. Отже, за інбридингу спостерігається:

1. Підвищення ступеня гомозиготизації в менделівських популяціях і виникнення чистих ліній в умовах самоzapліднення;

2. Вищеплення рецесивних гомозигот і фенотиповий вияв рецесивних алелів генів, в тому числі летальних, напівлетальних і ослаблюючих життєздатність;

3. Виникнення інбредної депресії, тобто ослабленої середньої життєздатності особин панміктичної популяції, пов'язаної з негативними ефектами рецесивних алелів;

4. Підвищення фенотипової мінливості особин популяції внаслідок прояву рецесивних генів у складі гомозигот;

5. Втрати нащадками деяких генів, що входили в генотип спільного предка, за високої гомозиготизації цих нащадків шляхом штучного інбридингу і постійного добору на певну ознаку предка в інтересах селекції.

Незважаючи на істотні негативні наслідки інбридингу в менделівських популяціях, близькородинні схрещування займають важливе місце в селекційному процесі. Це пов'язано з тим, що інбридинг дає можливість виявити, зберегти і множити в поколіннях цінні спадкові задатки, що спостерігались у далеких чи близьких предків.

15.9.2. Обмеження чисельності популяцій (дрейф генів)

Випадковим дрейфом генів або генетичним дрейфом називають зміну частот алелів у ряду поколінь, яка провокується випадковими причинами, наприклад, вираженим падінням чисель-

ності популяції. Останнє може бути наслідком міграції невеликої за кількістю сукупності особин з наступною їх ізоляцією, вираженим впливом на популяцію зовнішніх умов, включаючи антропогенні фактори, епізоотії, епіфітотії тощо.

Зазначимо, що вірне уявлення про чисельність популяції дає не загальна кількість особин популяції, а так звана **ефективна чисельність**, яка визначається кількістю особин, що здатні дати початок наступному поколінню. Це пояснюється тим, що генофонд наступного покоління складається із розмаїття генів попередніх батьківських форм, а не всіх особин, що були в популяції.

Дрейф генів (або просто дрейф) — це абсолютно випадковий генетично-автоматичний процес, за якого частота того чи іншого алельного гена в популяції різко зменшується або, навпаки, дуже зростає. Як приклад розглянемо дуже маленьку панміктичну популяцію, в якій генотипи представлені у співвідношенні $1AA + 2Aa + 1aa$, тобто у відповідності з формулою Харді—Вайнберга. Якщо припустити, що в утворенні наступного покоління приймають участь усі особини, то ймовірність утворення батьківських пар за панміксії можна розрахувати з допомогою табл. 15.9.

Неважко переконатися, що ймовірність злучення однакових гомозигот ($AA \times AA$ або $aa \times aa$) у даному випадку складає $1/16$.

Однак, із-за тієї чи іншої випадковості це злучення може і не відбутися. Вірогідність відсутності такого злучення в розрахунку на існуючі два класи гомозигот складе $1/16 + 1/16 = 1/8$ на одне покоління. Отже, можна чекати, що за випадкового незлучення гомозигот певного класу всього через вісім поколінь у популяції зовсім зникне відповідний алель (A або a). Цей процес зміни частот генів у малочисельних популяціях, зобов'язаний випадковому злученню пар за розмноження, називають **дрейфом генів** або **генетичним дрейфом**.

Не слід вважати, що за дрейфу генів зміна частот алелів відбувається в усіх поколіннях в одному напрямку. Випадковість цього процесу призводить до того, що концентрація одного і того ж алеля може значно коливатися від покоління до покоління. Однак, якщо популяція не дуже мала, то навіть незначні зміни частот алелів можуть накопичуватися протягом поколінь, тобто виявляти **кумулятивний ефект**. Врешті решт це може призвести до явища

Не слід вважати, що за дрейфу генів зміна частот алелів відбувається в усіх поколіннях в одному напрямку. Випадковість цього процесу призводить до того, що концентрація одного і того ж алеля може значно коливатися від покоління до покоління. Однак, якщо популяція не дуже мала, то навіть незначні зміни частот алелів можуть накопичуватися протягом поколінь, тобто виявляти кумулятивний ефект. Врешті решт це може призвести до явища

Таблиця 15.9

Вірогідність утворення батьківських пар різними генотипами в малій за чисельністю панміктичній популяції

Матері \ Батьки	Батьки		
	1AA	2Aa	1aa
1AA	1	2	1
2Aa	2	4	2
1aa	1	2	1

фіксації алеля, частота якого у популяції в цьому випадку досягне 1 або 0. Таким чином, один із алелів витісняє із популяції всі інші алелі. Вплив дрейфу генів на цьому закінчується, поки в результаті мутації не виникне новий алель.

Роль дрейфу генів у змінах генетичної будови популяції швидко зменшується з ростом її ефективної чисельності. Це видно з того, що частота гетерозигот у популяції внаслідок дрейфу генів зменшується за одне покоління на величину $K = 1/2N$, де K — доля, на яку зменшується частота гетерозигот і зростає частота гомозигот; N — ефективна чисельність популяції.

Якщо дрейф генів йде на користь алеля, що зменшує пристосованість особин, то популяція за рахунок негативного добору може зменшуватись аж до повного вимирання. Однак іноді за дрейфу генів виникають особини, які відрізняються від інших високою пристосованістю до навколишніх умов та деякими іншими властивостями. Такі особини, на думку деяких авторів, можуть еволюціонувати в нові різновидності і навіть види. Виникнення нової популяції із поодиноких або дуже малочисельних особин такого виду Е. Майр назвав «ефектом засновника». Популяції багатьох видів, які сьогодні заселяють острови океанів і нараховують мільйони особин, часто походять від однієї або декількох особин, що колись випадково туди потрапили. Аналогічна ситуація може скластися в деяких озерах, ізольованих лісах та інших екологічних ізолятах. Внаслідок випадковості вибірки генотипів «засновників» частоти генів у новоутвореній популяції можуть істотно відрізнитися від цих частот у популяції, із якої походять «засновники». Це може обумовити зовсім інший шлях еволюції новоутвореної популяції.

Випадкові зміни частот алелів, подібні тим, що обумовлені «ефектом засновника», виникають і тоді, коли популяція в процесі еволюції різко зменшується, майже вмирає, а потім знову відновлює свою чисельність шляхом розмноження нечисленних особин, що виживають за несприятливих умов (ефект «пляшкової шийки»). В таких популяціях у період найменшої чисельності (проходження «пляшкової шийки») здійснюється дрейф генів, внаслідок чого їх частоти істотно змінюються, і ці зміни впливають на подальший розвиток популяції. Не виключено, що відмінності між популяціями людини щодо частот алелів груп крові системи АВО та деяких інших генів могли виникнути, принаймні частково, внаслідок ефектів «засновника» і «пляшкової шийки». Історія людства знає немало прикладів, коли окремі племена, народності і навіть народи були на грані повного знищення (криваві війни, епідемії, інші стихійні лиха), але потім відновлювали свою чисельність за рахунок тих, хто залишався живим, та мігрантів.

15.9.3. Міграції особин або потік генів

Міграція або потік генів — це переміщення особин із однієї популяції в іншу з наступною участю їх у процесах розмноження. Потік генів не впливає на частоти алелів у виду в цілому, однак у локальних популяціях вони можуть істотно змінюватись, якщо мігранти відрізняються від старожилів аельним складом відповідних локусів. Міграції можуть бути активними і пасивними (наприклад, перенос насіння вітром або птахами). Іноді людина навмисно частково змішує популяції для отримання цінних гібридних форм. Включення переселенців в історично сформовані популяції аборигенів нерідко трапляються і у людей. Так було за освоєння європейцями Африки, Америки, Австралії і т. ін.

Зміни частот алелів у популяції, що приймає мігрантів, тим значніші, чим більша доля прибулих і чим істотніше вони генетично відрізняються від старожилів.

Розглянемо найпростіший випадок впливу імміграції на зміну в популяції частот двох алелів A і a . Хай доля прибулих у популяції складає m , тоді наступне покоління отримує від старожилів долю генів, яка дорівнює $1 - m$, а від мігрантів — m . Припустимо, що у прибульців середня частота алеля A складає p , тоді як у місцевій популяції його вихідна концентрація дорівнює p_0 . Тоді в наступному поколінні частоту алеля A в місцевій популяції можна виразити рівнянням:

$$p_1 = (1 - m)p_0 + mp = p_0 - m(p_0 - p).$$

Отже, нова частота алеля (p_1) дорівнює вихідній (p_0) мінус доля мігрантів (m), помножена на різницю частот алеля у старожилів і прибульців. Зміна частоти (Δp) за одне покоління складає:

$$\Delta p = p_1 - p_0.$$

Підставивши в це рівняння шойно знайдене значення p_1 , отримаємо:

$$\Delta p = p_0 - m(p_0 - p) - p_0 = -m(p_0 - p).$$

Отже, чим більша доля новоприбулих у популяції і чим значніша різниця частот алелів між ними і старожилами, тим більша швидкість зміни частот алелів у данній популяції. Існує формула, яка дозволяє розраховувати частоту алеля A в популяції після n поколінь, якщо в кожному з них здійснювались імміграції певної значимості (m) і якщо відомі вихідні частоти алелів (p_0 і p):

$$p_n = (1 - m)^n(p_0 - p) + p.$$

З допомогою цієї формули можна знайти не тільки частоту алельного гена в популяції в даний момент (p_n) за постійних міграцій в минулому, але й тривалість міграцій, виражену кількістю поколінь (n), і її інтенсивність або, що те ж саме, інтенсивність потоку генів (m).

15.9.4. Мутаційний процес (тиск мутацій)

Хоча спонтанні мутації генів трапляються з невисокою частотою, їх сумарна роль у генетиці популяцій і в еволюції дуже велика. Мутаційний процес є первинним джерелом генетичної мінливості. Він забезпечує виникнення нових алельних генів і є основою генетичної гетерогенності популяцій. Із-за наявності мутаційного процесу абсолютно чисті (гомозиготні) лінії у природі не можуть існувати принаймні протягом довгого часу. Якщо ж уявити собі популяцію, в якій усі особини гомозиготні по гену A ($p = 1$, $q = 0$), то через деякий час частина домінуючих алелів A перетвориться в рецесивні алелі a за рахунок мутаційного процесу ($A \rightarrow a$). Якби мутації здійснювалися лише в одному напрямку, то рано чи пізно всі гени A перетворилися б у рецесивні алельні форми a . В цьому випадку значення p впало би до нуля, а значення q досягло б одиниці. Однак одночасно з прямими мутаціями ($A \rightarrow a$) здійснюються і зворотні ($a \rightarrow A$). Прийmemo, що частота прямих мутацій за покоління дорівнює u , а ймовірність зворотних — v . Тоді зміна частоти алеля A в популяції за покоління складатиме

$$\Delta p = vq - up.$$

Зміна частот алелів у популяції внаслідок різної частоти прямих і зворотних мутацій називається **мутаційним тиском**. Слід зазначити, що за мутацій збільшується частота того алельного гена, в напрямку якого мутаційний процес іде з більшою вірогідністю.

При цьому частоти алелів змінюються до тих пір, поки vq не стане дорівнювати up . Як тільки ці величини зрівняються ($vq = up$), тиск мутацій зникне і наступить стан рівноваги генних частот. Виходячи із рівняння $vq = up$, можна знайти значення, за якого настає згадана рівновага і мутаційний процес перестає змінювати генетичну структуру даної популяції:

$$up = vq = v(1 - p),$$

отже

$$p(u + v) = v, \quad p = \frac{v}{u + v}, \quad \text{а} \quad q = \frac{u}{u + v}.$$

Візьмемо конкретний приклад, коли $v=3 \cdot 10^{-5}$, а $u=1 \cdot 10^{-5}$. В цьому випадку $q = \frac{1 \cdot 10^{-5}}{(1 \cdot 10^{-5}) + (3 \cdot 10^{-5})} = 0,25$ і відповідно $p=1-0,25=0,75$.

Слід зазначити, що рівноважний стан популяції може бути досягнутий лише за досить високих вихідних значень p і q . Більшість мутацій, що заново виникають у популяції, приречені на швидку елімінацію (табл. 15.10), однак деякі з них можуть зберігатися про-

Таблиця 15.10

Ймовірність збереження і зникнення поодинокі мутації в панміктичній популяції за відсутності добору (по Фішеру)

Покоління	Ймовірність	
	збереження	зникнення
1	0,632	0,368
3	0,374	0,626
7	0,209	0,791
15	0,113	0,887
31	0,059	0,941
63	0,030	0,970
127	0,015	0,985
∞	0,000	1,000

тягом ряду поколінь. Це створює умови для збільшення частоти тих чи інших мутантних генів у популяції завдяки їх підхопленню добром або внаслідок їх випадкового дрейфу.

15.9.5. Вплив добору

Добір поділяють на природний і штучний. **Природним добром** називають процес виживання тих організмів, які завдяки особливостям їх генотипів найбільш пристосовані до навколишніх умов і залишають найбільшу кількість нащадків. Іншими словами, природний добір — це диференційоване відтворення різних варіантів генотипів за даних умов. В процесі природного добору організми пристосовуються до умов середовища.

Штучний добір відрізняється від природного тим, що він здійснюється людиною на її розсуд з метою отримання нових сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів. Природний добір відбувається в природних умовах під впливом факторів середовища, але без цілеспрямованого втручання людини. Друга особливість штучного добору полягає в тому, що людина може відібра-

ти потрібні їй генотипи в значно коротший час, обмежити або повністю виключити випадкові схрещування, штучно збільшити мутаційну мінливість і т. п.

Отже, кожен з доборів має свої особливості, які необхідно враховувати.

Природний добір являє собою найважливіший фактор еволюції, про що вперше сповістили в 1858 р. Ч. Дарвін і А. Р. Уолес. Вичерпні докази того, що еволюція здійснюється шляхом природного добору, були представлені Ч. Дарвіном у його роботі «Походження видів» (1859). Серед усіх факторів динаміки генетичної структури популяції природний добір вважають єдиним чинником, що направляє еволюцію живої природи у певне русло. Дійсно, жоден з розглянутих нами раніше факторів (інбридинг, мутагенез, міграції, дрейф) не приводить до підвищення пристосованості організмів. Кожен з них змінює частоти алелів у популяції незалежно від того, як це впливає на адаптацію організмів до навколишніх умов. У зв'язку з тим, що згадані процеси є випадковими щодо їх впливу на пристосованість організмів, вони самі по собі можуть призводити до руйнування організації і зменшення адаптивності живих істот. В протилежність цьому природний добір — це процес, який сприяє підвищенню їх адаптованості і системної організації.

Кількісним мірилом інтенсивності природного добору слугує дарвінівська або відносна пристосованість, яку іноді ще називають селекційною або адаптивною цінністю. Цей показник відображує ефективність розмноження данного генотипу. Ймовірність дати нащадків визначається багатьма властивостями організму — його здатністю виживати (життєздатністю), швидкістю розвитку і тривалістю репродуктивного періоду, здатністю схрещуватися, плодючістю і таке інше.

Ці величини називають **компонентами** або **складовими пристосованості**. З них найважливішими є показники виживання (життєздатності) і плодючості.

В табл. 15.11 показано, як розраховується пристосованість (позначається буквою W) у випадку трьох генотипів по одному локусу: AA , Aa і aa . Найчастіше приймають за одиницю ($W = 1,0$) пристосованість генотипу, який залишає найбільшу кількість нащадків. Всі інші генотипи, що поступаються за цією ознакою, матимуть відносну пристосованість меншу, ніж одиниця ($W < 1,0$).

Як видно з таблиці, спершу вираховують середню чисельність нащадків, що приходяться на одну особину кожного з генотипів. Потім середнє число нащадків для кожного генотипу поділяють на середнє число нащадків найкращого (тобто найбільш пристосованого) генотипу.

Відмінність генотипів по пристосованості обумовлюється їх відмінностями по окремих компонентах цієї властивості (життєздатності, плодючості тощо). Природний добір оцінює лише сумарну

Таблиця 15.11

Розрахунок пристосованості генотипів, якщо відома кількість нащадків кожного

	Генотип			Всього
	AA	Aa	aa	
Кількість особин у вихідному поколінні (<i>a</i>)	30	60	10	100
Кількість нащадків у наступному поколінні (<i>b</i>)	60	108	10	178
Середня кількість нащадків на одну особину (<i>b/a</i>)	$60/30 = 2$	$108/60 = 1,8$	$10/10 = 1$	
Пристосованість (<i>W</i>)	$2/2 = 1$	$1,8/2 = 0,9$	$1/2 = 0,5$	
Коефіцієнт добору (<i>S</i>)	0	0,1	0,5	

або загальну пристосованість, яку вираховують як добуток окремих складових. Так, наприклад, якщо виживання (за даних умов) особин певного генотипу дорівнює 0,9, а плодючість — 0,7, то загальна пристосованість генотипу $W = 0,9 \times 0,7 = 0,63$.

Іншим дуже важливим мірилом інтенсивності природного добору слугує різниця пристосованості порівнюваних генотипів або так званий коефіцієнт добору (*S*). Останній визначає швидкість зменшення в популяції того чи іншого генотипу і вираховується за формулою $S = 1 - W$.

У випадку, представленому в табл. 15.11, коефіцієнт добору (*S*) складає для генотипу AA — 0, для Aa — 0,1 і для aa — 0,5. Фактично це означає, що нащадки з генотипом AA за даних умов усі виживатимуть, а генотипи Aa і aa в кожному поколінні вилучаються із популяції пропорційно зазначеним коефіцієнтам добору. Отже, з кожним поколінням частота генотипів AA буде збільшуватися (позитивний добір), а частота генотипів Aa і aa буде зменшуватися (негативний добір).

В популяціях гаплоїдних організмів, у яких проявляються і домінуючі, і рецесивні гени, зміну частот алелів під впливом добору розрахувати легко. Якщо частоту алеля, який забезпечує у вихідній популяції більш високу пристосованість особин, позначити буквою p_0 , а частоту алеля, що призводить до меншої пристосованості, — буквою q_0 , то в наступному поколінні перший з цих алелів зустрі-

чатиметься з частотою $p_0 + p_0S$, а другий — з частотою $q_0 - q_0S$, де S — коефіцієнт добору.

Значно складніше розрахувати наслідки дії добору на розподіл алельних генів і генотипів у популяціях диплоїдних організмів. У цьому випадку можуть виникати різні ситуації залежно від того, яким саме генотипам сприятиме добір, який тип взаємодії між досліджуваними алельними генами (повне чи неповне домінування, кодомінування, наддомінування). Як приклад розглянемо лише один випадок — коли є повне домінування, і добір в однаковій мірі сприяє особинам, які несуть домінуючий ген у гомозиготному та гетерозиготному стані, тобто коли добір йде проти гомозиготних рецесивів. Розподіл генотипів до добору і після добору в цьому випадку буде таким (табл. 15.12):

Таблиця 15.12

Зміна частот генотипів і алельних генів за одне покоління за добору проти гомозиготних рецесивів

Показники	Генотипи			Всього	Частота алеля a
	AA	Aa	aa		
Вихідна частота	p_0^2	$2p_0q_0$	q_0^2	1	q_0
Пristосованість (W)	1	1	$1 - S$		
Частота в наступному поколінні після добору	p_0^2	$2p_0q_0$	$q_0^2(1 - S)$	$1 - Sq_0^2$	$q_0^2(1 - S) + p_0q_0$
Нормалізована частота після добору	$\frac{p_0^2}{1 - Sq_0^2}$	$\frac{2p_0q_0}{1 - Sq_0^2}$	$\frac{q_0^2(1 - S)}{1 - Sq_0^2}$	1	$q_1 = \frac{q_0 - Sq_0^2}{1 - Sq_0^2}$
Зміна частоти алеля a					$\Delta q = \frac{-Sp_0q_0^2}{1 - Sq_0^2}$

З наведених даних випливає, що частота гена A після добору

$$p_1 = \frac{p_0^2 + p_0q_0}{1 - Sq_0^2}, \text{ а зміна її частоти за покоління}$$

$$\Delta p = p_1 - p_0 = \frac{p_0^2 + p_0q_0}{1 - Sq_0^2} - p_0,$$

$$\Delta p = \frac{p_0^2 + p_0q_0}{1 - Sq_0^2} - \frac{p_0^2 + p_0q_0}{1} = \frac{(p_0^2 + p_0q_0) \cdot Sq_0^2}{1 - Sq_0^2},$$

і оскільки $p_0^2 + p_0q_0 = p_0$, то $\Delta p = \frac{Sp_0q_0^2}{1 - Sq_0^2}$. За малих значень Sq_0^2

$$\Delta p \approx Sp_0q_0^2.$$

Частоту алеля a після одного покоління добору (q_1) можна підрахувати, сумуючи частоту гомозигот aa з половиною частоти

гетерозигот Aa :

$$q_1 = \frac{q_0^2(1-S)}{1-Sq_0^2} + \frac{p_0q_0}{1-Sq_0^2} = \frac{q_0^2 + p_0q_0 - Sq_0^2}{1-Sq_0^2} = \frac{q_0 - Sq_0^2}{1-Sq_0^2}.$$

Зміна частоти алеля a за покоління

$$\Delta q = q_1 - q_0 = \frac{q_0 - Sq_0^2}{1-Sq_0^2} - q_0 = \frac{-Sq_0^2(1-q_0)}{1-Sq_0^2}.$$

Оскільки $1 - q_0 = p_0$, то $\Delta q = \frac{-Sp_0q_0^2}{1-Sq_0^2}$. За малих значень Sq_0^2

$$\Delta q = -Sp_0q_0^2.$$

З наведених формул видно, що Δp — це величина із знаком плюс, а Δq — число від'ємне. Отже, за добору проти рецесивних гомозигот частота алеля A , тобто величина p , в популяції зростає, а частота алеля a , тобто величина q , зменшується.

Із рівнянь $\Delta p = Sp_0q_0^2$ і $\Delta q = -Sp_0q_0^2$ видно, що *найефективніше добір діє за середніх значень p і q ; якщо ж одне з цих значень мале, то дія добору може бути малозначною*. Отже, перш ніж дія добору стане ефективною у відношенні шойно виникаючих у популяції мутантних генів, їх частота мусить спочатку значно зрости внаслідок тиску мутацій або дрейфу генів. Це особливо важливо для рецесивних мутантних генів у популяціях диплоїдних організмів у зв'язку з тим, що добір у цьому випадку може діяти лише на рецесивні гомозиготи, які вищеплюються внаслідок схрещування гетерозиготних генотипів. Зрозуміло, що ймовірність схрещувань $Aa \times Aa$ у великій популяції за низької частоти рецесивного алеля надзвичайно мала, тому гомозигот aa , на які добір діє, також дуже мало.

Швидкість зміни генетичної будови популяції є різною залежно від того, домінантні чи рецесивні алелі відкидаються добором. Якщо пристосованість особин зменшує домінантний ген, то частота його в популяції падає дуже швидко, бо цей ген завжди проявляється у фенотипі і в кожному поколінні знаходиться під контролем добору. Внаслідок цього протягом небагатьох поколінь добір різко зменшує долю гомозиготних домінантів і збільшує долю гомозиготних рецесивів. Що ж до гетерозигот, то їх частота в популяції зменшується поступово і повне зникнення їх настає значно пізніше, ніж гомозиготних домінантів.

Значно повільніше змінюється генетична будова популяції, якщо добором бракується шкідливий рецесивний ген. Це пояснюється тим, що останній у гетерозиготному стані уникає дії добору, і частота гетерозигот у такій популяції зменшується надзвичайно

повільно. При цьому, чим меншою стає доля гомозиготних рецесивів у популяції, тим більшим стає співвідношення до них гетерозигот. Це чітко видно із формули Харді—Вайнберга, згідно з якою частота гетерозигот у популяції дорівнює $2q(1 - q)$, а доля гомозиготних рецесивів — лише q^2 . Ось чому навіть при повному вилученні добором гомозигот aa за низької частоти алеля a в популяції необхідна велика кількість поколінь для істотного зменшення величини q .

Як видно з табл. 15.13, чим менше значення q , тим більше поколінь необхідно для подальшого його зменшення.

Таблиця 15.13

Число поколінь, необхідне для певного зменшення частоти q за даного значення коефіцієнту добору (S) проти гомозиготних рецесивів

Зниження частоти q	Число поколінь				
	$S = 1$	$S = 0.05$	$S = 0.10$	$S = 0.01$	$S = 0.001$
0,99—0,50	1	11	56	559	5585
0,50—0,10	8	20	102	1020	10 198
0,10—0,01	90	185	924	9240	92 398
0,01—0,001	900	1805	9023	90 231	902 314
0,001—0,0001	9000	18 005	90 023	900 230	9 002 304

Прикладом добору проти рецесивних алелів може слугувати фенілкетонурія — спадкова хвороба людей, за якої гомозиготні рецесиви гинуть до повноліття або є стерильними.

Пристаєваність гомозигот aa , якщо вони не лікуються, дорівнює нулю, отже $S = 1$. Формули визначення частот алелів після покоління добору в цьому випадку значно спрощуються:

$$q_1 = \frac{q_0 - Sq_0^2}{1 - Sq_0^2} = \frac{q_0 - q_0^2}{1 - q_0^2} = \frac{q_0(1 - q_0)}{(1 + q_0)(1 - q_0)} = \frac{q_0}{1 + q_0},$$

$$\Delta q = \frac{-Sq_0^2}{1 - Sq_0^2} = \frac{-q_0^2}{1 - q_0^2} = \frac{-(1 - q_0)q_0^2}{(1 + q_0)(1 - q_0)} = \frac{-q_0^2}{1 + q_0}.$$

Через n поколінь добору $q_n = \frac{q_0}{1 + nq_0}$.

Число поколінь n , необхідне для того, щоб частота алеля змінилася від значення q_0 до значення q_n , можна розрахувати за формулою: $q_n \times (1 + nq_0) = q_0$. Число поколінь $n = \frac{q_0 - q_n}{q_0 q_n} = \frac{1}{q_n} - \frac{1}{q_0}$.

Якщо говорити про можливі напрямки дії добору на досить просту менделівську популяцію, яка складається лише з трьох

генотипових класів (AA , Aa і aa), то слід зазначити такі варіанти впливу:

1. Добір направлений або проти рецесивного, або проти домінантного алеля, — саме проти того, який зменшує пристосованість особин. У цьому випадку генетична структура популяції змінюється в бік збільшення частоти того алеля, який добором не усувається. Такий добір називають **направленим** або **руховим**, бо він сприяє безперервній зміні ознаки в певному напрямку.

2. Добір спрямований одночасно як проти гомозиготних домінантів, так і проти гомозиготних рецесивів, отже діє на користь гетерозигот. Таке *явище, коли обидві гомозиготи мають меншу в порівнянні з гетерозиготами пристосованість, називають наддомінуванням* або *гетерозисом*. Збереження гетерозигот у популяції сприяє створенню стійкої поліморфної рівноваги. Частота алелів у цьому випадку визначається коефіцієнтами добору проти відповідних гомозигот, які постійно утворюються за схрещування гетерозиготних особин. *Добір на користь гетерозигот, що приводить до певного рівноважного стану генетично гетерогенної популяції, називають стабілізуювальним* (теорія цього добору розроблена І. І. Шмальгаузенем).

3. Можлива ситуація, коли гетерозиготи мають меншу пристосованість, ніж обидві гомозиготи. Прикладом можуть бути генотипи з транслокаціями: гетерозиготи по транслокаціях гірше пристосовані в порівнянні з гомозиготами внаслідок низької плодючості. Якщо *добір направлений проти гетерозигот, то у випадку, коли $p = q$* (тобто обидві гомозиготи мають однакову пристосованість), частоти алелів у популяції не змінюються, але через певну кількість поколінь популяція за досліджуваними ознаками може розщепитися на дві — по кількості крайніх ознак. Такий добір називається **дизруптивним** або **розсікаючим**. Якщо у вихідній популяції $q < p$ або $q > p$, то за добору проти гетерозигот алель з меншою частотою поступово зникає. Навіть випадкові відхилення в значеннях частот p і q , визвані дрейфом генів чи іншими причинами, можуть порушити нестійку рівновагу таких популяцій і призвести до того, що той чи інший алель повністю витісниться із популяції.

Цю особливість добору проти гетерозигот використовують у практичних цілях, наприклад, для боротьби з шкідливими комахами. Якщо в лабораторних умовах отримати мутантну лінію шкідника з транслокаціями, що порушують мейоз, і велику кількість плодючих гомозиготних мутантів випустити у природну популяцію (так, щоб частота корисного мутантного алеля виявилася більшою рівноважного значення), то генотипи з гомозиготними транслока-

ціями будуть автоматично фіксуватися, а гетерозиготні генотипи будуть витіснятися добром.

В усіх наведених прикладах впливу добору на генетичну будову популяції ми виходили з того, що пристосованість особин різних класів із покоління в покоління не змінюється і не залежить від частот генотипів. Це спрощує математичне дослідження наслідків добору, однак дуже часто такі умови не відповідають дійсності. Насправді в мінливому зовнішньому середовищі рідкісним генотипам може бути властива більш висока пристосованість, оскільки сукупності умов, за яких добір сприяє таким генотипам, можуть траплятися досить часто. Добір, який дає перевагу рідкісним генотипам за певних умов середовища, називають **частотно-залежним добром**. Якщо в даний момент генотип є рідкісним, то добір буде сприяти підвищенню його частоти; однак поступово, в міру того, як це відбувається, пристосованість цього генотипу зменшується, а пристосованість альтернативного генотипу зростає. Якщо існує частота, за якої пристосованості генотипів зрівнюються, то досягається стійка поліморфна рівновага навіть за відсутності гетерозису.

Частотно-залежний статевий добір виникає, якщо ймовірність схрещувань певних генотипів залежить від їх частоти. Нерідко вибір статевих партнерів здійснюється на користь носіїв рідкісних генотипів та іммігрантів. Це явище, відоме під назвою **«перевага шлюбних партнерів рідкого типу»**, було вивчене на дрозофілі, у якої воно виявляється в особливостях вибору самців самками. Самок і самців двох різних популяцій *Drosophila pseudoobscura* змішували в різних співвідношеннях. Виявилось, що в тих випадках, коли мухи однієї із популяцій були у виразній меншості (1 : 23) щодо мух іншої, то самці, що були у меншості, злучались із самками в декілька разів частіше, ніж самці, що склали більшість (Ф. Айала).

Частотно-залежний добір на користь рідкісних генотипів — це один із механізмів збереження генетичного поліморфізму популяцій, особливо важливий за появи у популяціях нових мутацій і генотипів.

15.10. Генетична структура популяцій, адаптація і еволюція

Найважливішою особливістю популяцій є їх генетична гетерогенність, яка обумовлює високі адаптивні можливості і лежить в основі подальшої еволюції цієї елементарної одиниці еволюційного

процесу. Здатність популяції зберігати свою генетичну структуру у відповідь на вплив чинників зовнішнього середовища називають *генетичним гомеостазом*. В основі останнього лежать такі механізми. 1) збереження рівноважного стану структури популяції у відповідності з формулою Харді—Вайнберга; 2) підтримка гетерозиготності і поліморфізму; 3) збереження певного темпу і напрямку мутаційного процесу.

Численні дослідження показали, що генетична структура природних популяцій різних організмів має ряд загальних типових рис. Одна із них полягає в тому, що популяції утримують величезну кількість рецесивних мутацій, прихованих від добору завдяки гетерозиготності. Насиченість популяцій мутаціями складає резерв спадкової мінливості, і за змін навколишнього середовища резерв мутацій у гетерозиготному стані дає можливість популяції швидко пристосуватися до нових умов шляхом зміни своєї генетичної будови. Отже, гетерозиготний стан особин популяції забезпечує її адаптивну пластичність. Крім того, гетерозиготи, як правило, більш життєздатні, ніж гомозиготи, у них більш широка норма реакції і т. ін., що характерно для явища гібридної могутності або гетерозису. Завдяки цьому, гетерозиготність є дуже важливою умовою генетичного гомеостазу. Слід зазначити, що набори рецесивних мутацій неоднакові в різних популяціях одного виду, і склад їх у межах кожної популяції характерно змінюється від покоління до покоління незалежно від добору завдяки випадковості мутацій і генетико-автоматичним процесам (дрейфу). Таким чином, кожна ізольована популяція еволюціонує по-своєму, що з плином поколінь призводить до все більшої генетичної віддаленості навіть дуже близьких у вихідному стані популяцій. Природний добір сприяє адаптації популяцій до місцевих умов, наслідком чого може бути істотна генетична диференціація географічно розділених популяцій одного виду. Існування генетичних відмінностей між географічно віддаленими популяціями призводить до утворення груп популяцій, генетично більш близьких одна до одної, ніж до популяцій інших груп. *Географічно розділені групи популяцій іноді називають расами*. Останні можна визначити як популяції одного і того ж виду, дещо відмінні в генетичному відношенні. Відмінності між расами відносяться до генотипу в цілому, отже складаються із змін частот алелів по багатьох локусах. Незважаючи на це, іноді раси виділяють по якійсь одній індикаторній ознаці, наприклад, по забарвленню крил у метеликів або по пігментації шкіри та групах крові у людини. Процес видоутворення часто йде через проміжні стадії расового диференціювання, однак у людини расові відмінності протягом останніх століть стираються у зв'язку з міграціями і міжрасовими шлюбами.

В природних популяціях розповсюджені не тільки рецесивні, але й домінантні мутації, які в багатьох відношеннях значно відрізняються від рецесивних. Добір проти домінантних алелів йде більш ефективно, ніж добір проти рецесивних, бо домінантні алелі проявляються не тільки в гомозиготному стані, але й у складі гетерозигот. Проте не слід вважати, що домінантні мутації відіграють першорядну роль в еволюції. Як показали досліді на диких популяціях дрозофіли, всі домінантні мутації відносяться до дуже обмеженої кількості типів і обумовлюють лише декілька певних фенотипових змін. Більшість домінантних мутацій у зв'язку з їх шкідливістю (особливо летальні) досить швидко елімінуються добором. Мабуть тому в різних популяціях одного виду розповсюджені одні і ті ж домінантні мутації, і їх арсенал залишається майже незмінним із року в рік. Досліді на дрозофілі показали, що набори таких мутацій дуже подібні і в популяціях різних видів. Як правило, ці мутації не повністю домінантні, а напівдомінантні; крім того, їм властива низька пенетрантність і дуже мінлива експресивність. Тому, незважаючи на досить високу частоту цих мутацій у популяціях, фенотипово змінені ними особини зустрічаються відносно рідко. Сказане свідчить про те, що домінантні мутації значно поступаються рецесивним по своїй значимості для адаптації і еволюційного процесу. Порівняльна характеристика рецесивних і домінантних мутацій у природних популяціях дрозофіли наведена в табл. 15.14.

Таблиця 15.14

Порівняльна характеристика рецесивних і домінантних мутацій у природних популяціях дрозофіли (М. С. Гершензон)

Тип успадкування	Спектр фенотипових змін	Загальна частота в популяції	Частота окремої мутації в популяції	Набір мутацій в різних популяціях	Постійність набору мутацій у популяціях	Пенетрантність	Експресивність
Рецесивний	Дуже різноманітний	Висока	Дуже низька	Різний	Мінливий	Повна	Мало мінлива
Напівдомінантний	Декілька певних типів	Висока	Висока	Подібний	Постійний	Низька	Дуже мінлива

Відмінності інтенсивностей добору домінантних і рецесивних генів існують не тільки тоді, коли ці гени шкідливі, але й тоді, коли вони збільшують пристосованість особин. Частота домінантного алеля, якому добір сприяє, спершу швидко зростає, але в подаль-

ших поколіннях інтенсивність цього процесу падає. В протилежність цьому, відбір корисного рецесивного алеля спершу йде дуже повільно, а потім, з появою і з збільшенням кількості гомозиготних рецесивів, значно прискорюється і призводить до значного збільшення частоти цього гена в популяції.

Окрім гетерозиготності, цілісність популяції як єдиної системи забезпечує наявність у ній **спадкового поліморфізму** — тобто існування в ній цілого ряду морфологічних форм, обумовлених генотиповою мінливістю і відтворюваних за розмноження. Інколи диморфізм або поліморфізм популяцій може пояснюватись і модифікаціями (наприклад, касти у мурашок виникають внаслідок неоднакового годування личинок), проте генетично обумовлений поліморфізм зустрічається дуже часто і є наслідком природного добору. Він виникає двояким шляхом: або за рахунок добору на користь гетерозигот, які обумовлюють постійне вищеплення певної кількості фенотипово відмінних гомозигот, або завдяки тому, що добір по черзі сприяє то одному, то другому алельному гену залежно від змін навколишніх умов.

Класичним прикладом морфологічного поліморфізму слугує наявність різних форм у громадських комах: бджіл, мурашок, термітів та ін. Поява таких форм пов'язана з особливостями статевого процесу, мейозу і регулюється онтогенетичними механізмами.

В диморфних популяціях божої корівки (*Adalia bipunctata*), які складаються з червоних (рецесивних) і чорних (домінантних) особин, частота останніх завжди більша в осінніх, а перших — в весняних вибірках, що пояснюється неоднаковим виживанням зазначених форм жуків у різні сезони року.

Розглянуті приклади структурного поліморфізму свідчать про те, що це явище необхідне для існування популяцій. Природний добір закріплює існування поліморфізму, контролюючи кількісне співвідношення необхідних форм у кожному поколінні.

Такий *вид поліморфізму, коли між гомозиготами і гетерозиготами встановлюються певні кількісні співвідношення, називають збалансованим поліморфізмом*. Його розглядають як один із механізмів генетичного гомеостазу популяції.

Властивість популяцій зберігати свою генетичну структуру незмінною — це лише одна із найважливіших її особливостей. Не менш важливою з точки зору еволюційного процесу є здатність популяції змінюватися за впливу на неї факторів динаміки. Дещо раніше ми розглянули дію на популяцію кожного з факторів зокрема — відсутності або обмеження панміксії, дрейфу генів, порушення ізоляції, мутаційного тиску, природного добору. Деякі з цих факторів змінюють генетичну структуру популяції в одному і тому

ж напрямку, інші впливають на неї протилежно. *Зміна генетичної будови будь-якої реально існуючої популяції являє собою інтегральний результат спільної дії всіх факторів динаміки.* Відносне значення кожного фактора може значно змінюватися залежно від виду організмів, вихідної генетичної структури популяції, від біотичних і абіотичних умов, що склалися. Неоднозначність впливів на популяцію різних факторів динаміки можна простежити на прикладі сумісної дії мутаційного процесу і добору. Якщо новий алельний ген, що виникає внаслідок мутацій, підвищує пристосованість особин, то він буде підхоплюватися добором і накопичуватися в популяції. Обидва фактори динаміки — добір і мутаційний процес — діятимуть у цьому випадку однозначно. Зовсім інша ситуація буде у тому випадку, коли алель, що виникає за рахунок мутацій, є шкідливим. Мутаційний процес сприятиме накопиченню цього алеля у популяції, а добір — його вилученню. Сумісна дія тиску мутацій і добору приведе до зміни концентрації мутантного алеля за формулою:

$$\Delta p = Spq^2 + vq - up,$$

де Δp — зміна частоти алеля, Spq^2 — вклад добору, vq — зворотних мутацій, up — прямих мутацій.

Рівноважний стан популяції настане тоді, коли

$$\Delta p = Spq^2 + vq - up = 0,$$

тобто коли добір і зворотні мутації повністю нівелюють вплив прямих мутацій.

Генетична гетерогенність природних популяцій призводить до того, що середня пристосованість їх завжди дещо нижча за максимальну. Це пояснюється тим, що в кожній популяції існує так званий **генетичний тягар**, який зменшує її пристосованість. Генетичний тягар складається із двох основних компонентів: по-перше, це вищеплення менш пристосованих генотипів внаслідок схрещувань, а по-друге, це безперервне виникнення мутацій, більшість з яких є шкідливими. Однак для виду в цілому генетичний тягар слід розглядати як своєрідну плату за можливість подальшого розвитку, бо ті ж самі процеси — комбінації генів і мутації — можуть бути корисними або потенційно корисними за тих чи інших умов існування. Вони складають **мобілізаційний резерв** спадкової мінливості, з якого природний добір черпає матеріал для подальших еволюційних перетворень.

Все досі сказане свідчить про те, що з усіх факторів динаміки генетичної будови популяцій для еволюційного процесу найважливіше значення має добір. Недаремно К. А. Тімірязев відніс його

до діючих факторів еволюції разом із мінливістю і спадковістю. Однак слід зазначити, що добору в першу чергу підлягають алельні гени з певним адаптивним значенням. Отже, мутації, що не впливають на пристосованість особин, не можуть ні підхоплюватися, ні вилучатися природним добром. Разом з тим частота в популяції алельних генів з нейтральними мутаціями може бути досить високою за рахунок їх накопичення мутаційним процесом, а також внаслідок випадкового дрейфу. Концепція так званої **нейтральної еволюції**, що запропонована японським генетиком М. Кімурую та американськими вченими Дж. Кінгом і Т. Джунсом, проголошує, що природний добір є рушієм еволюції лише на рівні організмів, а зміни первинної структури нуклеїнових кислот і білків у переважній їх більшості не підлягають добору і здійснюються шляхом випадкового дрейфу нейтральних мутацій. Згідно з цією концепцією, нейтральні мутації, які не впливають на пристосованість організму, складають основну кількість мутацій, що розповсюджуються у популяції. Таким чином, нейтральні мутації, як і всі інші, можна розглядати як елементарні еволюційні події, що відбуваються у популяції і лежать в основі мікроеволюції.

Однак не слід вважати, що дивергенція популяцій обмежується лише зміною частоти альтернативних алелів одного локуса. Насправді гени існують і відтворюються в цілісних організмах, де вони взаємодіють, утворюючи єдиний **генний баланс**. Тому прояв і збереження тих чи інших алелів у популяції залежить не тільки від факторів динаміки, але й від інших генів, що входять у геноми особин популяції. Природний добір сприяє збереженню в кожному локусі лише тих алелів, які найкраще взаємодіють з алелями інших локусів, тобто утворюють з ними **оптимальний генний баланс**. Кожна нова генна або хромосомна мутація під впливом природного добору вилучається із популяції або зберігається з невисокою частотою, поки вона не потрапить у сприятливе генне оточення. *Адаптивну взаємодію між генами, що складають геном, називають генетичною коадаптацією*. Слабка експресія генів, пересаджених в інший геном, нежиттєздатність або стерильність міжвидових гібридів переконливо свідчать про важливість генетичної коадаптації.

Внаслідок існування останньої певний алель або група алелів можуть підлягати позитивному добору в одних популяціях даного виду, і негативному — в інших. Докази цього отримані в дослідях на дрозофілі. Показана насиченість лабораторних популяцій мутанта *vg* та інших алельним геном *Adh^F*, який кодує швидко рухомий алозим алкогольдегідрогенази. За тих же умов популяції мутанта *cn* майже на 100% нашпиговані альтернативним алелем — *Adh^S*. На штучно створених популяціях дрозофіли з однаковими концен-

траціями Adh^F і Adh^S показано, що за тиску на популяцію пермісивної гіпертермії селекційною перевагою користується алельний ген Adh^S , а за підвищеної концентрації етилового спирту в кормі — Adh^F (табл. 15.1). Зазначені зміни в генетичній будові популяції супроводжуються зміною частот і інших алельних генів, наприклад, естерази 5. Ці дані свідчать про те, що за генетичної адаптації зміна генних частот у популяції йде не по одному локусу, а по всьому розмаїттю множинних алелів відповідно до вимог генетичної коадаптації. В процесі зтяжної еволюції сукупність найбільш коадапованих генів може перетворюватись у досить міцно зчеплені **блоки коадапованих генів**, наявністю яких пояснюються адаптивні особливості популяцій, що існують у різних географічних широтах (**клінальні відмінності**).

В одній і тій же популяції між одними алелями існує коадаптація, тоді як між іншими вона не виявляється. Коадапованими у відношенні певних алелів одного локуса іноді можуть бути лише деякі, а не всі алелі другого локуса. Якщо алелі різних локусів в одних комбінаціях (**гаплотипах**) зустрічаються частіше, ніж в інших, то це є проявом **нерівноважності по зчепленню**. Якщо ж алелі різних локусів поєднуються один з одним згідно з теорією випадковості, то популяція вважається **рівноважною** по зчепленню. Слід зазначити, що рекомбінації зменшують нерівноважність по зчепленню, отже ймовірність збереження сприятливих сукупностей алелів у стані, нерівноважному по зчепленню, зростає за зниження частоти рекомбінацій між відповідними локусами. Останнє може бути досягнуто внаслідок транслокацій або інверсій. Якщо добір сприяє нерівноважності по зчепленню, то він буде сприяти також хромосомним перебудовам, які збільшують зчеплення між локусами. Декілька тісно зчеплених локусів, що впливають на прояв однієї ознаки або на цілу серію взаємопов'язаних ознак, називають **супергеном, складним локусом** або **множинним локусом**. Прикладом супергенів у людини слугують кластери гемоглобінових генів. Гени поліпептидних ланцюгів α -типу, що входять до складу гемоглобіну, тісно зчеплені в послідовність довжиною 30 кб, локалізовану в хромосомі 16. Гени імуноглобулінів також утворюють кластери або супергени. Розташований у хромосомі 6 суперген *HLA* містить 4 локуси, які кодують антигени гістосумісності, а також деякі інші гени з близькими функціями (розділ 17.5.4).

Все сказане свідчить про те, що генетичну адаптацію популяцій можна розглядати як один із перших кроків в еволюційному процесі.

Адаптивні зрушення в генетичній будові популяції, які спочатку є цілком зворотними, за довгого еволюційного процесу можуть

закріпитися шляхом незворотних перебудов структури генотипів і це, очевидно, є основою подальшої дивергенції і видоутворення.

На завершення варто сказати, що сучасний розвиток популяційної генетики збагачується моделюванням популяційно-генетичних процесів на ЕОМ, і це значно прискорює дослідження і прогнозування процесів мікроеволюції і видоутворення. Крім того, принципово новим є еколого-генетичний підхід у з'ясуванні взаємодії між різними організмами і чинниками зовнішнього середовища. Отже, виник новий напрямок генетики популяцій — так звана екологічна генетика.

ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ СЕЛЕКЦІЇ

16.1. Селекція як наука

Селекція (*selectio* — добір) — наука про біологічні основи і методи створення сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів з необхідними для людини ознаками та властивостями. Теоретичною базою цієї науки є генетика, хоч селекція як сфера практичної діяльності людини стихійно виникла дуже давно — ще на зорі розвитку рослинництва і тваринництва, а генетика як наука нараховує лише століття. Величезне значення генетики для селекції полягає в тому, що без знання загальних законів спадковості і мінливості, без конкретної інформації про особливості організації геному і механізми успадковування досліджуваної ознаки у конкретного виду неможливо раціонально планувати і проводити селекційну роботу. Це, однак, не означає, що селекція повністю зводиться до генетики; селекція — це самостійна наука, яка враховує всі сучасні досягнення біології.

Незважаючи на надзвичайно важливе значення селекції для сільського господарства, промисловості і медицини, її не можна вважати чисто прикладною наукою. М. І. Вавілову належить крилата думка про те, що селекція являє собою еволюцію, спрямовану волею людини. Предметом дослідження селекції як самостійної теоретичної науки є вивчення специфічних закономірностей еволюції домашніх тварин і корисних рослин, яка здійснюється за умов штучного добору. М. І. Вавілов виділяв такі розділи селекції: 1) вчення про вихідний сортовий, видовий і родовий потенціал; 2) закономірності спадкової мінливості; 3) вчення про роль середовища у вияві ознак у селектованих організмів; 4) теорію гібридизації, включаючи віддалену; 5) теорію селекційного процесу; 6) аналіз основних напрямків селекційної роботи; 7) предметну селекцію окремих видів.

Важливе значення для селекції мав відкритий М. І. Вавіловим **закон гомологічних рядів** у спадковій мінливості, а також відкриті

ним центри походження культурних рослин. Серед восьми таких центрів найбільш важливі середньоазіатський (батьківщина м'якої пшениці, бобів, гороху), китайський (батьківщина проса, гречки, сої), передньоазіатський (батьківщина багатьох видів пшениці, жита, плодів культур) та індійський (осередок походження рису, цукрового очерету, цитрусових). Велика різноманітність специфічних форм рослин властива середземноморському, абісінському, південномексиканському і південноамериканському осередкам. **Центри доместикації** (одомашнювання) відкриті також для домашніх і свійських тварин. Так, первинним центром розведення тутового шовкопряда, а також і шовковництва, є Китай.

Згадані центри походження використовуються в селекції для отримання нового вихідного матеріалу і для доповнення генофонду існуючих видів культурних рослин і свійських тварин.

16.2. Сорти, породи і штами як засоби виробництва

Сорт, порода або штам — це різновидність організмів певного виду, штучно створена людиною і наділена сукупністю спадково закріплених ознак і властивостей, які цікавлять людину в її практичній діяльності. Отже, сорти, породи та штами можуть істотно відрізнятися від своїх диких попередників господарсько цінними ознаками, що є наслідком їх виведення шляхом кропіткого і тривалого добору. Так, від корів деяких порід надоюють по 16—17 тис. кг молока в рік, а від рекордисток — навіть по 25 тис. кг, тоді як безпородні тварини дають молока в 10—20 разів менше.

Відомі породи курей з високою несучістю або із значною живою масою. Отримано штами мікроорганізмів, що здатні продукувати антибіотики, деякі амінокислоти та інші біологічно активні сполуки в сотні разів ефективніше, ніж вихідні форми. Їх називають **надпродуцентами** і використовують у мікробіологічній промисловості.

Організми одного штаму, породи чи біотипів сорту можуть бути генетично неідентичними, але вони мають спільне походження і дуже подібні морфологічні, фізіологічні і господарсько цінні ознаки за стандартних умов існування. Порушення цих умов значно прискорює генотипові і фенотипові зміни в популяціях і може призвести до повної втрати сорту, породи чи штаму.

В зв'язку з високою мінливістю живих форм отримані сорти, породи і штами необхідно постійно підтримувати науково обгрунто-

ваними і ефективними системами насінництва, племінного тваринництва і оптимального культивування. Оскільки властивості організмів визначаються їх генотипами і підлягають спадковій і модифікаційній мінливості, розвиток селекції мусить ґрунтуватися на законах генетики як науки про спадковість і мінливість. Одна із таких закономірностей полягає в тому, що чим продуктивніший сорт або порода, тим вищими мусять бути вимоги до умов вирощування і утримання цих генотипів. Лише за суворого дотримання всіх вимог агротехніки і зоотехніки потенційні можливості сорту або породи можуть розкриватися повністю.

Вдалі сорти та породи здатні підвищити ефективність сільського господарства на десятки процентів, тому їх відносять до засобів виробництва. Сьогодні, коли населення Землі невпинно збільшується, а площі орних земель у зв'язку з індустріалізацією, ерозією та іншими причинами зменшуються, життєзабезпечення людства багато в чому залежить від темпів інтенсифікації сільського господарства. Ці темпи значною мірою визначаються успіхами селекції.

Сьогодні при виведенні нового сорту або породи слід керуватися не тільки потребою у високій продуктивності. В зв'язку з екологічними негараздами дуже важливо мати сорти і породи, стійкі до несприятливих умов та патогенів (збудників хвороб). Значні досягнення в цьому напрямку свідчать про можливий ще більший прогрес у майбутньому.

В останні 20—25 років у багатьох країнах, наприклад, в Індії, селекціонери досягли різкого підвищення продуктивності сільськогосподарських рослин, особливо зернових. Це явище отримало назву «зеленої революції». Були впроваджені в практику сорти пшениці мексиканської селекції, отримані на основі розробленої програми схрещування, яка передбачала створення короткостебельних неполягаючих сортів шляхом гібридизації місцевих індійських сортів з мексиканськими карликовими пшеницями. Врожайність нових сортів зросла до 70—80 ц/га, і це дало змогу збільшити загальний збір пшениці майже у три рази при значно кращому вмісті білка та лізину в зерні.

«Зелена революція» — це переконливий приклад вирішення гострих народногосподарських і соціальних проблем за допомогою науки селекції. Відповідна наукова програма виконувалася під керівництвом норвежського вченого Н. Борлауга, який за цю роботу — поки що єдиний серед рослинників — був удостоєний звання Нобелівського лауреата.

Чимало високопродуктивних та стійких до несприятливих умов сортів рослин та порід тварин створено вченими України (розділ 16.10).

Сьогодні все більшого значення набуває селекція корисних комах і мікроорганізмів, що використовуються з метою біологічної боротьби з шкідниками і збудниками хвороб сільськогосподарських рослин.

Крім того, селекція мікроорганізмів спрямовується потребами та запитамі мікробіологічної промисловості, яка має пряме відношення до виробництва продуктів харчування, ліків, біостимуляторів тощо.

16.3. Моделі сортів і порід

Створення нового штаму, сорту або породи не може здійснюватися за принципом випадковості, без певного плану з боку дослідника. Селекціонер виходить з того, що людством створено вже безліч сортів та порід, що районуються в різних географічних широтах і за певних конкретних умов мають свої переваги і недоліки. Так, наприклад, сорт може бути врожайним лише за умов помірного клімату, але бути вразливим до посухи чи сильного холоду. Він може бути стійким до одних патогенів, але дуже чутливим до інших, може мало вражатися хворобами, але полягати на високих агрофонах від дощу чи вітру і т. п.

Пристаючи до своєї кропіткої роботи, селекціонер мусить знати, який саме сорт необхідний для даної географічної зони і з якими властивостями. Виходячи із особливостей вже впроваджених у виробництво сортів, дослідник вирішує, які зміни варто внести в їх генотип з метою поліпшення. Слід зазначити, що в розвинених країнах сучасна селекція досягла великих успіхів, і дуже часто поліпшити існуючий сорт чи породу вже не вдається. В цьому випадку може виникнути потреба у створенні нового сорту (породи) на принципово нових засадах.

В будь-якому випадку попереднє планування нової форми — створення моделі породи чи сорту — набуває першорядного значення. За створення такої моделі необхідно враховувати безліч параметрів: особливості наявних сортів-аналогів, практичне призначення майбутнього сорту (породи), основні компоненти генетичної структури і характер їх взаємодії, необхідні морфологічні і фізіологічні показники, із яких складатиметься продуктивність і т. ін. Провести порівняльний аналіз всіх складових і звести все до найбільш сприйнятливої моделі допомагає комп'ютерна техніка.

С. Я. Краєв і співавтори запропонували модель рослин озимої пшениці, із яких може складатися популяція сорту інтенсивного

типу. Ці рослини повинні мати помірно вкорочене міцне неполягаюче стебло, добре розвинену кореневу систему, засвоювати добрива з високою віддачею, мати продуктивний колос і добру кустистість. Серед існуючих сортів знайти рослини, цілком відповідні зазначеній моделі, практично неможливо. Отже, для створення сортів інтенсивного типу необхідна кардинальна перебудова генотипів існуючого вихідного матеріалу. Саме це завдання в останні роки вирішують вчені Селекційно-генетичного інституту УААН, Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, Миرونівського інституту пшениці ім. В. М. Ремесла та інших наукових установ України.

16.4. Генетика кількісних ознак у селекції

Генетика і селекція тісно пов'язані, вони взаємно збагачують, але не замінюють одна одну. Селекційна робота мусить провадитися з урахуванням усіх особливостей спадковості і мінливості досліджуваного об'єкту, але особливо важливою для селекції є генетика кількісних ознак, бо більшість господарсько цінних показників культурних рослин і домашніх тварин відносяться до категорії кількісних.

Як вже зазначалося (розділ 1), кількісна ознака в переважній більшості кодується не одним, а багатьма генами, взаємодія яких може бути дуже різноманітною (адитивність, кумулятивність, епістаз і т. п.). Серед генів кількісних ознак може бути декілька так званих **головних** або **сильних генів**, які в основному і визначають ту чи іншу ознаку. Однак дія цих генів може доповнюватись і змінюватись значною кількістю **слабких** детермінантів цієї ознаки.

Полігенні ознаки варіюють у широких межах як за типом, так і за силою фенотипового вияву. Існує думка, що полігени в природі обумовлюють поступові адаптивні зміни і, можливо, грають головну роль у процесах видоутворення.

Є прямий зв'язок між полігенними системами і дуплікаціями ДНК, бо останні складають фізичну основу полігенних систем. В порівнянні з моногенними полігенні системи більш чутливі до дії факторів зовнішнього середовища; вони здатні реагувати навіть на незначні зміни умов існування організму. Однак різні кількісні ознаки, як відзначав ще Ю. О. Філіпченко (1938), виявляють неоднакову залежність від умов зовнішнього середовища.

Слід зазначити, що більшість популяцій є дуже гетерогенними по полігенним ознакам. При цьому одні і ті ж полігени можуть виз-

начати мінливість багатьох різних ознак, тобто діяти плейотропно. Добре відомо, що кількісні ознаки знаходяться в численних корелятивних зв'язках одні з одними, а також з деякими якісними ознаками.

Отже, в полігенній системі жоден із генів або його алелів не має незалежного вияву чи самостійного впливу, і тому необхідно враховувати взаємодію полігенів як між собою, так і з іншими генами, включаючи гени цитоплазматичних структур.

Між сильними і слабкими генами кількісних ознак спостерігаються проміжні варіанти вияву. Крім того, внаслідок плейотропності один і той же ген може виступати як сильний у відношенні одних ознак і як слабкий стосовно інших.

Мінливість, яка є наслідком розщеплення генів кількісних ознак, називають полігенною. Оскільки це розщеплення дуже складне і залежить не тільки від кількості полігенів, але й від їх взаємодії між собою та іншими генами, то спадковість і мінливість стосовно кількісних ознак важко вивчати традиційними методами гібридологічного аналізу. Як правило, результати таких досліджень піддають досить складній математичній обробці за спеціальними методиками. Розроблена науково обгрунтована система реєстрації досліджуваних фенотипів, побудови емпіричних варіаційних рядів, кривих розподілу і гістограм, математичних розрахунків, з допомогою яких можна визначити кількість генних локусів у полігенних системах, внесок генотипових і середовищних чинників у загальну фенотипову мінливість і т. д.

Найважливішими статистичними показниками варіабельності організмів за кількісними ознаками є середнє квадратичне відхилення (σ), варіанса (σ^2), коефіцієнт мінливості (CV), коефіцієнт успадкованості (h^2) та інші. З'ясувалося, що мінливість тварин і рослин за елементами продуктивності має ряд характерних рис.

Перша з них — *неперервність варіювання і наявність лише однієї моди*, що властиве всім кількісним, тобто вимірним, ознакам тварин і рослин. Криві розподілу особин по фенотипових класах дуже нагадують нормальний розподіл, особливо за великої кількості полімерних генів, оскільки нормальний розподіл є крайнім випадком біноміального.

Друга вже відома нам особливість кількісних ознак — це *їх залежність від великої кількості взаємодіючих генів*. В найпростішому випадку (всі гени незчеплені і мають домінантні алелі) розщеплення призводить до виникнення дискретних фенотипових класів, частоту яких можна визначити у відповідності з біноміальним розподілом $(1/4 + 3/4)^n$, де n — кількість алельних пар. Чим більша кількість генів, що відповідають за одну і ту ж кількісну ознаку,

тим менша різниця між сусідніми фенотиповими класами і тим важче визначити дискретне успадковування окремих генів.

Третя характерна риса кількісних ознак полягає в тому, що на них дуже *сильно впливають фактори зовнішнього середовища*. Ці модифікаційні зміни також неперервні, і це ще більше стирає розбіжності між окремими класами.

Між тим у практичній селекції постійно виникає потреба визначити, в якій мірі мінливість кількісних ознак залежить від генетичних причин, а в якій зобов'язана модифікаціям. Від вирішення цього питання залежить прогноз ефективності добору, що проводиться на ту чи іншу кількісну ознаку. Істотну користь у такому випадку може принести визначення **коефіцієнта успадковуваності** досліджуваної ознаки, що може бути зроблено і у відсутність інформації про відповідні гени.

Існує декілька різних способів розрахунку цього коефіцієнта. Найпростіший з них — визначення коефіцієнта успадковуваності «в широкому розумінні» за формулою

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2} = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2},$$

де h^2 — коефіцієнт успадковуваності, σ_G^2 і σ_P^2 — відповідно генотипова (G) і фенотипова (P) варіанси (дисперсії). Фенотипова (σ_P^2) варіанса складається із генотипової (σ_G^2) і паратипової (σ_E^2). Паратиповою називають мінливість кількісних ознак, обумовлену впливом чинників зовнішнього середовища.

Коефіцієнт успадковуваності може мати значення від 0 до 1, або від 0 до 100%, і відображує вклад адитивних генетичних факторів у досліджуваний фенотип. Чим однорідніша група організмів у генетичному відношенні, тим нижчі коефіцієнти успадковуваності і навпаки. Внаслідок цього показник h^2 зменшується за інбридингу і довготривалого добору на відповідну ознаку, бо і перший, і другий процеси призводять до генотипового вирівнювання нащадків. Оптимізація умов, за яких розвиваються організми, обумовлює підвищення коефіцієнта успадковуваності, бо сприяє більш повному вияву генетичних потенцій.

У селекційній практиці зазначений коефіцієнт має істотне прогностичне значення: чим він вищий у досліджуваної групи особин, тим кращого результату слід очікувати від добору. В практичній селекції визначають також так звану **реалізовану успадковуваність**, яка відображує ефективність добору. Для цього вираховують різницю між парами батьків (S) і їх нащадками (R) по тій чи іншій кількісній ознаці. Відношення R/S показує, яка доля відмінностей між групами батьків збереглась у потомстві. В цьому випадку $h^2 = R/S$.

Як вже зазначалося, кількісна ознака лише в найпростішому випадку визначається декількома адитивно взаємодіючими генами з приблизно однаковим впливом на фенотип. В переважній більшості полімерні гени часто відрізняються силою впливу; їх взаємодія може бути неадитивною і ускладнюватись явищами домінування, комплементарності, епістазу, а також наявністю генів-модифікаторів. Тому визначити кількість генів, які обумовлюють відмінності батьківських форм за кількісною ознакою, буває непросто. Щоб скористатися математичними формулами, запропонованими для цієї мети, задачу значно спрощують, а саме:

а) вважають, що всім полімерним генам властива однакова адитивна дія;

б) ігнорують можливу взаємодію цих генів (домінування, комплементарність, супресію, модифікуючий вплив);

в) допускають, що обидві батьківські форми з крайніми значеннями кількісної ознаки є гомозиготами. Одна з цих гомозигот містить всі алелі, що підсилюють експресивність ознаки, а друга — всі алелі, що зменшують її значення.

Допустивши ці спрощення, можна приблизно розрахувати мінімальну кількість генів, від яких залежать відмінності батьківських форм за даною кількісною ознакою.

По-перше, можна виходити з того, що доля гомозиготних рецесивів F_2 , які фенотипово ідентичні одному із батьків, складає $1:4^n$, де n — кількість пар алелів, за якими батьки відрізняються. Якщо відмінності між батьками визначаються однією парою алелів, то $1/4$ частина нащадків фенотипово буде подібна одному із батьків; за двох пар алелів ця доля буде складати $1/16$, за трьох — $1/64$ і т. д.

По-друге, для розрахунку кількості алельних пар, що визначають дану ознаку, можна використати варіанси досліджуваної ознаки в F_1 і F_2 . Запропонована така найпростіша формула для знаходження кількості пар алелів, за якими відрізняються гомозиготні батьки:

$$n = \frac{D^2}{8(\sigma_{F_2}^2 - \sigma_{F_1}^2)},$$

де n — кількість алелів, D — різниця між середніми значеннями досліджуваної ознаки у батьківських форм, σ^2 — варіанси ознаки в F_1 і F_2 .

Використання цих та інших статистичних методів дало можливість визначити для багатьох організмів мінімальну кількість пар алелів, відповідальних за кількісні ознаки. З'ясувалося, що в більшості випадків кількість цих генів значно менша, ніж вважали

раніше, а досліди на дрозофілі переконливо показали, що розрахунковий метод визначення кількості генів дає значення, дуже близькі до дійсних.

16.5. Основні етапи селекційного процесу

Селекція рослин, тварин та мікроорганізмів багато чим відрізняється — в першу чергу методичними підходами, які визначаються особливостями досліджуваних об'єктів та цілями конкретного селекційного процесу. Проте в будь-якому випадку селекційний процес здійснюється в певній послідовності, в зв'язку з чим він разом з системами рослинництва та тваринництва, що його доповнюють, може бути поділений на такі основні етапи:

- 1) пошук, створення та вивчення вихідного матеріалу для селекції;
- 2) система цілеспрямованих схрещувань з метою збільшення мінливості і отримання нових високопродуктивних форм;
- 3) добір — оцінка нових форм, перспективних для практичного використання;
- 4) конкурсне сортовипробування в установах-оригінаторах, випробування порід на племзаводах і фермах;
- 5) державні випробування сортів та порід;
- 6) збереження сорту, породи чи штаму системою насінництва, тваринництва та оптимального культивування.

16.6. Створення вихідного матеріалу для селекції

Генетична різноманітність вихідного матеріалу є основою для виведення нових сортів рослин і порід тварин. Важливі всі типи генотипової мінливості — як комбінаційна, так і мутаційна, включаючи хромосомні та геномні мутації. Тому всі заходи, що спрямовані на збільшення діапазону мінливості рослин та тварин, сприяють отриманню великого розмаїття вихідних форм, із яких можна вибрати найбільш вдалі батьківські форми.

Джерелом вихідного матеріалу можуть бути природні форми рослин і тварин, сорти і породи народної селекції, а також раніше

створені селекціонерами сорти і породи. Для поповнення генофонду свійських тварин і культурних рослин велике значення має використання диких форм як відповідних, так і інших видів. В цьому допомагає вчення М. І. Вавилова про центри походження культурних рослин, бо саме там збереглися їх дикі попередники з необмеженим генофондом. Можна скористатися також можливостями існуючих колекцій генотипів рослин, створення яких у колишньому СРСР започаткував М. І. Вавілов. Сьогодні у створенні вихідного матеріалу для селекції важлива роль належить генетичній інженерії та клітинним технологіям (розділ 16.12).

16.6.1. Комбінаційна мінливість як джерело вихідного матеріалу

Діапазон мінливості існуючих форм рослин і тварин можна значно збільшити шляхом **внутрішньовидової гібридизації**. Знаючи закономірності успадковування окремих ознак і властивостей, селекціонер має змогу шляхом гібридизації цілеспрямовано поєднати в одному генотипі необхідні для майбутнього сорту властивості, відкинути генотипи з небажаними ознаками, отримати гомозиготні трансгресивні форми, виявити гібриди з виявами гетерозису і т. п.

Використання комбінаційної мінливості може не тільки сприяти отриманню вихідного матеріалу для подальшої селекції, але й слугувати способом виведення нових порід і сортів. Так, відомий селекціонер П. П. Лук'яненко шляхом багатоступеневої гібридизації далеких географічних рас (вітчизняних, аргентинських та інших) пшениць, отримав знамениту озиму пшеницю Безосту І.

Комбінаційна мінливість, основана на поєднанні певних мутантних генів з генами дикого типу, лежить в основі розведення норок і каракульських овець з різним забарвленням шерсті, що дає можливість виготовляти хутра з урахуванням запитів світового ринку.

Важливим джерелом комбінаційної мінливості є **віддалена гібридизація**. Використанням останньої в окремих випадках вдається поєднувати властивості форм, далеких у систематичному відношенні. Так, наприклад, М. В. Цицин отримав пшенично-пирійні гібриди і на їх основі вивів сорти пшениці, які утримували фрагменти пирійного геному і мали такі його цінні властивості як багаторічність, стійкість до полягання та ін.

Міжродову гібридизацію в селекції зернових культур застосовували Г. К. Мейстер, А. Р. Жебрак, А. О. Сапегін та ін. Останнім часом набуває все більшого значення **інтрогресивна селекція**, коли віддалені гібриди використовуються як донори для поліпшен-

су — F_1 (16.9). порід,

20—50%,

16.6.2.

(11.9.3).

ссавців,

радіаційно

. М.

Особливо успішно індукований мутагенез використовується в селекції мікроорганізмів. Цілий ряд унікальних продуцентів антибіотиків був отриманий під керівництвом С. І. Аліханяна шляхом обробки актиноміцетів різними мутагенами.

Господарсько цінні штами мікроорганізмів за рахунок штучного мутагенезу і наступного добору були отримані в Україні Г. М. Шавловським, А. А. Сибірним, В. О. Федоренко та іншими вченими.

Цінний вихідний матеріал для селекції можна отримати за рахунок геномних мутацій. Анеуплоїдні форми рослин (моносомиків і нулосомиків) можна використати для з'ясування алельного складу груп зчеплення, для заміни певної хромосоми на хромосому іншого сорту і т. п. (розділ 11.8.2). Однак значно більше значення мають гаплоїдні і поліплоїдні форми рослин. Перші з них використовують для оцінки алельного складу геному і наступного отримання гомозиготних диплоїдних форм шляхом подвоєння хромосом. Щодо поліплоїдних форм, то саме вони лежать в основі багатьох господарсько цінних форм і сортів (розділ 11.8.3).

Як відомо, у багатьох тетраплоїдів експресія кількісних ознак є значно кращою, ніж у диплоїдів. Так, наприклад, збільшується цукристість у цукрового буряка і кавуна, підвищується вміст білка, процент лізину, а також маса зерна у злакових і т. п. Не дивно, що чимало культурних рослин представлено еуполіплоїдними та алополіплоїдними формами. Це пшениця, овес, картопля, цукровий очерет, слива, вишня, цитрусові та багато інших.

Не слід вважати, що кожна поліплоїдна форма рослин являє собою готовий сорт. Часто перешкодою до цього стає низька плодючість такої форми, або й повна нездатність її утворювати насіння (розділ 11.8.3). Тому експериментально отримані поліплоїди в багатьох випадках слугують лише вихідним матеріалом, який мусить пройти тривалу селекцію на плодючість. Так, В. В. Сахаров за допомогою колхіцину отримав тетраплоїдну гречку, яка напочатку була малоплодючою. Після багаторічного добору найбільш плодючих форм вдалося отримати врожайний і плодючий сорт тетраплоїдної гречки з крупним насінням.

Отримуючи вихідний матеріал для селекції, часто поєднують можливості поліплоїдних форм з позитивними якостями комбінаційної мінливості.

В інтересах практичної селекції використовуються як генеративні, так і соматичні мутації. Останні можуть мати вирішальне значення в селекції організмів, що розмножуються головним чином вегетативно (деякі види грибів, наприклад роду *Penicillum*, плодіві дерева та ін.). Нові форми рослин, що виникають за рахунок соматичних мутацій, являють собою химери, тобто вони складаються із

нормальних і мутантних клітин. Кількісне співвідношення між цими клітинами може варіювати в широких межах.

Сьогодні розвиток клітинних технологій та успіхи генетичної інженерії лежать в основі так званих нетрадиційних методів селекції (розділ 16.12), які відкрили нові можливості для штучного створення мутантних генотипів та прискорення селекційного процесу.

16.7. Типи схрещувань у селекції

Більшість сортів культурних рослин і порід сільськогосподарських тварин отримують шляхом схрещування і наступного добору. Мета полягає в тому, щоб поєднати в одному сорті або породі корисні ознаки та властивості, які належать різним представникам вихідних форм. Всі системи схрещування, що застосовуються в селекції, за своїми генетичними наслідками можуть бути поділені на два основних типи: **інбридинг** (родинне або споріднене) і **аутбридинг** (неспоріднене) схрещування. Генетичні наслідки таких схрещувань вже розглядалися (розділ 15.9). Найбільш тісний із можливих варіантів інбридингу — це самозапліднення, яке широко розповсюджене серед рослин і зустрічається лише у деяких видів тварин.

Якщо організми запліднюються перехресно, то прикладами тісного інбридингу в цьому випадку будуть схрещування братів з сестрами або батьків з дітьми; менш тісний інбридинг спостерігатиметься за схрещування двоюрідних братів і сестер, племінників з дядьками та тітками, іншими віддаленими родичами.

Як уже зазначалося, *найбільш важливими генетичними наслідками інбридингу є такі:*

1) *підвищення з кожним поколінням гомозиготності нащадків;*

2) *розпад популяції на ряд генотипово відмінних ліній;*

3) *ослаблення і навіть виродження нащадків (інbredна депресія, обумовлена гомозиготизацією рецесивних алелів).*

Споріднені схрещування, незважаючи на можливість інbredної депресії, для процесу селекції мають виключно важливе значення. По-перше, отримання чистих (гомозиготних) ліній дає можливість правильно оцінити генний потенціал вихідної форми, бо у гомозигот фенотипово виявляються і домінантні, і рецесивні гени. По-друге, схрещування різних чистих ліній часто призводить до виникнення гетерозисних гібридів F_1 , які мають практичне значення у селекції.

По-третє, маючи набір чистих ліній, селекціонер може провести необхідні аналізуючі схрещування з метою оцінки генотипів вихідних батьківських форм, а також їх гібридів. Нарешті слід зазначити, що збереження чистої лінії, породи та сорту передбачає розмноження особин шляхом більш або менш тісного інбридингу.

Однак за добору пар для схрещування при створенні нового сорту або породи, крім тих ознак, на які власне спрямована селекція, необхідно звертати увагу на життєздатність і плодючість нащадків, а тому, як правило, слід уникати тривалих близькоспоріднених схрещувань.

Прагнучи поєднати корисні ознаки, що належать різним індивідам, лініям, сортам чи породам, селекціонер застосовує їх гібридизацію, яку можна розглядати як аутбридинг, хоч певна ступінь спорідненості між організмами завжди існує.

Генетичні наслідки аутбридингу (схрещування неспоріднених за походженням особин) *прямо протилежні інбридингу* (розділ 15.9). До основних наслідків аутбридингу, які дуже важливі для селекції, слід віднести:

- 1) збільшення ступеня гетерозиготності особин;
- 2) поєднання в одному генотипі окремих спадкових задатків різних батьківських форм;
- 3) виникнення за певних умов аутбридингу явища гетерозису, за якого гібриди F_1 мають певну перевагу перед обома батьківськими формами (розділ 16.9).

Найчастіше поняття «аутбридинг» відноситься до схрещування особин із різних популяцій. Значний інтерес для селекції являє собою віддалена гібридизація, тобто схрещування представників різних видів.

Віддаленою гібридизацією отримано чимало нових форм плодових рослин, більшість яких можна розмножувати вегетативно. Створено багато сортів сільськогосподарських рослин із плодючих міжвидових гібридів більш складним шляхом — виділенням із нащадків, що вищеплюються, екземплярів з бажаним поєднанням ознак і схрещуванням їх між собою, з одним із батьків (бекрос), а іноді і з представником третього виду.

Схрещуванням культурної картоплі з дикими південноамериканськими видами в різних країнах отримали нові сорти картоплі, стійкі до багатьох збудників хвороб, а також до колорадського жука.

Шляхом міжвидової гібридизації виведено поліпшені сорти пшениці, соняшника і деяких інших рослин, створено новий злак — тритикале.

Є окремі приклади створення нових порід сільськогосподарських тварин за допомогою цього ж методу. Схрещуванням тонко-

рунних овець з диким гірським бараном архаром створена порода архаро-мериносів, пристосованих до кліматичних умов Середньої Азії. В США і на Ямайці після гібридизації звичайної великої рогатої худоби з зебу вивели породу, що добре переносить спеку і менше хворіє піроплазмозом — хворобою, від якої потерпає місцева рогата худоба.

Міжродові гібриди білуга × стерлядь («бестери») виявилися плодючими, швидко дозріваючими, здатними розмножуватись як в прісних водоймах, так і в морській воді, але в F_2 вони розщеплюються. Отже, бестерів можна розглядати не як породу, а як нову вихідну форму для подальшої селекційної роботи.

Дуже часто міжвидова гібридизація використовується в тваринництві головним чином для отримання гетерозисних форм. Дуже виражений гетерозис виявляється у мулів — безплідних гібридів коней і ослів, які відомі своєю виносливістю і працездатністю. Дуже добрі якості м'яса у гібридів великої рогатої худоби і яків, до того ж ці гібриди є швидкозрілими.

Особливе значення для сучасної селекції рослин має метод переносу окремих хромосом або їх частин від одного генотипу до іншого. Такий перенос найчастіше здійснюється з допомогою нулісомиків або моносомиків (розділ 11.7.2), які дають можливість переносити хромосоми від одного сорту до іншого. В останній час для отримання нулісомиків і моносомиків використовують гаплоїдні рослини, які за певних умов розвиваються із клітин пиляків. Існують і деякі інші способи заміни окремих хромосом культурних видів рослин хромосомами близьких диких видів. Робиться це з метою передати культурній рослині деякі цінні ознаки їх диких родичів, наприклад зимостійкість, імунність до певних хвороб, шкідників і т. п.

Переносом хромосом або їх частин від диких видів до культурних рослин виведено ряд нових сортів і поліпшено існуючі. Так, сорти пшениць, стійких до листової іржі, церкоспорозу, мучнистої роси та інших хвороб були виведені завдяки тому, що деякі хромосоми існуючих культурних пшениць були замінені хромосомами диких видів пшениці, пирію, жита, егілопсу. Так само цукровому буряку від родинної дикої форми була передана стійкість до перноспорозу.

Подібних прикладів, що свідчать про велику користь віддаленої гібридизації в селекційній роботі, є чимало. Слід зазначити, що сьогодні можливості віддаленої гібридизації значно зросли завдяки удосконаленню клітинної біотехнології і розробці методів парасексуальної гібридизації шляхом зливання соматичних клітин.

16.8. Типи добору

Добір є найважливішим елементом будь-якого селекційного процесу. Він необхідний не тільки для отримання кращих з господарського погляду форм рослин і тварин, але й для їх подальшого поліпшення і збереження, бо у відсутність добору найкращі форми можуть бути втрачені внаслідок постійно виникаючих мутацій та інших причин.

Добір, що цілеспрямовано проводиться людиною, називається штучним. Його значення в еволюції сільськогосподарських рослин і тварин справедливо оцінив Ч. Дарвін. Саме успіхи селекціонерів, які широко застосовують штучний добір, привели Ч. Дарвіна до ідеї природного добору як рушія еволюції.

Однак, в протилежність природному добору, штучний добір здійснюється за певних умов, визначених селекціонером. Створюють такі умови, щоб селектована ознака виявлялася найбільш повно. Наприклад, добір на стійкість до патогенних мікроорганізмів може проводитися на тлі відповідного інфекційного процесу, за певної температури, вологості, режиму освітлення.

Другою особливістю штучного добору слід вважати те, що він не завжди провадиться в напрямку підвищення адаптивності і життєздатності об'єкта добору. Саме тому високопродуктивні форми рослин і тварин, що створені шляхом селекції, адаптивними здібностями дуже поступаються своїм диким родичам.

Природний добір здійснюється в умовах випадкових схрещувань, в той час як штучний провадять після чітко спрямованої гібридизації невеликої кількості особин. Обмеженістю вибірки (популяції), з якою працює селекціонер, штучний добір також істотно відрізняється від природного.

Нарешті, слід зважати на те, що штучний добір не можна провадити зразу за всіма або багатьма ознаками; кращі форми мікроорганізмів, рослин чи тварин відбирають, враховуючи лише певну обмежену кількість ознак, що цікавлять селекціонера.

В селекції застосовують *два основних типи добору: масовий та індивідуальний.*

Масовий добір провадиться на підставі лише фенотипових ознак, без оцінки особливостей генотипу. Оскільки однаковий фенотип може визначатися різними генотипами (розділ 1.4), то ефективність такого добору досить низька, особливо відносно кількісних ознак, на які дуже впливають умови зовнішнього середовища.

Разом з тим це найбільш простий і доступний тип добору, який стихійно застосовувався людиною з незапам'ятних часів і призвів

до створення численних сортів і порід народної селекції. Пізніше масовий добір свідомо став використовуватися селекціонерами і не втратив свого значення і сьогодні, бо в окремих випадках він дає непогані результати.

Все ж слід зазначити, що масовий добір діє дуже повільно, особливо якщо селектована ознака має низький коефіцієнт успадкованості. Іноді цей тип добору виявляється зовсім не ефективним. Останнє трапляється у тих випадках, коли популяція, в якій провадиться добір, є гомозиготною або майже гомозиготною по генах, які визначають дану ознаку (коефіцієнт успадкованості близький до нуля). Безрезультатність добору в гомозиготних лініях показав ще В. Йогансен в дослідях на квасолі.

Таким чином, масовий добір рідко буває успішним, якщо він провадиться на кількісні (полігенні) ознаки або властивості. У відношенні якісних ознак, які контролюються одним або небагатьма генами, ефективність масового добору може бути цілком задовільною.

Індивідуальний добір ґрунтується на оцінці генотипу рослини або тварини, що використовується у селекційному процесі. За індивідуального добору популяцію поділяють на лінії або сім'ї і проводять добір окремо в кожній з них, або здійснюють його серед нащадків, отриманих самоzapиленням окремих рослин (інбридинг). У тварин інбридинг (інцухт) досягається близькоспорідним схрещуванням.

Критеріями індивідуального добору, крім даних про фенотип, слугують результати детального аналізу генотипу батьків, для чого використовують всі доступні шляхи і методи оцінки вихідного матеріалу: дослідження родоводів, близьких і далеких нащадків, вивчення інформації про сорти та їх попередники, проведення аналізуючих схрещувань, цитологічних та біохімічних досліджень тощо.

В деяких випадках оцінка потенційних можливостей селектованих організмів може здійснюватися шляхом **сіб-селекції**, суть якої полягає в закладці індивідуальних сімей, проведенні індивідуальних схрещувань і поділі отриманих нащадків на дві частини в кожній сім'ї. Одну частину нащадків оцінюють на селективні ознаки і властивості; на підставі цих даних визначають найкращу сім'ю. Другу частину сибсів цієї сім'ї розмножують, отримують наступне покоління і всю процедуру повторюють.

На жаль, сіб-селекція не може бути використана в роботі з малоплідними тваринами із-за малої кількості сибсів. До інших недоліків методу слід віднести його довготривалість та неминучу втрату в більшості випадків генотипів вихідних особин, з яких почалася селекція. З розробкою методів штучного запліднення тварин та довготривалого збереження сперми останній з недоліків вдається усунути.

В роботі з рослинами сиб-селекція є надійним і зручним методом. Якщо декілька ліній рослин вивіряються, наприклад, на їх стійкість до дії ушкоджуючих чинників (збудників хвороб, посухи, холоду і т. ін.), то часто половину рослин кожної лінії вирощують за провокаційних умов, тобто за впливу відповідного чинника, а іншу половину — в оптимальних умовах. Порівнюючи результати, можна визначити ступінь резистентності рослин кожної лінії до ушкоджуючих агентів, а також їх потенційні продуктивні можливості за сприятливих умов вирощування. Слід враховувати, що за будь-якої форми індивідуального добору важливий не тільки сам добір, але й правильний вибір батьківських пар по їх генотипових показниках.

Індивідуальний добір дещо утруднений у випадку перехреснозапильних рослин, бо при цьому неможливо закласти індивідуальні самозапильні лінії. В останні роки на підставі знань про генетичний контроль несумісності у рослин ведеться робота по отриманню **самосумісних мутантів**, з допомогою яких можна подолати зазначені труднощі. Самосумісні мутантні форми виведено для жита та інших рослин-перехресників. Використання цих форм у селекції дає змогу значно збільшити гомозиготність рослин і застосувати методи індивідуального добору в селекції перехреснозапильних рослин.

Селекцію по кількісних ознаках полегшують спостереження за успадковуванням деяких непрямих показників продуктивності. Для цього використовуються деякі якісні маркери, що корелюють з показниками продуктивності і можуть слугувати відповідними сигналами («сигналії» по О. С. Серебровському). В ролі «сигналіїв» використовують електрофоретичні спектри деяких запасних білків у злаків, поліморфізм деяких ферментів та ін. Цей підхід дає результати в тих випадках, коли успадковування сигнальної ознаки корелює з успадковуванням ознак продуктивності завдяки зчепленню відповідних генів або співпаданню умов для їх максимальної експресії. В останні роки великі надії покладають на визначення мікросателітів, сайтів рестрикції та поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів у певних ділянках геному як показників сигнальної інформації.

16.9. Гетерозис у селекції

Крім високопродуктивних сортів та порід, до засобів виробництва слід віднести застосування в рослинництві і тваринництві гетерозисних форм.

Хоч явище гетерозису було описане ще І. Г. Кельрейтером, одним із попередників Г. Менделя, його механізм до кінця не з'ясовано й досі. Якщо інбредну депресію пов'язують з гомозиготизацією, то протилежне явище — гетерозис — пояснюють підвищенням гетерозиготності. Чим значніші генетичні відмінності у батьків, тим сильніше проявляється гетерозис у гібридів.

Гетерозис може торкатись далеко не всіх ознак рослини або тварини, тому можна вести селекцію на гетерозисний прояв певних ознак. А. Густафсон виділив декілька типів гетерозису у рослин, а саме:

1) **репродуктивний гетерозис**, який проявляється підвищеною плодючістю, збільшенням врожайності сільськогосподарських культур;

2) **соматичний гетерозис**, який супроводжується підсиленням розвитку і ростом, збільшенням вегетативної маси рослин;

3) **приспосувальний або адаптивний гетерозис**, який виражається підвищенням загальної життєздатності і стійкості до несприятливих умов.

Слід зазначити, що вияв гетерозису з тих чи інших господарсько цінних ознак, не завжди супроводжується підвищенням життєздатності і адаптивності рослин і тварин. Навпаки, висока врожайність (наприклад, злаків) та велика маса (деяких порід свиней) роблять їх більш чутливими до несприятливих умов середовища, вимагають дотримання всіх вимог агротехніки і зоотехніки.

Максимальний вияв гетерозису спостерігається в F_1 ; в наступних поколіннях ефект гетерозису зменшується і приблизно в F_8 зникає зовсім.

Вияви гетерозису залежать від напрямку гібридизації і можуть спостерігатися лише за одного із реципрокних схрещувань. Гібридизація одних ліній може дати кращі результати, ніж інших.

Тому дуже важливо оцінити наявний вихідний матеріал на комбінаційну здатність та спроможність утворювати гетерозисне насіння за гібридизації. Прогностичним показником властивостей гібридів F_1 слугує **загальна і специфічна комбінаційна здатність** батьківських форм, яку визначають за такою схемою.

Спершу самозапиленням або близько спорідненим схрещуванням створюють серію **інбредованих** (або **інбредних**) ліній з високим ступенем гомозиготності. У рослин цього досягають, як правило, після 6—8 поколінь самозапилення. Потім ці лінії схрещують одну з одною в усіх можливих варіантах, щоб виявити їх комбінаційну здатність. Остання дуже часто буває неоднаковою за різних варіантів схрещувань. Для отримання гібридного насіння вико-

ристовують кращі за комбінаційними властивостями батьківські форми. Саме так отримують гетерозисне насіння у кукурудзи, але оскільки інбредні лінії мають низьку плодючість, то насіння для масового висіву цієї культури отримують з допомогою міжлінійної та подвійної міжлінійної гібридизації (розділ 10.1.4). З цієї ж причини запропоновано використовувати за материнську форму сорт, а за батьківську — лінії. На Україні було районовано чимало сортолінійних гібридів кукурудзи: Успіх, Дніпровський 2, Колективний (Б. П. Соколов), Буковинський 2 і Буковинський 3 (В. С. Козубенко), Одеський 27 (О. С. Мусяйко) та інші.

В подальшому українськими вченими були отримані продуктивні лінії з високою комбінаційною здатністю. Завдяки цьому було створено десятки подвійних і простих міжлінійних гібридів кукурудзи: Одеський 50, Дніпровський 90, Орбіта, Ювілейний 60, Колективний 210 та інші.

Як вже зазначалося, цінні для господарства гетерозисні форми може дати не тільки міжлінійне внутрішньовидове схрещування (наприклад — подвійні міжлінійні гібриди кукурудзи), але й віддалена гібридизація (мул, бестер та ін.).

Численні теорії гетерозису можна звести до декількох основних груп.

Теорія домінування пояснює гетерозис накопиченням у гібриду сприятливих домінантних алелів у якомога більшій кількості локусів. Ці домінантні гени подавляють експресію шкідливих рецесивних алелей і взаємодіють між собою по принципу адитивності та комплементарності. Оскільки господарсько цінні ознаки успадковуються полігенно, то накопичення великої кількості адитивно взаємодіючих домінантних алелів у генотипі гібриду призводить до більш виразного вияву відповідних ознак. В наступних поколіннях йде розщеплення генів і вияви гетерозису слабнуть. Ця теорія, запропонована в 1908 р. Г. Девенпортом і потім розвинена Д. Джонсом, сьогодні відхилена як така, що не узгоджується з рядом фактів. Сучасні дані про гетерозиготність популяцій свідчать, що особини, гетерозиготні по численних рецесивних алелях, часто виявляються більш життєздатними, ніж гомозиготи з домінантних генів.

Теорія наддомінування наголошує на тому, що гетерозиготний стан генного локуса має перевагу ($AA < Aa > aa$) навіть тоді, коли рецесивний алель a у гомозиготі є летальним. Причиною цієї переваги вважають можливість прояву у гетерозигот міжалельної комплементарності, утворення гібридних білків-мультимерів для великої кількості ізозимів і т. п. (**теорія біохімічного збагачення**).

Про значення взаємодії алелів у вияві гетерозису свідчать приклади так званого **моногенного гетерозису**, який обумовлюється

16.10. Селекція сільськогосподарських рослин і тварин в Україні

Одні із перших генетичних і селекційних досліджень в Україні належать А. О. Сапегіну, який в 1912 р. розпочав читання циклу лекцій з генетики і цитогенетики в Новоросійському (Одеському) університеті. Свої знання генетики він успішно застосовував у селекції пшениць. Організована ним Одеська селекційна станція в 1928 р. була реорганізована в Український селекційно-генетичний інститут, який сьогодні є провідним закладом у селекції зернових і розробці теоретичних основ селекції.

Для розробки наукових і практичних питань селекції цукрового буряка в 1922 р. у Києві було створено Науковий інститут селекції, який з 1945 р. став Науково-дослідним інститутом цукрового буряка.

Велику роль у формуванні спеціалістів зіграв організований у 20-ті роки Маслівський сорто-селекційний технікум (Київська область). Цей перший у країні селекційний вуз підготував більш ніж 500 кваліфікованих спеціалістів, серед яких — відомі селекціонери Ф. Г. Кириченко, П. Ф. Гаркавий, В. С. Губернатор, П. А. Лубенець, М. О. Савченко та інші — автори видатних сортів пшениці, ячменю та інших культур.

В Україні було видано перші підручники і учбові посібники з генетики та селекції. Серед них «Загальна методика селекції сільськогосподарських рослин» А. О. Сапегіна, «Курс генетики» М. М. Гришко і Л. М. Делоне, «Загальна селекція і насінництво польових культур» під редакцією В. Я. Юр'єва та багато інших.

Початок бурхливого розвитку генетичних досліджень в Україні випадає на 1923 р., коли при Академії наук УРСР була створена комісія з біології та генетики. Цю комісію очолив І. І. Шмальгаузен, а одним із її членів був М. І. Вавілов, який уважно стежив за розвитком генетики в Україні і постійно сприяв цьому процесові.

Вже тоді вчені України приймали активну участь у розробці еволюційно-генетичних проблем. В 1928 р. І. М. Поляков опублікував у м. Харкові книгу «Сучасна еволюційна теорія», в якій показав тісний зв'язок еволюційного вчення і генетики. Величезні заслуги в розвитку еволюційної генетики належать вченому із світовим ім'ям — І. І. Шмальгаузену, який очолював Інститут зоології АН України, а також його співпрацівникам — І. І. Аголу, С. М. Гершензону, П. О. Ситько та іншим. Найважливіші теоретичні узагальнення в галузі еволюційної генетики були зроблені Е. І. Лукіним у його монографії, що вийшла в світ у 1940 р.

В. М. Лебедев у 1931 р. вперше отримав плодючі міжродові пшенично-житні тетраплоїдні гібриди, у яких 14 хромосом походило від пшениці і 14 — від жита ($2n = 28$). В 1976 р. А. Ф. Шуліндін і співробітники створили перший вітчизняний сорт озимого гексаплоїдного тритикале кормового призначення, а дещо пізніше ними ж був вперше отриманий сорт озимого гексаплоїдного тритикале, який дає якісне зерно. Цей сорт був створений шляхом схрещування озимої м'якої пшениці з диплоїдним житом і з наступним запиленням гібридів F_1 пилом гексаплоїдного тритикале.

Нові форми тритикале від різних комбінацій схрещування озимої твердої пшениці з диплоїдним житом синтезували вчені Селекційно-генетичного інституту УААН. З допомогою ембріокультури ними були отримані 21-хромосомні гібриди, які потім були переведені на більш високий плоїдний рівень і містили 42 хромосоми; із них 28 належали озимій твердій пшениці, а 14 — диплоїдному житю. Це дало можливість створити вихідний матеріал для селекції тритикале зернового і кормового напрямків з цінними господарськими властивостями. Було виведено сорти тритикале, що районовані не тільки в Україні, але й за її межами: Одеський кормовий (В. Н. Пильнев і співробітники), Zenit Одеський (М. Г. Максимов і співробітники) та ін.

Добре відомі й інші роботи українських дослідників по віддаленій гібридизації, а саме: ресинтез цукрового буряка схрещуванням кормового і листового (В. П. Зосимович), гібридизація соняшника з топінамбуром (І. І. Марченко) з отриманням високопродуктивних гібридів, багатих фруктозою, дослідження спонтанних гібридів між егілопсом і пшеницею (С. Х. Дука) та інші.

В Україні (вперше в бувшому СРСР) розпочато роботи по отриманню індукованих мутацій у сільськогосподарських рослин. Піонерами в цій області були Л. М. Делоне і В. І. Дідусь (1928 р.), а також А. О. Сапегін, який в 1930 р. опублікував результати своїх досліджень щодо впливу рентгенівських променів на пшеницю. Спадкові зміни у ячменю під дією гама-променів спостерігав М. О. Письменко. Ним були виявлені хлорофільні і карликові мутації, а також мутації щодо форми колоса і довжини стебла.

Мутагенна дія хімічних сполук була використана О. І. Супруненко для отримання мутацій у озимого жита. Значний внесок у розвиток хімічного мутагенезу вніс С. М. Гершензон та інші вчені.

Дослідження по індукованому мутагенезу були перервані Великою Вітчизняною війною і відновились лише після розгрому лисенківщини. Знову розпочалась інтенсивна робота по вивченню індукованого радіаційного і хімічного мутагенезу у сільськогосподарських

рослин (В. П. Зосимович, М. К. Сафін, А. Ф. Андрощук, В. Т. Манзюк, М. Р. Козаченко та інші).

Розробка методів отримання мутантних форм у пшениці і кукурудзи провадилася в Інституті молекулярної біології і генетики АН України (П. К. Шкварников, В. В. Моргун, М. І. Кулик, Е. О. Ларченко та інші). На основі отриманих мутантів тут було створено сорт озимої пшениці Киянка, гібриди кукурудзи Ювілейний 60 та Колективний 210.

Перші досліді по експериментальній поліплоїдії в Україні були проведені М. Ф. Ковалевською, Д. І. Малютою, З. О. Кожуховим та іншими вченими. Створені в Україні поліплоїдні гібриди цукрового і кормового буряків знайшли своє застосування в сільському господарстві.

Поліська тетра та інші поліплоїдні сорти жита районані на зерно і зелену масу в різних зонах України. Створення таких сортів — результат досліджень М. І. Худяк, А. Ф. Шулиндіна, В. М. Чердніченко, В. П. Пахомової, С. Г. Машталер та інших селекціонерів. Тетраплоїдні сорти конюшини виведені Н. К. Наваліхіною, а еспарцету — М. М. Полішвайком. Метод експериментальної поліплоїдії знайшов застосування в селекції шалфея мускатного, лаванди, базилику (О. О. Гостев), м'яти (С. О. Резнікова).

Широке використання в сільському господарстві України знайшли гетерозисні форми рослин. Цьому сприяли дослідження Б. П. Соколова, О. С. Мусійко, П. Ф. Ключко, В. С. Козубенко, Т. К. Шиманського, І. О. Шевцова, В. Г. Шахбазова та багатьох інших вчених.

В 50-х роках в Україні почалася робота по вивченню і використанню цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) з метою вдосконалення насінництва гетерозисних форм рослин. Б. П. Соколов і В. О. Гонторовський знайшли лінії кукурудзи, які повністю відновлюють фертильність. Явище ЦЧС у сорго вперше виявили Б. Г. Деміденко і А. Г. Троценко. Вперше в колишньому СРСР Б. Л. Погорлецьким і В. В. Бурловим створені і впроваджені у виробництво гібриди соняшника на основі ЦЧС.

С. П. Лифенко (Одеса) і А. І. Книш (Харків) виявили спонтанну ЦЧС у різних сортів пшениці. Були створені стерильні аналоги і відновники фертильності.

В останні роки успішній селекції рослин і тварин сприяють досягнення біохімічної та молекулярної генетики. Внаслідок великої експериментальної роботи українські вчені розробили ряд нових підходів щодо визначення і прогнозування господарсько цінних властивостей форм і сортів на підставі електрофоретичного вивчення поліморфізму запасних білків (О. О. Созинов, Ф. О. Попереля, В. І. Глаз-

ко), мікросателітів та рестрикційних фрагментів ДНК (Ю. М. Сиволап та інші). Такий підхід дає можливість проводити серійні дослідження вихідного матеріалу і цілеспрямовано здійснювати вибір кращих батьківських пар (пшениці, ячменю та інших рослин).

Значний вклад у розвиток нетрадиційних методів селекції рослин внесли Ю. Ю. Глеба, М. В. Кучук, П. В. Мельников, Т. П. Пастернак, В. А. Кунах та інші українські дослідники. З'ясування ними фізіологічних властивостей рослинних протопластів, особливостей процесу регенерації рослин із калусів, розробка технології злиття клітин і протопластів різного походження мають пряме відношення до генетичної інженерії рослин і отримання перспективного для селекції вихідного матеріалу. Шляхом зливання ізольованих клітин і протопластів створено міжродові гібриди тютюну і арабідопсису, арабідопсису і капусти, а також лінії гібридних клітин, культури яких використовуються як продуценти речовин, необхідних для харчової промисловості і медицини.

Добре відомі досягнення українських вчених у селекції сільськогосподарських та промислових тварин. Одним із центрів такої роботи став заповідник Асканія-Нова на Херсонщині. Тут функціонує Український науково-дослідний інститут тваринництва, який носить ім'я свого першого директора академіка М. Ф. Іванова, одного із засновників вітчизняної зоотехніки, автора знаменитої асканійської породи овець (асканійський рамбульє) і української степової білої породи свиней. Цей інститут сьогодні грає провідну роль у селекції тварин в Україні.

В Асканії-Нова створено високопродуктивний і стійкий до піроплазмозу гібрид схрещуванням корів червоної степової породи і биків зебу, виведено дуже перспективні породи овець-мериносів шляхом гібридизації свійських овець з дикими формами цих тварин і т. ін.

16.11. Селекція мікроорганізмів

Отримання штамів мікроорганізмів, здатних продукувати потрібні людині сполуки (білки, вітаміни, антибіотики та ін.), стало можливим завдяки розвитку хімічного та радіаційного мутагенезу (розділ 11.8) і розробці специфічних методів виділення мутантних форм з бажаними властивостями (розділ 11.4). Індукований мутагенез та ступеневий добір до виникнення генетичної інженерії були основними методами підвищення продуктивності промислових

штамів мікроорганізмів. Ці методи і сьогодні не втратили свого значення.

При цьому популяцію клітин обробляють мутагеном, висівають на повне та селективне середовище і досліджують колонії, що являють собою окремі клони клітин. Цей спосіб називають **клональним аналізом**. Згадаймо, що кожна колонія (**клон**) — це група генетично ідентичних клітин, що виникла шляхом розмноження однієї вихідної клітини. Як правило, штам-продуцент містить у геномі декілька мутацій, необхідних для підсиленого продукування тієї чи іншої сполуки. Послідовне введення цих мутацій у геном досягається технікою ступеневого добору.

Висока продукція тих чи інших речовин мікроорганізмами з накопиченням цих продуктів у клітинах або у навколишньому середовищі можуть обумовлюватися різними механізмами залежно від особливостей введених у геном мутацій. Серед цих механізмів найважливішими є такі:

1) надсинтез (суперпродукція) певної сполуки в зв'язку з мультиплікацією (ампліфікацією) відповідного гена;

2) ушкодження генів-регуляторів та операторів оперонів, що призводить до нерегульованого конститутивного синтезу;

3) збільшення проникливості плазматичної мембрани та клітинної стінки для продуктів селектованих генів і накопичення цих продуктів в інкубаційному середовищі;

4) спадковий дефект, що блокує біохімічну трансформацію даної сполуки в ланцюгу послідовних реакцій і тому сприяє її накопиченню;

5) наявність мутацій, що блокують гідролітичне розщеплення та інші шляхи розпаду даної сполуки до кінцевих продуктів у клітині;

6) наявність мутацій, які блокують використання сполук — попередників даного (бажаного) продукту на інші цілі.

Селектовані в останні роки мікроорганізми-надпродуценти, як правило, є комбінованими мутантами, у яких одночасно діють декілька механізмів підвищення продуктивності. Переконливий приклад ефективності такого комплексного підходу в селекції штамів *E. coli*, здатних синтезувати великі кількості триптофану, наводить С. І. Аліханян — відомий спеціаліст у галузі генетики і селекції мікроорганізмів.

Триптофан потрібен як кормова добавка в тваринництві, бо до складу численних рослинних білків входить дуже мало цієї амінокислоти, або вона в них відсутня зовсім.

Як вже зазначалося (розділ 3.3.1), біосинтез триптофану із хоризмової кислоти у *E. coli* здійснюється групою генів, об'єднаних

в один оперон. Біосинтез триптофану, як і хоризмової кислоти, інгібується кінцевим продуктом, який, крім того, активує білок репресор — продукт гена-регулятора. Таким чином, рівень біосинтезу триптофану в клітинах *E. coli* не може бути високим: він саморегулюється. Застосувавши генетичні методи, отримали штам *E. coli*, який за 1 годину стаціонарної фази росту продукує біля 80 мг триптофану на кожний грам сухої маси бактерій. Для цього в геном мутантного штаму з конститутивним синтезом триптофану, який був наслідком мутації в гені репресора або в опероні, вводили додаткові мутації, що запобігають інгібуванню кінцевим продуктом. На наступній стадії селекції в цей самий штам ввели мутації, що блокують утворення із хоризмової кислоти деяких інших амінокислот — фенілаланіну і тирозину. Завдяки цьому хоризмова кислота більш повно використовувалась на синтез триптофану, що збільшило його вихід. Нарешті, для забезпечення транскрипції всіх ініційованих молекул іРНК була введена мутація, яка інактивувала атенуатор. Таким чином був створений штам, здатний до необмеженого синтезу триптофану.

Шляхом індукованого мутагенезу з допомогою радіоактивного та ультрафіолетового опромінення, етиленіміну та інших хімічних мутагенів отримано високоефективні штами актиноміцетів — продуцентів пеніциліну, стрептоміцину, антибіотиків тетрациклінового ряду, еритроміцину, олеандоміцину та інших. С. І. Аліханян та співробітники, використовуючи сумісну дію декількох мутагенів, отримали штами з дуже високою здатністю до синтезу антибіотиків.

В деяких випадках штами-надпродуценти створювали гібридизацією клітин шляхом зливання сферопластів. Цим методом було створено штам з високою продукцією антибіотику цефалоспорину.

З розвитком генетики стало можливим створювати мікроорганізми, здатні до деградації нафтопродуктів та ксенобіотиків, що забруднюють довкілля. Для цієї мети конструюють штами, що містять одночасно декілька плазмід біодеградації або рекомбінантні плазміди, у складі яких об'єднано декілька транспозонів з необхідними генами. Отримані штами ефективно руйнують численні нафтопродукти, а також сиру нафту, і вже успішно застосовуються для очистки поверхні моря після аварій танкерів.

Поєднання класичних методів селекції мікроорганізмів з можливостями генноінженерних підходів дало можливість створити надпродуценти амінокислот на основі *E. coli*, інших бактерій. Серед вчених, що внесли певний вклад у селекцію мікроорганізмів-надпродуцентів, немало українських дослідників — Г. М. Шавловський, А. А. Сибірний, С. П. Гудзь, В. О. Федоренко та багато інших.

Саме так отримано штами мікроорганізмів-продуцентів вітамінів (B_2 , B_{12}), різних ферментів, інсуліну, гормону росту, соматостатину, інтерферону та інших дуже цінних для медицини сполук. Спектр мікроорганізмів, що використовуються як об'єкти для генноінженерних перетворень, постійно розширюється. Сьогодні як продуценти необхідних людині сполук використовуються штами *E. coli*, *B. subtilis*, псевдомонади, метолотрофні бактерії, дріжджі та інші мікроорганізми, яким властива підвищена експресія клонованих у них генів.

Слід, однак, зазначити, що незважаючи на очевидні успіхи у створенні мікроорганізмів, здатних синтезувати ряд важливих продуктів, властивих еукаріотам, проблема експресії чужорідних генів у прокаріотів має ряд обмежень. Серед них найважливішими є такі:

1) надпродукція корисних людині і не потрібних самій клітині сполук зменшує стабільність генотипів трансформованих клітин. Стабільність гібридних ДНК зменшується також із збільшенням розмірів вставок у вектор;

2) еукаріотні промотори не завжди можуть розпізнаватися бактеріальною РНК-полімеразою;

3) іРНК, що транскрибуються на еукаріотних генах, не містять послідовності Шайн—Далгарно, необхідної для взаємодії іРНК з бактеріальними рибосомами;

4) еукаріотна іРНК може містити невласиві прокаріотам інтрони, які необхідно вилучити;

5) невласиві прокаріотній клітині білки часто стають субстратами для протеаз цієї клітини і легко руйнуються.

Розроблено методи, спрямовані на послаблення цих обмежень. Так, наприклад, в рекомбінантну ДНК вбудовують промотори, що добре регулюються в бактеріальній клітині і захищають її від непомірного надлишкового синтезу чужого білка. Створено вектори, які несуть бактеріальні промотори і послідовності Шайн—Дальгарно, необхідні для експресії стороннього гена. В окремих випадках замість природних генів використовують кДНК або хімічно синтезовані гени, у яких немає інтронів. Протеазну активність реципієнтних бактерій вдається усунути, працюючи з мутантами по генах протеаз, або шляхом генноінженерної перебудови еукаріотного гена, внаслідок якої відповідний генів білок не сприймається бактеріальною клітиною як чужорідний.

Всі ці досягнення сприяли тому, що генетична інженерія сьогодні є надійним і ефективним джерелом нових форм мікроорганізмів — продуцентів гормонів, вакцин, антитіл, ферментів і інших речовин, необхідних для медицини, сільського господарства і мікробіологічної промисловості.

16.12. Нетрадиційні методи селекції

16.12.1. Генетична інженерія

Яскравою ілюстрацією зовсім нових можливостей, створених сучасною генетикою у справі цілеспрямованої перебудови спадкових можливостей організму, є досягнення генетичної інженерії, що виникла на основі молекулярної генетики як її прикладна галузь.

Поняття «генетична» та «генна» інженерія часто вживаються як синоніми, хоч перше з них є більш широким і передбачає способи маніпуляцій не тільки з окремими генами, але й з більш значними фрагментами геному, включаючи цілі хромосоми.

Генетична інженерія не передбачає перебудови геномів звичайними генетичними методами, такими як штучний мутагенез та гібридизація. Йдеться про шляхи експериментального втручання, що дають можливість змінювати геноми по заздалегідь розробленому плану, впливаючи на кількість і якість вміщеної в них генетичної інформації.

До сфери генетичної інженерії С. М. Гершензон відніс такі операції:

- 1) синтез генів поза організмом;
- 2) виділення із клітин окремих генів або генетичних структур (фрагментів хромосом, цілих хромосом або навіть клітинних ядер);
- 3) спрямовану перебудову виділених структур;
- 4) копіювання і розмноження виділених або синтезованих генів та інших генетичних структур;
- 5) перенос і включення таких генів або генетичних структур у певний геном, що підлягає перебудові;
- 6) експериментальне поєднання різних геномів в одній клітині.

Слід зазначити, що традиційні методи створення вихідного матеріалу (штучний мутагенез, гібридизація) обмежені рамками певного виду або близьких у видовому відношенні форм. Генетична інженерія створила можливості синтезу організмів з новими, часто відсутніми у природі, комбінаціями спадкових властивостей шляхом поєднання в одному геномі генетичних детермінантів різних джерел, включаючи представників дуже віддалених видів.

Методи генної інженерії дозволяють отримувати рекомбінантні ДНК із фрагментів геномів різних організмів, клонувати такі штучно створені молекули, вводити їх у клітину з допомогою **векторів** (плазмід або вірусних ДНК) і створювати умови для експресії в клітині цих введених зовні, часто зовсім чужорідних генів. Таким чином, маніпуляції в цьому випадку здійснюються на рівні молекул ДНК, і перенос генів (**трансгенез**) із клітини в клітину може не за-

лежати від таксономічної спорідненості організмів. В цьому полягає основна відмінність генної інженерії від традиційних підходів до перебудови генотипів. Однак ця перевага генетичної інженерії зовсім не означає, що можливості останньої безмежні і що завжди шляхом штучного введення в геном чужого гена або сукупності таких генів можна зразу отримати новий штам, сорт або породу. Не слід забувати про те, що будь-яке штучне втручання в кількісний або якісний склад генетичного апарату різко змінює загальний генний баланс, і це в більшості випадків зменшує життєздатність і продуктивність клітин та організмів. Слід зважити і на те, що в окремих випадках пересаджений ген у чужому генотиповому оточенні з ряду причин може зовсім не функціонувати, і для його експресії іноді необхідні додаткові досить складні генноінженерні втручання. Ці та інші обмеження генетичної інженерії примушують розглядати її в основному як ефективний шлях до створення принципово нового вихідного матеріалу, який потребує подальшого вдосконалення шляхом селекції.

Виконання будь-якої генноінженерної програми передбачає необхідність виділення фрагментів ДНК, які несуть необхідний ген; поєднання їх *in vitro* з векторними молекулами, здатними переносити цей ген у реципієнтні клітини; створення умов для стабільного успадковування і ефективної експресії перенесеного гена в чужому генотиповому середовищі. Успішне вирішення цих проблем стало можливим завдяки:

- 1) відкриттю явища рестрикції-модифікації ДНК і виділенню специфічних ферментів — рестриктаз, необхідних для отримання фрагментів ДНК з однаковими кінцевими послідовностями (розділ 5.1);
- 2) упровадженню в практику генної інженерії методів хімічного і хіміко-ферментативного синтезу генів (розділ 13.3.1);
- 3) виявленню природних і створенню штучних векторних молекул ДНК, здатних перенести в реципієнтну клітину фрагменти сторонньої ДНК, забезпечити включення їх у відповідний геном та їх експресію (розділи 12.2 і 12.3);
- 4) розробці методів поєднання фрагментів ДНК різного походження з утворенням рекомбінантних молекул (розділ 5.1);
- 5) розробці методів клонування молекул ДНК та створенню бібліотек генів (розділ 13.3.1);
- 6) отриманню мічених зондів і використанню Саузерн-блотинга для розпізнавання і виділення специфічних фрагментів із тотальної ДНК або бібліотеки генів (розділ 13.3.1);
- 7) розробці методів трансформації і трансдукції (розділи 12.3.2 і 12.3.3) для різних організмів і добору клонів, що несуть рекомбінантні молекули ДНК.

Роком народження генної інженерії вважають 1972 р., коли група дослідників у США під керівництвом П. Бергера отримала першу штучно створену **рекомбінантну молекулу ДНК**. Функціонально активні рекомбінантні ДНК мікроорганізмів вперше були сконструйовані С. Коеном, Д. Хелінським, Г. Бойером та їх співробітниками. Одночасно групою С. Коена була вирішена проблема об'єднання фрагментів ДНК різного походження з векторними молекулами ДНК (плазмід, бактеріофагів). З допомогою ферментів рестриктаз і лігаз були створені перші «химерні» плазмід, до складу яких входили зшиті в одну кільцеву молекулу фрагменти ДНК не тільки різних видів бактерій, але й різних рослин і тварин. Послідовність методичних процедур, що необхідні для отримання «химерних» плазмід, зображена на рис. 16.1.

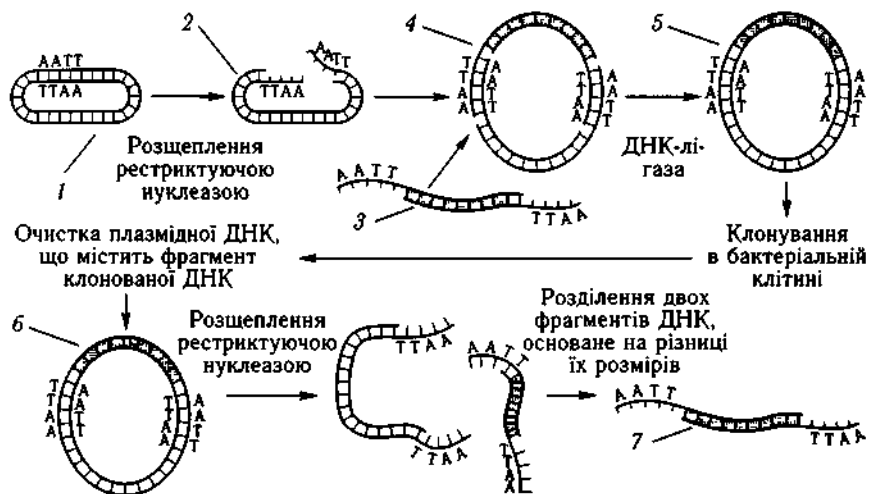


Рис 16.1. Схема отримання рекомбінантної (химерної) плазмід та виділення клонованого у складі плазміді фрагмента геномної ДНК:

1 — кільцева молекула плазмідної ДНК; 2 — лінійна молекула плазмідної ДНК з липкими кінцями; 3 — фрагмент ДНК, отриманий після розщеплення хромосомної ДНК такою ж рестриктуючою нуклеазою; 4, 5, 6 — плазмідна молекула ДНК, що містить вставку хромосомної ДНК; 7 — чистий фрагмент клонованої ДНК

У складі векторів будь-які фрагменти ДНК можна клонувати (тобто розмножувати) введенням вектора в реципієнтну клітину (як правило, це *E. coli*). Введення штучних плазмід у бактеріальні клітини досягається шляхом трансформації, якщо ж в ролі векто-

ра виступає бактеріофаг або інший вірус (для еукаріотних клітин, наприклад, вірус мавп SV40), то проникнення сторонньої ДНК у клітину здійснюється шляхом трансдукції. Реципієнтні клітини та організми з невластивими їм ознаками, що виникли завдяки проникненню в них чужорідної ДНК, називають **трансформованими**. *Перенос в реципієнтні клітини чужої ДНК з допомогою плазмід називається **плазмідною трансформацією***.

На зорі ери трансформації клітин і клонування генів Г. Бойер і співробітники з метою введення сторонньої ДНК у бактерії створили дуже популярну серію векторів, відому як плазмиди pBR.

Одна із таких плазмід — pBR322 — містить гени стійкості до ампіциліну і тетрацикліну. Між цими двома генами лежить оріджин реплікації. Плазмиди містить лише по одному сайту рестрикції для цілої групи рестриктаз — EcoRI, BamHI, PstI, HindIII, SalI та інших. Це дає змогу вбудовувати в плазмиду сторонню ДНК, не руйнуючи саму плазмиду.

В наші дні в ролі плазмідних векторів використовують інші, більш зручні плазмиди серії pUC. Ці плазмиди сконструйовано на основі плазмиди pBR322 шляхом вилучення із неї біля 40% її ДНК, включаючи ген резистентності до тетрацикліну. Ген резистентності до ампіциліну і оріджин реплікації в плазмідах pUC збережено. Найважливішим є те, що замість вилученої послідовності pUC-вектори утримують цілий кластер сайтів рестрикції для різних рестриктаз, а також невеликий фрагмент гена β-галактозидази, позначений як ген *LacZ'*. Вся ця досить протяжна область плазмиди названа **множинним сайтом клонування** — **MCS** (multiple cloning site). Крім того, завдяки С-кінцевому фрагменту гена β-галактозидази у складі плазмиди pUC, трансформована бактерія шляхом внутрішньоцистронної комплементации отримує активний фермент із двох неактивних його частин. За наявності активної β-галактозидази у бактерій добавлений у середовище синтетичний галактозид X-gal розщеплюється, і барвник-індикатор забарвлює трансформовані колонії у синій колір, завдяки чому вони легко розпізнаються.

Множинний сайт клонування дає можливість розрізати плазмиду одночасно двома різними рестриктазами (наприклад, EcoRI і BamHI), а потім вбудовувати і клонувати фрагмент сторонньої ДНК з двома різними кінцями (*EcoRI*-кінцем і *BamHI*-кінцем). Таке клонування називають **спрямованим** або **примусовим**, бо за нього стороння ДНК вбудовується у вектор лише в одній, цілком прогнозованій орієнтації. Цей спосіб клонування має ряд переваг, одна із яких — відсутність «липких» кінців у плазмиді після її розтину, що виключає замикання цих кінців «на себе» ще до утворення рекомбінантної структури.

Перші штучні **фагові вектори** були сконструйовані Ф. Блетнером і співробітниками на основі геному фага λ . Із останнього були вилучені гени, відповідальні за лізогенію, і збережена область геному, необхідна для літичної фази розвитку. На місце вилученої частини геному стало можливим вбудовування фрагментів чужорідної ДНК. Їстотною перевагою фагових векторів перед плазмідними є те, що в них можна вбудовувати значно довші послідовності сторонньої ДНК. Так, вектор, створений на основі геному фага λ і названий вектором Чагон-4, може акцептувати до 20 кб ДНК, тобто майже вся ДНК голівки фага може бути заміщена чужорідним матеріалом. Такі **заміщені вектори** використовують для побудови геномних бібліотек.

Інші вектори, придатні для клонування великих фрагментів ДНК, були названі **космідами**. Косміди бувають як плазмідні, так і фагові. Вони містять *cos*-сайт або липкий кінець ДНК фага λ , який дозволяє будь-якій ДНК пакуватися у голівку фага λ . Косміди містять плазмідний оріджин реплікації, завдяки чому реплікуються у бактеріях як плазмідні. Оскільки майже весь геном фага, за виключенням *cos*-сайта, в космідах втрачений, в них є чимало місця для сторонньої ДНК (40—50 кб). Утворена рекомбінантна косміда упаковується у капсид фага. Така частка не може розмножуватися як фаг, але здатна проникати в бактерію, де вона реплікується як плазмідна.

Із інших фагових векторів, що придатні для клонування, заслуговує уваги вектор, сконструйований на основі одноланцюгової ДНК фага M13. Він містить фрагмент гена *lacZ'* і множинний сайт клонування, як і плазмідна рUC.

На цьому ж принципі недавно створено новий клас одноланцюгових векторів, які поєднують властивості як фагів, так і плазмід. Ці вектори названі **фагемідами**. Найчастіше використовують їх різновид, що отримав назву рBS. В ці вектори вбудовано оріджин реплікації одноланцюгового фага f1, спорідненого з фагом M13. Клітини, інфіковані одночасно фагемідою і фагом-помічником f1, здатні реплікувати і упаковувати в капсид одноланцюгову фагемідну ДНК разом із вбудованими в неї сторонніми генами.

Плазмідні та фагові вектори використовуються в селекції як з метою клонування певних послідовностей ДНК, так і для трансформації клітин і організмів у бажаному напрямку.

Оскільки рекомбінантні молекули в трансформованих бактеріях звичайно являють собою строкату суміш молекул, що відрізняються між собою фрагментами сторонньої ДНК, то проводять **молекулярну селекцію**, тобто добір трансформованих клітин з бажаними ознаками та властивостями. Добір здійснюють за допомогою селективних середовищ, тобто за принципом, що використовується в ге-

метиці мікроорганізмів для виділення тих чи інших штамів. Цей принцип лежить також в основі селекції трансформованих клітин еукаріотів.

Зараз відомо чимало прикладів генетичної трансформації мікроорганізмів (бактерій, грибків), а також клітин еукаріотів *in vitro*. Ці досягнення генної інженерії широко застосовуються в технології мікробіологічного виробництва необхідних людині білків та інших біологічно активних сполук, наприклад, інсуліну, соматостатину, інтерферону, амінокислот, антибіотиків. Тому вони детально розглядаються в курсі біотехнології, так само як і інші досягнення генетичної інженерії.

Генноінженерні перетворення еукаріотних об'єктів натикаються на значні труднощі і тому ще знаходяться в основному на стадії експериментальних розробок.

Трансформація еукаріотів за допомогою бактеріальних плазмід мало ефективна, бо реплікатори бактерій і їх плазмід не функціонують в еукаріотних клітинах. Для того, щоб виникла стабільна трансформована форма еукаріотної клітини, необхідно не тільки проникнення в неї чужої ДНК, але й рекомбінація останньої з хромосомною ДНК, тобто інтеграція. Така інтеграція легше вдається у випадку еукаріотних мікроорганізмів, для добору яких існують селективні середовища. Прикладом може бути трансформація хлібних дріжджів (*Sacch. cerevisiae*) з допомогою бактеріальної плазмиди ColE1, в яку був вбудований фрагмент ДНК дріжджів, що містив ген *Leu2* (кодує β -ізопропілмалатдегідрогеназу). Реципієнтом був штам дріжджів, мутантний по гену *Leu2*. Сферопласти (клітини без оболонки) штаму-реципієнта трансформували химерною плазмідною. Частота трансформації склала $1 \cdot 10^{-6}$ в розрахунку на регенеруючі сферопласти, тобто на кількість клітин, що відновили оболонку.

Збільшити вихід трансформантів допомагають спеціально сконструйовані вектори, здатні реплікуватись у різних як прокариотних, так і еукаріотних клітинах. До таких векторів відносяться так звані «човникові» або гібридні плазмиди, що мають два різних реплікатори, наприклад, один — від *E. coli* (бактеріальний), а другий — від дріжджевої плазмиди (еукаріотний). Подібна плазмиди може реплікуватись як у клітинах *E. coli*, так і *Sacch. cerevisiae*. Для клонування генів у дріжджах створені вектори на основі декількох репліконів, що містяться в ДНК хромосом і мітохондрій дріжджів. Вони дозволяють отримувати трансгенні форми цих найбільш простих еукаріотів. РНК-полімераза дріжджів розпізнає численні промотори генів вищих еукаріотів, а наявна у них система процесингу забезпечує вилучення інтронів у складі іРНК і синтез функціо-

нально активних білків. Отримано штами дріжджів — продуцентів α -інтерферону людини, поверхневого антигену вірусу гепатиту B₁, деяких гормонів.

Сконструйовано також спеціальні вектори для переносу (трансгенозу) чужорідних генів у клітини вищих рослин і тварин.

Існуючі та потенційні вектори для рослин можна розподілити на декілька категорій:

1) вектори, отримані на основі бактеріальних плазмід, здатних інтегруватись у геном рослини-реципієнта — це Ti-плазмід *Agrobacterium tumefaciens* і Ri-плазмід *Agrobacterium rhizogenes*;

2) вектори, сконструйовані на основі ДНК вірусних та віроїдних патогенів рослин;

3) вектори, які можуть існувати в рослинних клітинах як незалежні реплікони (мітохондріальна та хлоропласна ДНК);

4) вектори, отримані на основі нестабільних компонентів геному рослин (так званих транспозибельних елементів).

Найбільш перспективні вектори сконструйовані на основі плазмід Ti і Ri. Онкогенні взаємовідносини між ґрунтовою бактерією *A. tumefaciens* і дводольними рослинами (захворювання останніх на корончатий гал), а також аналогічна екологічна взаємодія *A. rhizogenes* з тими ж рослинами (синдром «бородатий корінь») є прикладом генної інженерії, що відбувається у природі з давних часів без участі людини.

Утворення корончатих галів-пухлин за інфікування рослини *A. tumefaciens* супроводжується стабільною інтеграцією сегмента наявної в вірулентних агробактеріях Ti-плазмід в ДНК ядер клітин рослини. Внаслідок цього досить протяжна послідовність бактеріальної плазмід (так звана T-ДНК) стає складовою частиною спадкового апарату трансформованої (пухлинної) рослинної клітини. Гени T-ДНК обумовлюють гіперпродукцію фітогормонів (цитокінінів і індолілоцтової кислоти), а також синтез ряду похідних амінокислот, об'єднаних загальною назвою — опіни. Все це відбувається лише за умови трансформації рослинної клітини Ti-плазмідом. Опіни, що синтезуються в клітинах пухлин, бактерія використовує як джерело вуглецю і азоту для свого росту і розвитку. Все сказане свідчить про те, що Ti-плазмід — це природний вектор для трансформації клітин вищих рослин. На основі цієї плазмід, а також плазмід Ri сконструйовано цілий ряд штучних векторів для переносу сторонніх генів у геноми вищих рослин. Ген, що переноситься і клонується, вбудовують у T-ДНК Ti-плазмід замість кодуєчої частини генів опінів. Після зараження рослини такою химерною плазмідом її T-ДНК із штучно вбудованим геном інтегрується в хромосому ДНК клітини-хазяїна. Встановлено, що таким

способом може ефективно переноситись і стабільно інтегруватись у хромосоми рослин досить протяжна послідовність чужорідної ДНК (довжиною 50 тис. п. н. і більше). Перші досліді в цьому напрямку були здійснені Дж. Шелом (Німеччина), М. ван Монтегю (Бельгія), М. Д. Чилтон (США), Р. Шільперутом (Голандія) та іншими дослідниками. Успішні переноси генів у рослини з допомогою Ti-, а потім і Ri-плазмід розпочались з 1981 р. Перші спроби вве-

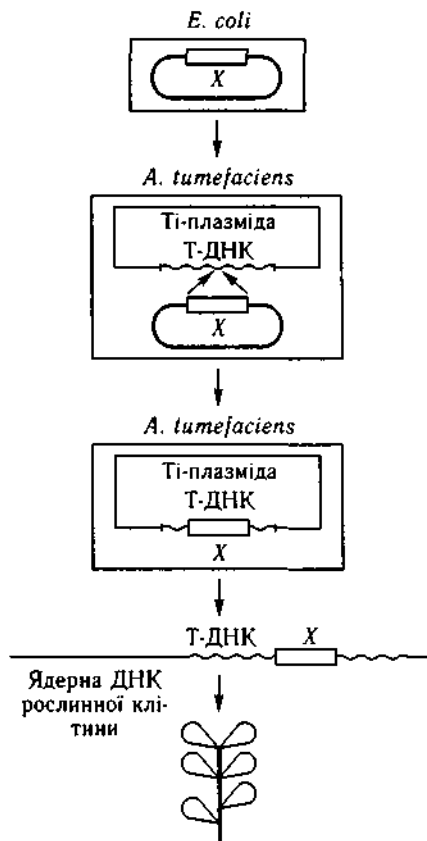


Рис. 16.2. Схема основних етапів експерименту по переносу чужого гена *X* з допомогою «проміжних» векторів

З'ясувалося, що чимало чужих генів, перенесених у клітини рослин за допомогою Ti-плазмід, стабільно зберігаються в росли-

днення сторонніх генів у рослини з допомогою Ti-плазмід стосувалися переважно бактеріальних генів, що несуть ознаки стійкості до антибіотиків (метатрексату, канаміцину, неомицину та ін.). Ці досліді були необхідні для того, щоб переконатись у можливості стабільної трансформації рослинних об'єктів чужими, в даному випадку прокаріотними, генами. В подальшому бактеріальні гени резистентності до антибіотиків використовувалися як селективні маркерні гени за добору рослинних клітин, трансформованих в інших напрямках. Для більш успішного введення в рослинні клітини і протопласти бактеріальних генів були сконструйовані «човникові» або «проміжні» вектори, здатні стабільно підтримуватись як в клітинах *A. tumefaciens*, так і в клітинах *E. coli* (рис. 16.2). В останні роки на основі Ti-плазмід створено штучні космідні вектори, невеликі за розмірами, які вдало поєднують можливості декількох «човникових» плазмід і природної системи трансформації у *A. tumefaciens*.

нах-регенерантах і успадковуються, але їх експресія на рівні синтезу відповідних білків не виявляється. Так, гени α -актину курчат і алкогольдегідрогенази дріжджів не транскрибувалися після їх переносу в клітини тютюну, хоч в регенерованих клітинах ген, наприклад дріжджів, виявлявся в численних копіях. Приблизно така ж ситуація спостерігалася за переносу в рослини інших генів: канаміцин-резистентності Tn5 *E. coli*, геномного клону зеїну кукурудзи, β -глобуліну кролика і т. ін.

Відсутність експресії в цих та інших випадках трансгенозу пояснюється тим, що сигнали розпізнавання і відповідної регуляції в чужорідній ДНК не сприймаються ферментами клітини-хазяїна. Щоб усунути цю перешкоду, в вектори, штучно створені на основі Ti- та Ri-плазмід, вводять найбільш ефективні в умовах рослинних клітин промотори, термінатори і т. п. Найбільш ефективними в цьому відношенні виявились промотори T-ДНК, наприклад промотор NOS-гена (нопалінсинтетази) плазмиди Ti. Він не містить канонічної прокариотної послідовності і є скоріше еукаріотним за функціональними і структурними критеріями. Тому він, як і деякі інші, часто використовується при конструюванні химерних генів і химерних проміжних плазмід, які використовуються в дослідках по трансгенозу у рослин. Вектори з NOS-промотором придатні для широкого кола хазяїв; вони функціонують у калусах всіх дводольних рослин і практично в усіх регенерованих тканинах.

На сьогодні з допомогою Ti-плазмід здійснено пересадку багатьох десятків генів вищих рослин, включаючи обмін генами між двома таксономічно віддаленими формами. Одна із перших експериментальних розробок у цьому напрямку — пересадка гена фазеоліну бобів у клітини соняшника. В калусній масі трансгенного соняшника імунологічно виявлялися фазеолінові поліпептиди, що свідчило про успішний перенос відповідного гена від одного сімейства рослин до іншого.

Пізніше було здійснено успішну пересадку зеїнового гена Z4 із клітин кукурудзи в клітини соняшника, гена фазеоліну в рослини тютюну та ін.

Модельні досліді привели до отримання трансгенних рослин з наявністю в їх геномі генів тваринного походження. Так, наприклад, у рослини петунії перенесено ген дегідрофолатредуктази мишей, внаслідок чого клітини петунії набули резистентності до метатрексату. Успішна експресія цього гена в клітинах рослин була досягнута приєднанням гена миші до конститутивного промотора вірусу CaMV, який нормально експресується в рослинах. Досліджена експресія химерного гена нопалінсинтетази/гормону росту людини в трансформованих калусних клітинах петунії і тютюну.

Нормальна експресія гена людини була наслідком його вбудови між промотором і термінатором *NOS*-гена Т-ДНК.

Наступні успішні експерименти по отриманню трансгенних рослин продемонстрували можливість конструювання рослин з прогнозованими властивостями, що вкрай необхідно для створення унікального вихідного матеріалу для селекції. Отримано докази того, що перенос Т-ДНК і експресія генів Т-ДНК можливі принаймні у деяких однодольних рослин. Це вселяє надію на те, що Ti- та Ri-плазмиди можуть бути використані для спрямованої трансформації однодольних, наприклад, для переносу генів азотфіксації від бульбочкових бактерій до злакових рослин. Інтенсивні дослідження в цьому напрямку проводяться в ряді країн.

Слід зазначити, що, крім векторів на основі Ti- та Ri-плазмід, широко використовуються вектори, сконструйовані на основі вірусів, наприклад, CaMV (вірус мозаїки цвітної капусти — *cauliflower mosaic virus*), деяких РНК-фітовірусів та віроїдів.

Плазмідна трансформація рослинних клітин утруднюється наявністю клітинних стінок, тому для роботи використовують протопласти, тобто клітини без стінок. Розробка методології виділення, культивування і злиття протопластів стала справжньою революцією в генній інженерії рослин.

Особливо необхідним є використання протопластів у генетичній інженерії однодольних рослин, наприклад злаків, які не інфікуються агробактеріями. В цих випадках використовується здатність молекул ДНК поглинатися протопластами (явище трансформації). Сьогодні, крім методів трансформації, використовують мікроін'єкції, електропорацію, перенос ДНК з допомогою ліпосом, сумісне культивування протопластів рослин із сферопластами бактерій і т. ін.

Генна інженерія відкриває блискучі перспективи розвитку досліджень у напрямку поліпшення продуктивності сільськогосподарських рослин, включаючи співвідношення та амінокислотний склад запасних білків, толерантність рослин до стресових умов середовища, стійкість до пестицидів та інших отрут, скоростиглість, врожайність та ін. Слід, однак, зважати на те, що більшість найцінніших агрономічних властивостей рослин контролюється недостатньо вивченими мультигенними системами. Це значно ускладнює проблеми генетичної інженерії, для вирішення яких потрібні великі кошти і значний час.

Одним із реальних успіхів генної інженерії є отримання трансгенних рослин, стійких до шкідливих комах (М. ван Монтегю). Вже багато років для боротьби з комахами використовують спори бактерій так званої тюрингської (по місцю виявлення) бацили. Ці спори містять бацилярний білок — проєндотоксин, із якого під впли-

вом протеаз шлунку чутливої до бацили комахи утворюється активний ендотоксин. Ген *bt2*, що кодує синтез ендотоксину, з допомогою плазмиди pBR322 вносили в штам агробактерій із штучно зміненими Tі-плазмідами. Генетична рекомбінація між Tі-плазмідною і химерною плазмідною призводила до утворення однієї молекули ДНК. Трансгенні рослини тютюну, стійкі до деяких шкідливих комах, отримували методом зараження трансформованою агробактерією листових дисків. Трансформовані рослинні тканини на спеціальному штучному середовищі утворювали нечутливі до тютюнового бражника пагони-регенеранти.

Вченими США ген зазначеного ендотоксину був поставлений під контроль сильного промотора вірусу мозаїки цвітної капусти і введений у рослини томатів, картоплі і огірків. Створено, наприклад, генотипи картоплі, стійкі до колорадського жука.

Дуже важливо, що рослини, здатні синтезувати свій власний інсектицидний білок, вбивають тільки певні види комах, не наносячи шкоди кохам-запилувачам, наприклад, бджолам. Перспективними є дослідження по створенню рослин, що знищують москітів, комарів та інших комах. Отримано трансгенні водорості, що містять ген токсину тюрингської бацили і вбивають малярійного комара анофелеса.

Інший реальний успіх генної інженерії рослин — створення генотипів, стійких до дії гербіцидів. Сьогодні в сільському господарстві використовують чимало принципово нових і дуже ефективних гербіцидів — гліфосат (похідне гліцину), хлорсульфурон (похідне сульфанілсечовини), біалофос (синтезується одним із видів грибків стрептоміцетів) та ін. З'ясувалося, що гербіциди діють на ті чи інші ферменти, які мають відношення до фотосинтезу або синтезу амінокислот у чутливих рослин. Гліфосат, наприклад, пригнічує активність ферменту, необхідного для біосинтезу ароматичних амінокислот, біалофос подавляє синтез глютамінової кислоти і т. п.

Стійкість до будь-якої отрути можна індукувати багатьма способами. По-перше, можна спровокувати мутацію в гені, який кодує фермент, чутливий до дії отрути. Мутантна форма ферменту може зберегти активність, але втратити чутливість до гербіциду. По-друге, можна збільшити ефективність біосинтезу ферменту-мішені в рослині, що надасть останній додаткової стійкості до отрути. Нарешті, можна ввести в рослину ген, який забезпечує синтез ферментів та інших речовин, що інактивують отруту. Всі ці підходи використовуються генними інженерами з метою створення стійких до гербіцидів рослин.

Із салмонел, нечутливих до гліфосфату, вилучили мутантний ген і ввели до складу вектора, створеного на основі плазмиди Rі. Бакте-

риальний ген перенесли в клітини тютюну, створивши належні умови для його експресії в новому середовищі. Рослини, отримані за регенерації трансформованих клітин, містили мутантний бактеріальний фермент і виявилися в декілька разів стійкішими до глифосату, ніж контрольні.

Дослідники американської компанії «Монсанто» виділили із клітин петунії рРНК, що кодує будову чутливого до глифосату ферменту. На цій рРНК з допомогою ревертази була синтезована кДНК. Останню включали у векторну плазмиду, де ставили під контроль сильного промотора, взятого із геному вірусу мозаїки цвітної капусти. Трансформовані таким химерним геном рослини петунії синтезували в 20—60 разів більше ферменту-мішені, ніж звичайні рослини, і не гинули після обробки їх глифосатом.

Арсенал генів стійкості до гербіцидів постійно поповнюється. Як показали дослідження під керівництвом С. В. Шестакова (Москва), їх джерелом можуть стати синьозелені водорості (шанобактерії). Гени стійкості до гербіцидів триазинів, які пригнічують процеси фотосинтезу в чутливих рослинах, перенесено з допомогою Ті-плазмід із шанобактерій в клітини тютюну.

Таким чином, надання культурним рослинам стійкості до шкідливих комах і гербіцидів — приклад цілком конкретних проблем, у вирішенні яких генна інженерія досягла очевидних успіхів.

Практично дуже важливими є спроби створити трансгенні рослини, нечутливі до ураження інфекційними агентами, особливо вірусами. Не менш важливою є і інша проблема, яка зараз вирішується, — підвищення якості продуктів харчування шляхом збільшення цінності рослинних білків. Одним із прикладів подібних досліджень можуть бути роботи К. Мюнца і співробітників (Німеччина), які збагатили запасний білок бобової рослини *Vicia faba* метионіном шляхом збільшення в одному із генів кількості триплетів, що кодують метионін. Внаслідок цього в кінці поліпептидного ланцюга білка леугміну В замість двох залишків метионіну виявилось чотири. Модифікований ген леугміну ввели в Ті-плазмиду агробактерії, а потім у клітини тютюну. Насіння рослин-регенерантів містило модифікований леугмін В, збагачений метионіном. Цей модельний дослід відкрив ясну перспективу отримання насіння різних культур з поліпшеним запасним білком.

Крім згаданих, є і інші підходи до вирішення проблеми по підвищенню рівня збалансованості кормів та цінності харчових продуктів.

Можливості генної інженерії рослин дуже великі, тому вчені сьогодні беруться за різноманітні проекти, які ще недавно здавалися фантастичними — створення генотипів рослин, здатних засвоювати азот атмосфери, рости на засолених ґрунтах тощо.

Разом з тим треба зазначити, що практичне використання трансгенних рослин викликає серйозне занепокоєння з боку багатьох вчених-генетиків та екологів Є побоювання, що вживання в їжу генетично трансформованих рослин та виготовлених із них продуктів може виявитися шкідливим для тварин та людей у найближчому чи віддаленому майбутньому Не виключається також можливість розповсюдження генів стійкості до гербіцидів та інших генів від трансгенних культурних рослин до дикої флори, що могло б істотно змінити екологічну ситуацію у природі та ускладнити сільськогосподарське виробництво Отже, незважаючи на унікальні можливості методів генної інженерії, до їх практичного застосування слід підходити дуже виважено і обережно

Все ж вчені сподіваються, що подальше вдосконалення векторних систем буде сприяти упровадженню генноінженерних методів у процес створення вихідного матеріалу для селекції рослин

Значно скромнішими виглядають успіхи генноінженерних досліджень на тваринних об'єктах В основному це дослиди по трансформації клітин, що вирощуються в культурі, з допомогою чужорідної ДНК Для тваринних клітин у ролі векторів використовують деякі віруси, а також транспозибельні елементи (ТЕ) Так, рекомбінантні молекули, сконструйовані на основі онкогенного вірусу мавп SV40, здатні утворювати в тваринній клітині численні копії (до 100 тис.), що призводить до накопичення великої кількості продуктів транскрипції і трансляції вбудованих у вірусний геном сторонніх генів

Р Дженкінсу в 1978 р вдалося з допомогою вірусу SV40 передати в клітині мавпи бактеріальний ген супресорної tРНК, який повністю транскрибувався

Створено також системи векторів на основі інших вірусів тварин — вірусу поліоми, висповакцини, герпесу, адено- і ретровірусів Зручними селективними маркерами для добору клітин, які містять чужорідну генетичну інформацію, слугують домінантні гени, вбудовані у вектор До них відноситься, наприклад, ген тимидинкінази у складі вірусу герпесу Цей ген можна використати як маркер за трансформації рекомбінантними ДНК спеціальних мутантних ліній тваринних клітин, дефектних по зазначеному ферменту

Д Меріл, а також Ю Хорет повідомили про вдалий перенос генів у фібробласти людини з допомогою фага λ Культуру фібробластів із зниженим рівнем β -галактозидази, отриману від хворого галактозидозом, інфікували фагом лямбда або виділеною із нього векторною ДНК, в якій знаходився ген галактозидази *E coli* (ген Z) З'ясувалося, що в значній частині інфікованих клітин активність ферменту значно збільшувалась і індукована β -галактозидаза

за своїми фізико-хімічними властивостями нічим не відрізнялась від нормального ферменту кишкової палички

Прикладів генетичної трансформації тваринних клітин *in vitro* існує чимало. Набагато складнішою є трансформація на рівні тваринного організму, що мало б велике значення для лікування спадкових хвороб (генотерапії) та поліпшення продуктивності і адаптивності організмів тварин.

Генетична трансформація на рівні організму вперше була здійснена на дрозофілі Г. М. Рубіним і А. Ц. Спредлінгом у 1982 р. Був сконструйований *rosy*-транспозон (*ry^l*) шляхом вбудовування хромосомного гена *rosy* дикого типу (*ry⁺*) в транспозибельний елемент P, який складає частину системи гібридного дизгенезу (розділ 11.6.3). Цю рекомбінантну ДНК ін'єкували в гоніальні клітини мух, мутантних по гену *rosy*, який відповідає за синтез ксантин-дегідрогенази. Дефектні по цьому гену мухи (*ry⁻*) мають коричневі очі, але із трансформованих мутантних клітин розвивались мухи дикого типу (*ry⁺*).

На сьогодні принципово вирішена проблема трансформації тварин з використанням клонованих генів. Здійснюється внутрішньо-видовий і міжвидовий перенос генів, які кодують білки-гормони, ферменти та ін. Отримано, наприклад, мишей, трансформованих векторами, що містили гени гормону росту щура та людини. Маса таких мишей набагато більша, ніж їх нетрансформованих сибсів.

В останній час появились повідомлення про народження дітей із штучно модифікованими генами, що свідчить про істотні успіхи генотерапії.

16.12.2 Методи генетики та селекції соматичних клітин

Значні можливості у створенні вихідного матеріалу для селекції та в інтенсифікації цього процесу відкривають сучасні технології, що ґрунтуються на методах культивування клітин *in vitro*. Використання цих технологій дає можливість вирішувати шлий ряд важливих проблем, а саме:

- 1 Швидко розмножувати (клонувати) цінні генотипи сільськогосподарських рослин та тварин, обминаючи процес запліднення,
- 2 Отримувати безвірусний посадковий матеріал,
- 3 Здійснювати селекцію на клітинному рівні, використовуючи явище соматичної мінливості та штучного мутагенезу,
- 4 Створювати нові генотипи шляхом соматичної (парасексуальної) гібридизації клітин та протопластів,

5 Отримувати зручні модельні об'єкти для з'ясування теоретичних проблем генетики та селекції (механізмів взаємодії генів тощо)

Клонування високо розвинутих організмів базується на тотипотентності ядер деяких соматичних клітин. Яскравими прикладами клонування тварин шляхом пересадки ядер соматичних клітин в енукейовані яйцеклітини стали дослідні на *Xenopus laevis*, а в останні роки — на ссавцях різних видів (розділ 14.3). Досить поширеним є клонування високопродуктивних сільськогосподарських тварин методом отримання однояйцевих близнюків після поділу раних клітинних ембріонів. Вперше таке клонування було здійснене в Англії ще у 1979 р., а сьогодні цей метод став традиційним у зооветеринарній практиці.

Ефективним, а тому досить розповсюдженим є клонування рослинних об'єктів. Розмноження рослин через культуру тканин і клітин називають **мікроклональним розмноженням**. Розроблено методи оптимізації умов для всіх етапів такого розмноження: ізоляції шматочка тканини (**експланта**) рослини, отримання з калюсу пагонів, їх укорінення та висадки рослин-регенерантів у ґрунт.

Мікроклональне розмноження рослин використовують для створення колекцій генотипів, необхідних для подальшої роботи у генетиці та селекції. Ці колекції у вигляді культури клітин можна підтримувати в умовах лабораторії у стані розмноження, крім того, їх можна досить довгий час зберігати за низьких та наднизьких (-196°) температур.

Культуру тканин та клітин використовують для прискореного розмноження тих рослин, які погано або дуже повільно розмножуються у природі. Сьогодні метод мікроклонального розмноження успішно застосовується для більш ніж 450 видів рослин із 82 родин.

Дуже важливим є використання культури тканин та клітин для отримання оздоровленого посадкового матеріалу. У цих випадках за експлант використовують апікальну меристему, яка, як правило, не встигає інфікуватися із-за швидкого поділу клітин у точці росту пагона. Отримані з таких експлантів рослини-регенеранти не інфіковані або майже не інфіковані вірусом, що значно збільшує їх продуктивність. Ця технологія успішно застосовується в насінництві картоплі та в оздоровленні посадкового матеріалу плодоягідних і декоративних рослин (садової суниці, малини тощо).

Широко розповсюджуються способи розмноження клітинних мас вищих рослин з метою отримання цінних речовин, наприклад алкалоїдів женьшеню і раувольфі. В зв'язку з цим великого значення набуває селекція на клітинному рівні з метою отримання найбільш продуктивних клонів клітин.

Як уже зазначалося (розділ 11.9), клітинам рослин в умовах *in vitro* притаманна висока генотипова мінливість, яку називають **сомаклональною**. Вона призводить до появи клонів клітин з відмінними цитогенетичними параметрами і до спонтанного домінування окремих сомаклонів (**автоселекція**). За допомогою автоселекції можна отримати поліплоїдні та інші генетично змінені клони клітин.

Використання штучного мутагенезу та селекції на клітинному рівні значно прискорює процес створення модифікованих генотипів з високою продуктивністю і стійкістю до несприятливих умов. Існуючі методи культивування клітин і протопластів у суспензії дозволяють застосовувати у роботі з ними принципи роботи з мікроорганізмами. Один із таких принципів — можливість **селекції на клітинному рівні**; при цьому популяція соматичних клітин чи протопластів рослин розглядається як суспензія одноклітинних організмів, здатних за певних умов розвиватись у багатоклітинні рослини-регенеранти. Щоб вести спрямовану селекцію на рівні культури клітин, тобто отримувати клони із заданими властивостями, залежно від мети використовують ті чи інші селективні середовища (з доданням високих концентрацій солей, певних субстратів, антибіотиків, пестицидів, збудників хвороб тощо).

Ще один напрям у селекції рослин на клітинному рівні запропонували Б. Ефрусі і Г. Барскі. Це так звана **парасексуальна гібридизація** шляхом злиття окремих соматичних клітин або (що ефективніше) їх протопластів. Популярність цього методу значно зросла після того, як було встановлено, що інактивованій вірус парогрипу типу Сендай значно збільшує частоту злиття клітин різного походження.

Протопласти отримують, руйнуючи клітинну стінку з допомогою ферментів (целюлази, геміцелюлази, пектинази) та інших процедур.

Зливаючи клітини та протопласти різного походження, можна отримати:

- 1) **гібридні клітини** з об'єднаними генотипами вихідних клітин;
- 2) так звані **асиметричні гібриди** з нерівнозначним вмістом генетичної інформації попередників;
- 3) **цибриди** — гібридні клітини, що містять ядро однієї батьківської клітини, а цитоплазму іншої.

Злиття протопластів *in vitro* може відбуватися спонтанно, але більш успішно воно здійснюється за певних умов (вплив поліетиленгліколю, електрошоку і т. ін.).

В окремих випадках із протопластів та отриманих гібридних клітин вдається отримати вегетативні форми рослин (Ю. Ю. Глеба, Р. Г. Бутенко та ін.). Відновлення ізольованими протопластами клі-

тинної стінки і наступну регенерацію вдалося отримати приблизно у 50 видів рослин (картоплі, тютюну, репсу, петунії тощо).

Селективні середовища для відбору мутантів і парасексуальних гібридів використовують у дослідженнях із клітинами не тільки рослин, але й тварин (розділ 17.5.1). В. Шибальські одним із перших використав селективне середовище ГАТ (містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин) для добору гібридів між мутантними клітинами ссавців, одні з яких втратили активність гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази, а інші — тимідинкінази. Злиття таких клітин призводило до відновлення активностей зазначених ферментів, що забезпечувало ріст гібридних клітин на середовищі ГАТ. Зазначений підхід до добору клітинних гібридів сприяв створенню й інших селективних середовищ, які надають можливість працювати з мутантними клітинами рослин і тварин.

Слід зазначити, що метод парасексуальної гібридизації дає можливість об'єднувати генотипи філогенетично віддалених видів, які у природі не схрещуються. Саме тому ця клітинна технологія у поєднанні з методами генної інженерії відкриває нові перспективи у розвитку генетики і селекції.

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

Генетика людини (**антропогенетика**) є наукою і фундаментальною, і прикладною. Як фундаментальна наука — це галузь генетики, яка вивчає спадковість і мінливість у найскладніших представників живого світу — людських істот. Результати дослідження в цій галузі важливі не тільки в теоретичному плані, але й мають практичне значення, в першу чергу, — для медицини, для вирішення соціологічних, юридичних та інших проблем. Вивчення і розробка методів запобігання наслідків генетичних дефектів людини складає предмет **медичної генетики**.

Людина є складовою частиною біосфери і продуктом її еволюції, тому закономірності біологічних процесів, які мають універсальне значення, в повній мірі стосуються і людини. Отже, закономірності спадковості і мінливості, з'ясовані загальною генетикою на численних більш простих об'єктах, можна повністю перенести на людину та її популяції.

Разом з тим слід враховувати деякі особливості людини як об'єкту дослідження, що змушує шукати нетрадиційні шляхи та методи наукових досліджень. Ці особливості, що значно ускладнюють генетичний аналіз, відносяться не тільки до сфери біології, але й до біосоціальної сутності самої людини.

Перш за все слід відзначити, що головний фактор еволюції — природний добір — сьогодні не має такої важливої ролі в людському суспільстві, як у популяціях більш простих організмів. Дія інших факторів динаміки популяцій, таких як мутаційний процес, міграції, вибірковість батьківських пар, зберігає своє значення і для людини. При цьому вплив одних факторів (наприклад, міграцій) у випадку людських популяцій значно збільшується, а інших (ізоляція) — зменшується.

З другого боку, слід враховувати, що еволюція людини перейшла значним чином у соціальну сферу, найважливішою складовою частиною якої є культура. Чимало дослідників, крім генетичної спадковості, розрізняють ще сигнальну спадковість (М. Ю. Лоба-

шов) або спадкоємність (С. М. Дивиденков), за яких здійснюється передача досвіду від покоління до покоління.

Сигнальна спадковість — це властивість батьків передавати навички адаптивної поведінки нащадкам. Ця передача може здійснюватися також між будь-якими особинами одного покоління і навіть від нащадків батькам. Прикладом сигнальної спадковості у тварин є явище **імпринтингу** (зберігання в пам'яті) реакції поведінки, що формуються на ранніх стадіях постнатального розвитку хребетних, наприклад у птахів. Сигнальна спадковість добре розвинена у приматів, але найвищого рівня досягла у людини. Мова в цих випадках йде про успадковування здібностей до певних сигнальних ознак, надбаних в онтогенезі, а не про спадкове утворення в генотипі нової інформації.

Слід, однак, відзначити, що соціальна еволюція людини, яка склалася на фундаменті біологічної еволюції, впливає на прояв біологічних, в тому числі генетичних, закономірностей у людському суспільстві.

Із біологічних особливостей людини, які створюють певні труднощі для генетиків, в першу чергу слід враховувати такі:

- 1) неможливість спрямованих схрещувань з метою досліду;
- 2) пізні статеве дозрівання людей;
- 3) малу чисельність дітей у сім'ях;
- 4) відсутність гомозиготних ліній;
- 5) неможливість застосування штучного мутагенезу;
- 6) неможливість створення однакових умов для розвитку дітей у різних сім'ях;
- 7) недосконалість реєстрації спадкових ознак у родовах і малочисельність останніх;
- 8) досить велику кількість ($2n = 46$) хромосом, які погано розрізняються за звичайних цитологічних досліджень.

Впровадження нових сучасних методів дослідження дає можливість певною мірою усувати названі труднощі і відкриває оптимістичні перспективи перед генетикою людини.

17.1. Історія генетики людини: виникнення двох концепцій

Революцією в біології було створення теорії еволюції, згідно з якою люди походять від інших, більш примітивних приматів і є складовою частиною тваринного світу. Завдяки цьому закони

Г Менделя зразу ж після їх перевідкриття були використані для пояснення успадковування окремих ознак у людини — головним чином деяких вад розвитку і хвороб. Ще на початку ХХ сторіччя А Геррод з'ясував закономірності успадковування однієї із спадкових хвороб — алкаптонурії — і чітко встановив основний принцип дії гена: генетичні фактори детермінують біохімічні реакції. На жаль, науковий світ погодився з цим лише через 30 років, і це значно затримало впровадження принципів менделізму в генетику людини.

З'ясування закономірностей успадковування ознак у людей розпочалося не з менделізму, а з іншого підходу, який був сформульований Ф Гальтоном у 1865 р в роботі «Успадковування таланту і характеру», а також в інших його роботах. Вивчаючи успадковування певних властивостей особистості, таких як висока працездатність, інтелект і зовнішні дані, автор як можна точніше оцінював ці властивості кількісно, а потім обробляв результати, що були отримані для людей різного ступеня спорідненості (наприклад, для батьків і дітей, сибсів або близнюків). Хоч за такого підходу неможливо з'ясувати механізми успадковування, він виявився набагато інформативнішим, ніж метод Г Менделя, за вивчення людських характерів, інтелекту, а також багатьох захворювань і розумової відсталості, які є сумарним виявом дії багатьох генів і умов навколишнього середовища («уроджене і придбане», за Гальтоном). Названі властивості людини є надзвичайно складними. Їх дуже важко розкласти на елементарні ознаки, що майже повністю виключає можливість менделівського аналізу принаймні на ранніх етапах розвитку генетики.

Починаючи з 1900 р і до цих пір названі дві концепції — менделівське уявлення про ген і біометричний підхід Ф Гальтона — розвивалися паралельно. Слід зазначити, що ці два підходи і сьогодні не виключають один одного. Більш того, у ряді випадків статистичні дані про кореляцію ознак у людей, пов'язаних родинними відношеннями, знайшли своє логічне пояснення з позицій врахування механізмів активності генів.

Першою важливою перемогою менделівської генетики стало визнання триалельного успадковування груп крові АВО, запропонованого Ф Бернштейном у 20-х роках. Сильний вплив на розвиток антропогенетики виявило виникнення нової науки — **молекулярної біології**. Основною подією стало з'ясування Л Полінгом у 1949 р причини серповидноклітинної анемії. Не менш важливий вклад внесли дослідження хромосом людини за допомогою нових цитологічних і молекулярногенетичних методів.

Сьогодні більшість праць, що публікуються з антропогенетики, виконується з позицій генетичної теорії. Виявилось, що люди-

на, яка вважалася раніше об'єктом, непридатним для генетичних досліджень, має навіть деякі переваги в цьому відношенні: високу чисельність доступних для вивчення популяцій, значну кількість відомих генних мутацій і хромосомних перебудов, достатню з'ясованість біохімічних і фізіологічних процесів тощо. Однак, в деяких галузях науки, таких як вивчення генетики поведінки, інтелекту, ряду захворювань (психози, епілепсія, діабет, алергія та ін.) застосування законів Г. Менделя все ще натикається на значні труднощі, і біометричні методи не втратили свого значення.

17.2. Основні напрямки наукових досліджень

Антропогенетика — це різнобічна наука з непевними межами, що використовує сучасні методи різних наук. Це призвело до появи великої кількості окремих спеціальних розділів цієї науки, які в значній мірі перекриваються.

Біохімічна генетика людини включає дослідження біохімії нуклеїнових кислот, білків і ферментів у здорових і хворих людей. Тут застосовують методи біохімії і молекулярної біології (хроматографію, електрофорез, рестрикційний аналіз і т. ін.).

Цитогенетика людини вивчає хромосоми в нормі і патології.

Імуногенетика людини — це в значній мірі генетика груп крові, імуноглобулінів і тканинних антигенів, наприклад типу HLA.

Формальна генетика вивчає успадковування менделівських ознак і більш складні типи успадковування у людини з допомогою математичних методів.

Клінічна генетика вирішує завдання діагностики, прогнозування і, в певних межах, лікування різних спадкових хвороб. Перший істотний успіх у цьому відношенні прийшов на початку 50-х років, коли з'ясування біохімічної природи дефектів за фенілкетонурії і галактоземії призвело до розробки спеціальних дієт, що запобігають розвиткові цих захворювань. Важливою складовою клінічної генетики є **генетична консультація**.

Популяційна генетика людини з'ясовує поведінку генів у великих популяціях і, крім того, вивчає дію в людських популяціях таких факторів, як дрейф, міграції, мутації та ін. Дослідження структури генетичного фонду людських спільнот провадиться на основі визначення частоти в популяціях маркерних генів і відповідних їм генотипів.

Генетика поведінки або **психогенетика** — наука про спадкові фактори, що визначають поведінку здорових і хворих людей. Фахівці з генетики поведінки ведуть пошук генів, від яких залежить індивідуальність людини і її пізнавальні здатності. Вивчаються також генетичні основи пам'яті, розумових відхилень і психічних захворювань. Новий напрямок науки — **соціальна біологія** — використовує ці дані для пояснення поведінки людини в суспільстві.

Генетика соматичних клітин — це розділ антропогенетики, метою якого є картування генів людини і дослідження переносу генів на клітинному рівні. Одним із важливих методів, що при цьому використовується, є гібридизація клітин різних видів.

Генетика розвитку відносно мало розвинена у відношенні безпосередньо людини і в значній мірі базується на експериментах, які провадять на нижчих ссавцях (миша та інші тварини).

Генетика розмноження — розділ генетики, що з'ясовує особливості утворення гамет і ранніх стадій розвитку ембріона за допомогою генетичних методів. Цей розділ має пряме відношення до генетики розвитку і зараз інтенсивно розвивається.

Фармакогенетика займається генетичними факторами, що обумовлюють розподіл і метаболізм лікарських препаратів в організмі людини. Особливий інтерес фахівців у цій галузі викликають парадоксальні реакції організму на дію ксенобіотиків і природних речовин.

Своїм бурхливим розвитком сучасна клінічна генетика зобов'язана розширенню мережі генетичних консультацій і центрів пренатальної і внутрішньоматочної діагностики та скринінгу з метою вияву генетичних хвороб. Серйозним стимулом для розвитку досліджень у галузі формальної і популяційної генетики людини стала загальна комп'ютеризація наукових і клінічних установ.

Незважаючи на загальновизнані успіхи, генетика людини ще не досягла бажаного рівня розвитку. Багато досягнень молекулярної генетики ще не використовуються по відношенню до людини, а психологія і інші соціальні науки отримали хоч і істотну, але ще недостатню генетичну основу.

Разом з тим успіхи науки свідчать про фантастичні можливості антропогенетики у найближчому майбутньому. Успішне завершення у 2000—2001 рр. досліджень по з'ясуванню нуклеотидної послідовності всіх молекул ДНК хромосом людини показало, що цей геном утримує біля 30 тис. структурних генів, тобто значно менше, ніж вважалося раніше. Знання структури цих генів дає можливість отримувати відповідні мічені зонди, з допомогою яких можна отримувати препарати будь-яких специфічних послідовностей ДНК з метою їх детального вивчення та практичного використання.

17.3. Методи генетики людини. Типи успадковування

Сьогодні антропогенетика вдало поєднує як традиційні методи, що склалися за часів Ф. Гальтона і розвитку менделізму, так і сучасні методи цитогенетики, молекулярної біології, біохімії та інших наук.

Найбільш поширеними є такі методи:

- 1) генеалогічний або метод аналізу родоводів;
- 2) метод сибсів, включаючи близнюковий метод;
- 3) цитогенетичний;
- 4) біохімічний;
- 5) молекулярногенетичний;
- 6) онтогенетичний;
- 7) популяційний;
- 8) інші методи.

Кожен з цих методів, окремо взятий, має свої переваги і свої недоліки; максимально інформативним є поєднання цих методів і порівняльна оцінка отриманих результатів. Спільними зусиллями фахівців різних галузей генетики вже детально досліджено більше 1000 генів людини, більшість з яких локалізована в конкретних районах певних хромосом; для багатьох генів з'ясовані механізми їх участі в розвитку тих чи інших особливостей фенотипу (рис. 17.1). З'ясувалося, що в повній відповідності з постулатами менделізму серед цих генів є домінантні, кодомінантні та рецесивні. Деякі з них виявляють неповне домінування (проміжне успадковування), комплементарність та інші типи взаємодії, відомі для алельних і неалельних генів.

Мутаційний процес у людини, як і у інших організмів, веде до виникнення алелів, що негативно впливають на здоров'я. Спадкові хвороби можуть бути наслідком генних, хромосомних і геномних аномалій. Сьогодні відомо значно більше двох тисяч спадкових хвороб людини. Зустрічаються мутантні гени, експресія яких мало залежить від зовнішнього середовища (наприклад, гени фенілкетонурії чи гемофілії). Так само поводять себе хромосомні перебудови. Інша група спадкових хвороб, наприклад подагра, зумовлена генами, експресія яких певною мірою залежить від несприятливих умов середовища.

Сьогодні спадкові хвороби поділяють на **моногенні** та **полігенні**, **монофакторіальні** та **поліфакторіальні**. Мультифакторіальну природу мають гіпертонічна хвороба, виразкова хвороба шлунку і дванадцятипалої кишки, чимало форм злоякісних пухлин та інших хвороб, які визначаються не тільки генетичними, але й екологічними

ми чинниками. В більшості випадків це полігенні хвороби з так званою спадковою схильністю. До спадкових хвороб відносять також хромосомні хвороби, зумовлені зміною кількості хромосом, хоч більшість із них не передається наступному поколінню.



Рис. 17.1. Спадкові хвороби, причинами яких є блокування ферментативних реакцій перетворення фенілаланіну

Аномалії фенотипів, що виникають з причини мутацій, слугують маркерними ознаками за дослідження спадковості та мінливості у людини. Особливо придатними для цієї мети є моногенні спадкові хвороби, для визначення яких вирішальне значення має клініко-генеалогічний аналіз. На основі вивчення родоводів з'ясовують сегрегацію генів та вияви спадкових хвороб у поколіннях згідно із законами Г. Менделя.

Генеалогічний аналіз дає можливість обійти труднощі, що виникають у зв'язку з неможливістю схрещувань і малою чисельністю дітей у сім'ях. За наявності родоводів можна, використовуючи дані декількох сімей, визначити тип успадкування, а також його

моногенність чи полігенність. Як правило, генеалогічний аналіз є відправною точкою медико-генетичного консультування і використовується не тільки для діагностики, але й з прогнозувальною метою.

Для реалізації генеалогічного методу необхідно перш за все скласти родовід; для цього існують стандартні методики, загальноприйнята термінологія і позначення (рис. 17.2). Так, індивід, з якого розпочинається дослідження, називається **пробандом**, рідні брати і сестри — **сібсами**. Кожен член родоводу має свій шифр, який складається з римської цифри (номер покоління) і арабської (номер індивіда).

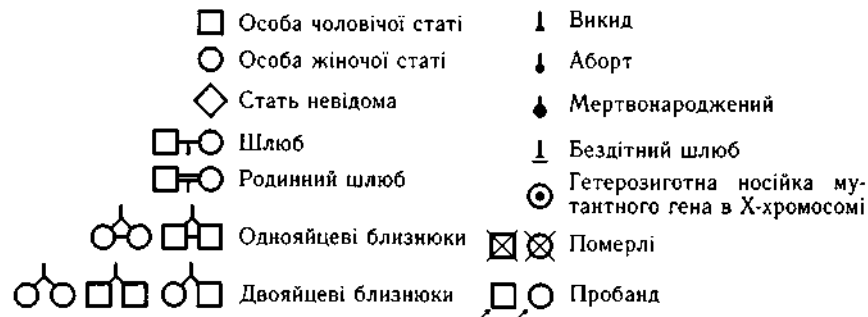


Рис. 17.2. Стандартні позначення за складання родоводів

Після отримання родоводу, до якого слід віднести дуже критично (нерідко він складається з урахуванням деяких переказів та згадок), починається власне генеалогічний аналіз. Його мета — дати заключення про генетичну обумовленість ознаки (хвороби) і визначити тип її успадкування.

Залежно від локалізації мутантних генів (в аутосомі чи в статевій хромосомі) та особливостей генних взаємодій (домінантність, рецесивність та ін.), розрізняють такі найважливіші типи успадкування моногенних ознак (в тому числі і спадкових хвороб) у людини:

- 1) **аутосомно-домінантний** (якщо ген локалізується в аутосомі і є домінантним);
- 2) **аутосомно-рецесивний** (якщо ген належить аутосомі і є рецесивним);
- 3) **аутосомно-кодомінантний** (якщо алельні гени кодомінантні і знаходяться в гомологічних аутосомах);
- 4) **X-зчеплений домінантний** (якщо домінантний ген локалізується в X-хромосомі);
- 5) **X-зчеплений рецесивний**;

- 6) **У-зчеплений тип** (якщо гени кодують голандричні ознаки),
 7) **цитоплазматичний тип** успадковування (ознаки визначають
 ся генами цитоплазми)

Слід зазначити, що час від часу публікуються дані про родо-
 води, які важко погодити з будь-яким із наведених типів успадко-
 вування. Аномальна сегрегація (вищеплення хворих нащадків) у
 цих випадках не відповідає жодній з теоретично можливих схем.
 Це свідчить про недосконалість сучасних знань щодо успадкову-
 вання і взаємодії генів, а також експресивності і пенетрантності
 окремих ознак у людини.

Аналіз родоводів слід провадити з урахуванням можливості ви-
 никнення у людей фенокопій мутацій під впливом екзогенних чин-
 ників. Вірогідність висновків залежить також від розміру вибірки,
 на основі якої складено родовід.

Наведемо лише один приклад кількісної оцінки даних родоводів
 за умов повної реєстрації, тобто коли родовід охоплює всі сім'ї з
 дітьми носіями даної ознаки. В цьому випадку використовують про-
 стий метод сибсів (метод Вайнберга), в основі якого лежить ви-
 значення співвідношення кількості сибсів пробанда — носія озна-
 ки — до всіх дітей у сім'ї:

$$P = \frac{\sum V(V-1)}{\sum V(S-1)}$$

де V — кількість носіїв даної ознаки (або хвороби) в кожній сім'ї,
 S — кількість усіх дітей в даній сім'ї, а Σ — знак суми результатів,
 отриманих по окремих сім'ях.

Якщо порівняти отриману величину з тією, яка теоретично очі-
 кується за того чи іншого типу успадковування, то можна визна-
 чити, який саме (домінантний чи рецесивний) ген досліджується.

За аналізу родоводів з неповною реєстрацією сімей використо-
 вуються інші методи кількісної оцінки.

Близнюковий метод засновником якого вважають Ф. Гальтона,
 використовується для з'ясування спадкової обумовленості дослід-
 жуваних ознак. В основі методу лежить той факт, що монозиготні
 (МЗ) близнюки розвиваються із однієї зиготи. Отже, генетично
 вони ідентичні, а їх фенотипові відмінності пояснюються впливом
 чинників середовища. Поява МЗ близнюків — досить рідке яви-
 ще серед людських популяцій, особливо якщо близнюків більше
 двох. Однак, поодинокі випадки багатоплідності у людей відомі.
 В 1996 році в США у однієї жінки водночас народилося п'ятеро
 дітей однієї статі, що свідчить про монозиготність сибсів.

Щоб з'ясувати факт генетичної детермінації ознаки, а також
 ступінь її мінливості залежно від середовища, необхідно визначити

міру подібності (**конкордантності**) і ступінь відмінності (**дискордантності**) МЗ близнюків. Оскільки дизиготні (ДЗ) близнюки, як і монозиготні, розвиваються приблизно в однакових умовах, але мають лише половину спільних за походженням генів, їх використовують як контроль.

Цілком зрозуміло, що у МЗ близнюків конкордантність значно вища, ніж у ДЗ близнюків, однак ступінь подібності для різних ознак неоднакова. Це дає можливість з'ясувати роль генотипу і середовища у їх вияві.

Для об'єктивної оцінки ролі спадковості в розвитку ознаки запропоновано декілька кількісних методів. Один із них — проведення розрахунків за формулою

$$\frac{H}{C} = \frac{(100 - b) - (100 - a)}{100 - a},$$

де H/C — відношення значення впливу спадковості до значення впливу середовища; a — процент конкордантності у МЗ близнюків; b — процент конкордантності у різнояйцевих (ДЗ) близнюків однієї статі.

В табл. 17.1 наведено існуючі в літературі показники конкордантності у МЗ і ДЗ близнюків щодо різних спадкових і неспадкових хвороб.

Таблиця 17.1

Конкордантність монозиготних (МЗ) та дизиготних (ДЗ) близнюків за деяких захворювань (по О. Фершцери та Г. Йоргенсену)

Патологія	Конкордантність у близнюків, %		Відношення конкордантностей
	МЗ	ДЗ	МЗ/ДЗ
Клишоногість	22,9	2,3	10,0
Уроджений вивих стегна	41,4	2,8	14,8
Синдром Дауна	89,0	7,0	12,6
Епілепсія	67,0	3,0	22,3
Шизофренія	80,0	13,0	6,7
Діабет	55,8	11,4	4,9
Гіперфункція щитовидної залози	47,0	3,1	15,1
Рак	17,4	10,8	1,6
Псоріаз	61,0	13,0	4,7
Туберкульоз	51,6	22,2	2,3
Саркоїдоз	50,0	8,5	5,9
Кір	97,4	94,3	1,0
Скарлатина	54,6	47,1	1,2
Пневмонія	32,2	18,2	1,8

Як видно із таблиці, висока конкордантність сама по собі ще не свідчить про значну участь генетичних факторів у вияві хвороби чи у формуванні схильності до певних хвороб; для такого висновку необхідна значна різниця між показниками конкордантності МЗ і ДЗ близнюків. Так, наприклад, майже кожна дитина може перехворіти на кір, отже показники конкордантності у МЗ і ДЗ близнюків дуже високі. Більш інформативним є співвідношення конкордантності МЗ і ДЗ близнюків: чим істотніше це співвідношення, тим більший внесок генетичного фактора в розвиток досліджуваної ознаки.

Близнюковий метод дає дуже цінну інформацію при дослідженні морфологічних, фізіологічних і біохімічних ознак. Однак його можливості не варто переоцінювати, особливо щодо дослідження соціальної поведінки людини, яка визначається не тільки генетичними задатками, але й умовами виховання. Оскільки близнюки виховуються приблизно в однакових умовах, спільні риси в їх поведінці, включаючи й асоціальні вияви, можуть бути наслідком дуже подібного оточення в дитинстві. Тому дуже цікавим є порівняння поведінки МЗ близнюків, що були розлучені в ранньому віці і виховувались за різних умов. Ці дані показують, що реакції поведінки безперечно залежать від генотипу, проте ця залежність не є фатальною.

Обмеження близнюкового методу полягають і в тому, що близнюки і однонароджені мають свої особливості і складають самостійні соціальні групи. Деякі фізіологічні розбіжності виявляються між близнюками і неблизнюками ще в період ембріонального розвитку. Близнюкам властиві більш часті аномалії розвитку, мертвородження і смертність у ранньому віці, менша маса за народження і часто більш низький коефіцієнт інтелектуальності (IQ) за рахунок ускладнень у період вагітності і під час пологів.

Монохоріонні партнери (завжди монозиготні) виявляють при народженні розбіжності в масі, які іноді складають більше 1000 грамів. Такі відмінності можуть бути наслідком артеріовенозних анастомозів, які призводять до «синдрому переливання». Суть останнього — в неправильному живленні і недостатньому забезпеченні компонентами крові і киснем близнюка-донора.

Щодо ДЗ близнюків, то іноді їх генетична структура може мати набагато більше відмінностей, ніж звичайно. Справа в тому, що ДЗ близнюки іноді мають різних батьків. Два ооцити можуть запліднюватися сперміями різних чоловіків. Дані про близнюкові пари з двома батьками повідомлялися не раз. Вони були отримані за судових експертиз по визначенню батьківства. Відомий випадок, коли один із батьків був негром, а другий — білим.

Утворення судинних анастомозів між двома ембріонами у випадку ДЗ близнюків може призвести до взаємного обміну стовбурними

клітинами крові, оскільки на ранніх стадіях розвитку ембріони імунологічно є толерантними. Внаслідок цього народжуються близнюки, які виявляються химерами (соматичними гібридами) з двома популяціями генетично різних клітин крові.

Враховуючи ці факти, слід зазначити, що використання близнюкового методу слід поєднувати з ретельним обстеженням близнюків цитогенетичними, біохімічними та іншими методами.

Цитогенетичний метод використовують для діагностики численних спадкових хвороб, які пояснюються анеуплоїдією та іншими хромосомними аберациями. Завдяки розробці методів культивування клітин людини *in vitro* і диференційному забарвленню хромосом, можна отримати цінну інформацію як у період мітозу, так і за дослідження інтерфазних клітин.

У судовій медицині, а іноді з метою пренатальної діагностики визначають наявність у клітинах тілець Барра або статевого хроматину, про який вже йшлося (розділ 9.1.5). Ідентифікація тілець Барра в клітинах зіскобу слизової оболонки ротової порожнини використовується для визначення генетичної статі деяких пацієнтів за генетичних консультацій, а також у спортивній медицині. Як відомо, кількість тілець статевого хроматину в клітині відповідає

$$B = X - \frac{P}{2},$$

де B — число тілець Барра, X — число X-хромосом, P — плідність.

Цитологічний метод отримав нові можливості в поєднанні з методами гібридизації соматичних клітин, біохімічними методами визначення ферментів, рестрикційним аналізом ДНК хромосом, використанням радіоактивних ДНК-зондів та ін. Таке поєднання методів цитогенетики, біохімії і молекулярної біології призвело до виникнення нового наукового напрямку — **молекулярної цитогенетики**. Саме з цим науковим напрямком пов'язані основні успіхи антропогенетики в наші дні.

Популяційний метод дає інформацію про ступінь гетерозиготності і поліморфізму людських популяцій, виявляє відмінності частот окремих алельних генів між різними популяціями людей.

В популяціях людини, як і в популяціях інших організмів, у гетерозиготному стані утримується багато мутантних рецесивних алелів, що обумовлюють різні спадкові хвороби. Разом з іншими генетичними змінами, які зменшують загальний рівень життєздатності особин, ці мутації складають **генетичний тягар** популяцій, який необхідно враховувати за вирішення різних соціальних проблем. Частота переходу рецесивних алелів у гомозиготний стан значно зростає із збільшенням ступеня інбридингу; саме тому народжу-

ваність дітей із спадковими аномаліями дуже зростає за близько-родинних шлюбів.

Джерелом генетичного тягаря популяцій людини є спонтанні мутації, а також мутації, індуковані чинниками зовнішнього середовища, серед яких все більшої ваги набувають антропогенні фактори. З'ясування частоти мутацій у людини має велике значення для прогнозування кількості осіб, уражених спадковими хворобами, і особливо для оцінки шкідливої дії на генотип людини тих чи інших чинників зовнішнього середовища. Зрозуміло, що можливу генетичну шкоду фізичних, хімічних чи біологічних мутагенів неможливо з'ясувати, не знаючи частоти спонтанних мутацій.

Частоту виникнення генних мутацій визначають двома різними методами — прямим і посереднім (непрямим). **Прямий метод** застосовується у випадку домінантних мутацій, які в популяціях людей найчастіше виявляють неповне домінування. При цьому враховується кількість дітей з даною домінантною ознакою, які народилися у генетично здорових батьків. Метод дає правильний результат лише за певних умов, серед яких слід назвати необхідність повної пенетрантності та моногенного успадковування досліджуваної ознаки.

Суть прямого методу зводиться до визначення частоти появи у популяції ізольованих випадків мутантного фенотипу (їх називають **спорадичними випадками**). Оскільки організм має подвійний набір генів, то для розрахунку частоти мутування на один ген необхідно подвоїти загальну кількість обстежених:

$$U = \frac{M}{2N},$$

де U — частота виникнення домінантних мутацій, M — кількість мутантних фенотипів, N — кількість обстежених особин.

Визначення частоти хромосомних і геномних перебудов співпадає з прямим методом визначення домінантних мутацій, проте розрахунок ведеться на гаплоїдний набір генів:

$$U = \frac{M}{N}.$$

В більшості випадків хромосомні хвороби є наслідком виникнення нових мутацій, а не результатом успадковування їх від батьків.

Непрямий або посередній метод визначення частоти генних мутацій ґрунтується на тому, що з плином поколінь у популяції встановлюється рівновага між виникненням шкідливих алелів даного гена і вилученням їх негативним добором. Швидкість досягнення такої рівноваги залежить від частоти мутування гена і ступеня зни-

ження репродуктивної здатності мутантів. Це дає змогу визначити частоту виникнення досліджуваної мутації, виходячи з даних про долю частки її носіїв у популяції. При цьому частота різних типів мутацій розраховується за формулами:

для домінантних мутацій	$U = \frac{1}{2}(1-f)x$
для рецесивних аутосомних	$U = (1-f)x$
для рецесивних Х-хромосомних	$U = \frac{1}{3}(1-f)x$
для домінантних Х-хромосомних	$U = \frac{2}{3}(1-f)x$
для Y-хромосомних	$U = (1-f)x'$

де U — частота виникнення мутацій; f — репродуктивна здатність носіїв мутацій, віднесена до такої немутантних сибсів; x — доля носіїв мутації в популяції; x' — відношення кількості чоловіків-носіїв мутації до загальної кількості чоловіків у популяції.

Загалом частота різних мутацій у людини найчастіше коливається в межах від $1 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ на локус за покоління. Щодо частоти хромосомних аберацій і геномних змін, то вони значно перевищують частоту генних мутацій. Наприклад, нерозходження 21-ї пари хромосом, яке супроводжується виникненням синдрому Дауна, складає біля 1%. Кількість дітей з цим синдромом значно менша через високий рівень летальності зигот із подібними хромосомними аномаліями.

Підраховано, що приблизно в 7,5% всіх вагітностей спостерігається хромосомна патологія плода, яка закінчується довільним викидом на 2—6 тижні вагітності. Серед хромосомних мутацій у живонароджених переважають аномалії кількості Х-хромосом і трисомії по 21-й хромосомі. Перші з них розпізнаються по кількості тілець Барра в клітинних ядрах, а інші (хвороба Дауна) — клінічно.

Для популяцій людини загалом характерні значна гетерозиготність і високий поліморфізм. Методи популяційної генетики дають можливість кількісно визначити їх наявність щодо конкретних локусів.

Приклади таких розрахунків стосовно частот алельних генів, що визначають групи крові за системою АВО та деякі спадкові захворювання, вже наводилися (розділ 15).

Онтогенетичний метод має велике значення для вирішення проблем генетики людини у тих випадках, коли нормальні або патологічні ознаки формуються в процесі індивідуального розвитку. Деякі спадкові хвороби виявляються лише у певному віці. Прикладом може бути хорея Гентингтона, яка успадковується як аутосомна домінантна ознака. Супроводжується дегенеративними змінами нервових клітин у базальних гангліях, які призводять до мимовільних рухів, деградації особистості і поступово зростаючого недо-

() .

17.4.

in vivo.
() ,
() .

24

72

10—30

зафарблюють.
Романовського—Гімзи
ацетоорсеїном

(1971 .) з'ясувалося,

жен із них виявляє специфічність по відношенню до певних сегментів, що виявляються вздовж хромосом.

Різні типи сегментів позначають залежно від методу, за допомогою якого вони найкраще виявляються:

а) **Q-сегменти** (quinacrine, акрихін) — ділянки хромосом, що флуоресціюють після забарвлення акрихін-іпритом та подібними до них сполуками;

б) **G-сегменти** (Giemsa) виявляються за забарвлення барвником Гімзи та іншими в поєднанні з додатковими процедурами. З'ясувалося, що Q- і G-сегменти ідентичні. В більшості лабораторій використовують G-метод, бо він не вимагає використання флуоресцентного мікроскопа, однак Q-метод має ту перевагу, що дає можливість ідентифікувати Y-хромосому людини завдяки її яскравій флуоресценції;

в) **R-сегменти** (reverse, обернені) виявляються після дозованої теплової денатурації. Вони локалізуються між Q- (або G-) сегментами;

г) **C-сегменти** (constitutive heterochromatin, конститутивний гетерохроматин) обмежують прицентромерні райони в обох плечах хромосоми.

Природа хімічних відмінностей, що виявляються цими методами, остаточно ще не з'ясована. Обговорюються дві основні гіпотези: ДНК-ова і білкова. Перша виходить з того, що різні ділянки хромосом людини відрізняються кількісним вмістом А—Т і G—C пар. Вважають, що Q-сегменти відповідають ділянкам, багатим на А—Т пари, а R-сегменти багаті на G—C пари, яким властива більша стійкість щодо теплової денатурації. Друга гіпотеза полягає в тому, що оскільки молекули ДНК різних хромосом зв'язані з різними білками, можна припустити, що індивідуальний малюнок сегментації кожної хромосоми певним чином залежить від особливостей цілісного комплексу ДНК-білок.

Райони ядерцевого організатора специфічно забарвлюються сріблом, після чого вони виглядають як темні плями на жовто-коричневому тлі хромосом.

Класифікація і номенклатура рівномірно забарвлених хромосом людини розроблена на міжнародних нарадах, що відбулися в Денвері (1960), Лондоні (1963) і Чикаго (1966). Запропоновано нумерувати пари хромосом від 1 до 23 і розташовувати їх в порядку зменшення довжини і залежно від положення центромери.

На стандартно виготовлених і рівномірно забарвлених препаратах хромосом форма останніх визначається відношенням довжини короткого плеча до довжини всієї хромосоми, прийнятої за 100% (центромерний індекс).

Статеві хромосоми позначаються латинськими буквами X і Y; за каріотипування їх представляють останніми. Аутосоми розподіляють на сім груп, які відрізняються між собою довжиною і формою хромосом і позначаються буквами англійського алфавіту від А до G (рис. 17.3).

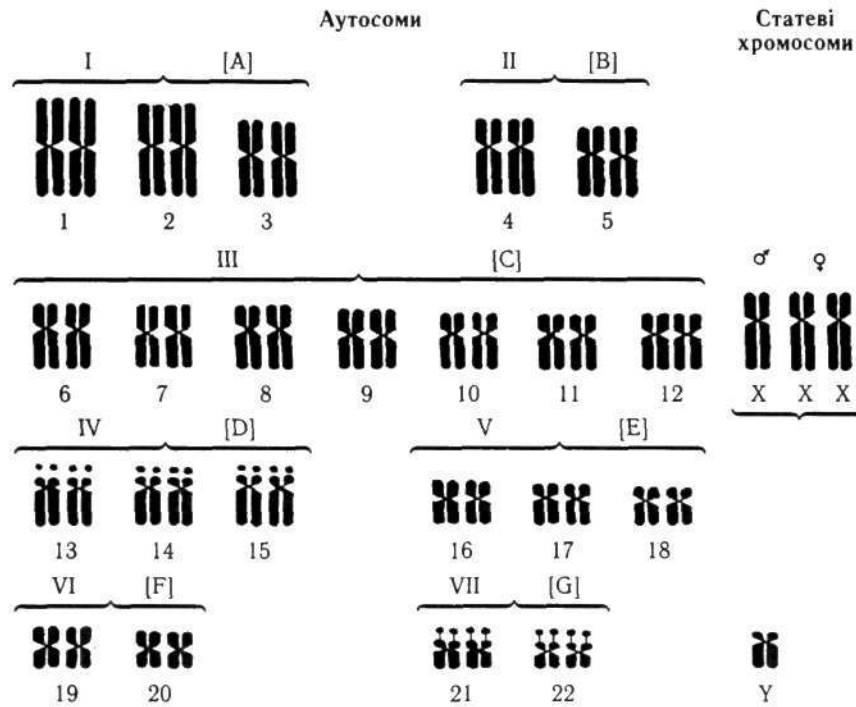


Рис. 17.3. Ідіограма хромосом людини відповідно денверській номенклатурі

Основні чотири типи диференційного забарвлення (Q, G, R і C) за необхідності доповнюють методиками вибіркової обробки хромосом, які були запропоновані згодом для вияву окремих груп зчеплення або їх сегментів.

За паризькою номенклатурою плечі хромосом позначаються латинськими буквами p (коротке плече) і q (довге плече). Плечі поділяються на **райони**, межами яких слугують постійні і чіткі морфологічні маркери, а райони містять **сегменти** — ділянки хромосом, які відрізняються від сусідніх інтенсивністю забарвлення. Райони і сегменти нумерують арабськими цифрами, від центромери до теломери, окремо для кожного плеча (рис. 17.4). Для прикладу:

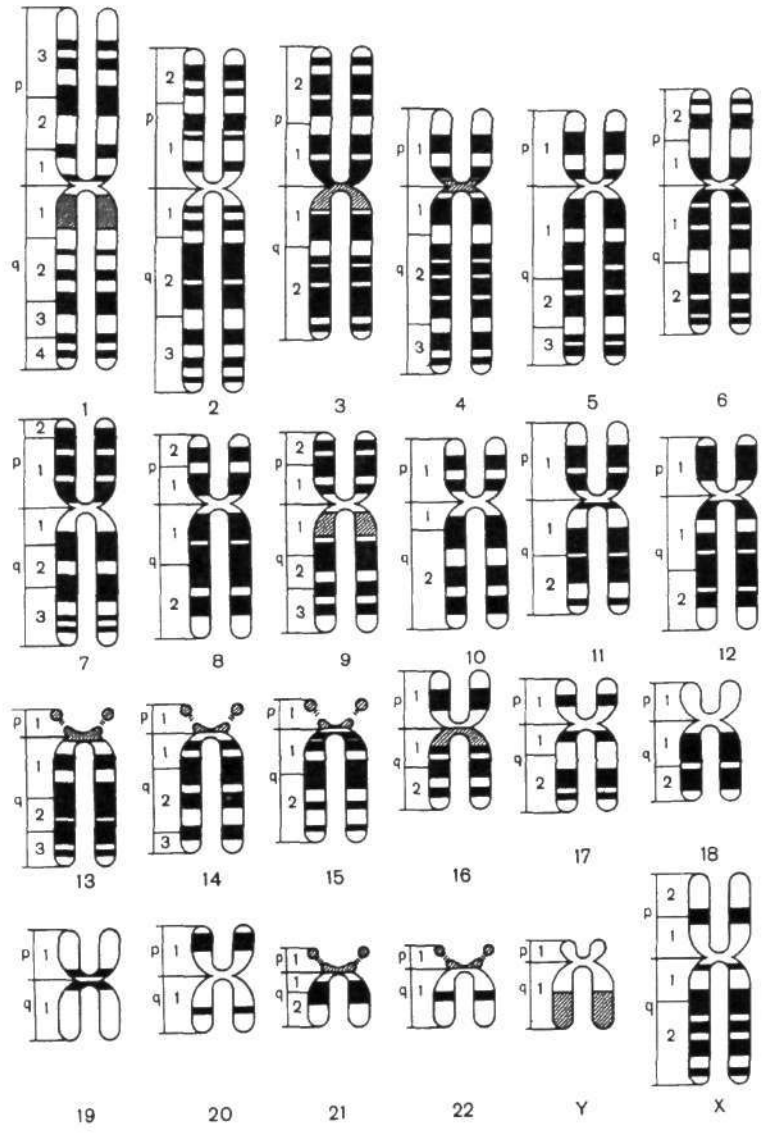


Рис. 17.4. Узагальнене схематичне зображення диференційного забарвлення хромосом G- і R-методами:

Центромерні райони позначені у відповідності з Q-зафарбленням, райони варіабельного забарвлення заштриховано

символ 1p22 означає другий сегмент в районі 2 короткого плеча аутосоми 1. Якщо виникає необхідність виділення субсегментів того чи іншого сегмента, то для їх позначення вводять наступний ряд цифр.

Слід зазначити, що хромосоми людини із різних пар морфологічно дуже подібні, і деякі з них дуже важко розрізнити. Препаративний розподіл хромосом, їх ідентифікація і кількісний аналіз зон флуоресценції значно прискорюються завдяки сучасному методу — **цитофлуориметрії**. Даний метод має дві істотні переваги: він є автоматичним, завдяки чому виключається елемент суб'єктивності, і дуже прискорює аналіз. Деякі хромосомні аберації настільки малі, що їх неможливо виявити звичайними методами, але за певних умов вони ідентифікуються за допомогою цитофлуориметрії. До того ж цей метод дозволяє препаративно розділити хромосоми, і за наявності специфічних зондів стає можливим дослідження структури і функції окремих генів. В цьому випадку ген можна локалізувати в хромосомі шляхом гібридизації *in situ*, розмножити його (клонувати) і секвенувати. За цією схемою вдається досліджувати також генетичний матеріал некодуючих ділянок хромосом. Базою таких досліджень є геномні бібліотеки ДНК.

Відносно чисті препарати окремих груп морфологічно подібних хромосом і навіть окремі хромосоми можна отримати за допомогою однопроменевого або двопробевого лазерного обладнання. Для аналізу за допомогою **двопробевої цитофлуориметрії** хромосоми обробляють двома барвниками, що мають максимум флуоресценції в різних спектрах опромінення. Такі хромосоми «проганяють» одну за одною крізь заповнену водою вимірювальну частину приладу, де вони послідовно опромінюються двома лазерними пучками (наприклад, ультрафіолетовим і видимим світлом з довжиною хвилі 459 нм). Завдяки цьому можна збудувати двомірне зображення хромосоми, що полегшує її ідентифікацію, а, крім того, отримати досить чисті препарати окремих хромосом.

17.5. Геном і картування генів людини

На сьогодні накопичено чималий об'єм інформації про організацію геному людини. Ця інформація, отримана численними методами класичної і молекулярної генетики, після розшифровки структури геному потребує ретельної перевірки та уточнення. Проте переважна більшість існуючих уявлень про структуру геному людини, що

склалися на підставі раніше проведених досліджень, сумнівів не викликає.

Геном людини (гаплоїдний набір ДНК із 23 хромосом) містить $3,5 \cdot 10^9$ п. н. Так звані повторювальні послідовності (повтори) ДНК складають біля 35% геному, інші 65%, тобто приблизно $2 \cdot 10^9$ п. н., являють собою «унікальні» послідовності, які майже не повторюються.

Біля 10—15% геному людини належить структурним генам. Середній розмір гена у ссавців — 10—30 т. п. н., однак варіації дуже значні — від декількох десятків до мільйонів пар нуклеотидів. Найменший за розміром ген людини МСС-7 складається із 21 п. н., а найбільший — ген дистрофіну — із 2,2 млн п. н. На підставі секвенування та інших методів вивчення ДНК з'ясовано, що переважна частина геному людини не кодує структури молекул РНК і являє собою так звану «надлишкову» ДНК.

Повторювальні послідовності ДНК людини складаються із:

- високочастотних повторів (сателітної ДНК);
- помірно частотних послідовностей і малокопійних повторів;
- інвертованих повторів;
- мінісателітних і мікросателітних послідовностей.

Сателітна ДНК — це послідовність із 5—5000 п. н., яка повторюється мільйони разів і утворює кластери головним чином в центромерних і теломерних районах більшості хромосом. Відкрито хромосомноспецифічні послідовності сателітної ДНК, які є зручними маркерами індивідуальних хромосом людини.

Помірно частотні послідовності (не більше 10^6 копій на геном) не утворюють кластерів, чергуються з унікальними послідовностями (ДНК типу *Xenopus*) і виявляються в вигляді довгих (*Line*) і коротких (*Sine*) диспергованих, тобто розсіяних по геному, повторів. **Довгі дисперговані повтори** (5000—7000 п. н. у кількості 10^3 — 10^6 копій на геном) обмежені з обох боків прямими повторами (300—600 п. н.) Прикладом *Line*-повторів є сімейство послідовностей *KpnI*, здатних транскрибуватися. **Короткі дисперговані повтори** (від декількох пар до сотень пар нуклеотидів, повторених більше 100 000 разів) активно транскрибуються як компоненти інтронів або як самостійні елементи. Найбільш численним сімейством таких повторів є сімейство послідовностей *Alu* (біля 500 000 копій), яке розпізнається *Alu*-рестриктазою. Структура *Alu*-повторів нагадує довгі кінцеві повтори (*LTR*) ретровірусів, а також деякі мобільні генетичні елементи. Транскрипти *Alu*-повторів і *KpnI*-послідовностей в клітині можуть слугувати матрицями для синтезу відповідних кДНК з наступною їх інтеграцією у геном.

Інвертовані повтори складаються із двох ідентичних копій довжиною 300 п н, розташованих у зворотній послідовності стосовно одна одної на відстані від нуля до десяти тисяч п н. Інвертовані повтори складають до 5% геному, і не менше третини їх є паліндромами, які входять у склад регулювальних елементів геному.

Мінісателітні та мікросателітні послідовності являють собою розсіяні по геному короткі тандемні повтори. Мінісателітна ДНК (повтори 16—24 п н) і мікросателітна ДНК (повтори 2, 3, 4 нуклеотидів) утворюють гіперваріабельні ділянки геному і часто асоційовані з кодуєчими районами структурних генів. Класів і типів міні- і мікросателітів дуже багато, і їм властиві менделівські принципи успадковування. Деякі із мікросателітів нараховують 10^4 — 10^5 копій, рівномірно диспергованих по геному. Визначення локалізації та структури таких повторів з допомогою рестриктаз та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є найсучаснішими методами вивчення поліморфізму ДНК (В. І. Глазко, А. П. Рісков, Ю. М. Сиволап та ін).

Дослідження унікальних сегментів хромосом (**унікальних послідовностей**) методами класичної цитогенетики показало, що вони виявляють властивості еухроматину. Здатні до транскрипції послідовності ДНК (власне «гени») локалізовані головним чином у цих унікальних районах, які відповідають світлим G-сегментам і темним R-сегментам. Особливі послідовності, що кодуєть рРНК, містяться в районах **ядерцевих організаторів** (коротке плече акроцентричних хромосом 13—15, 21, 22).

Картування десятків тисяч генів людини досі являє собою надзвичайно складне завдання, хоч його й полегшує те, що деякі гени зібрані в групи — так звані **кластери**. Кластерно розташовані гени рРНК, глобінів, білків головного комплексу гістосумісності, імуноглобулінів та ін.

Для картування генів людини застосовують різні методи, серед яких особливо ефективними виявилися методи генетики соматичних клітин. Дуже часто їх поєднують з іншими підходами — аналізом рододовідів, використанням мічених зондів, гібридизацією нуклеинових кислот тощо.

Із недавно ідентифікованих генів людини слід згадати нормальні та структурно змінені гени, які дуже уповільнюють процеси життєдіяльності («гени анабіозу»), збуджують почуття голоду і підвищують апетит («ген бекону»), визначають ступінь пристрасті до наркотиків та паління, регулюють біоритми людини, викликають ознаки цукрового діабету, шизофренії, епілепсії та інших хвороб.

Сьогодні генетична карта хромосоми 1 є більш детальною, ніж генетичні карти інших хромосом. В цій найбільшій хромосомі люди-

ни знайдено гени, що кодують білки різних класів — антигени, ферменти, фактори зсідання крові та ін. (рис. 17.5). Мутації в цих генах є причиною відомих генетичних захворювань.

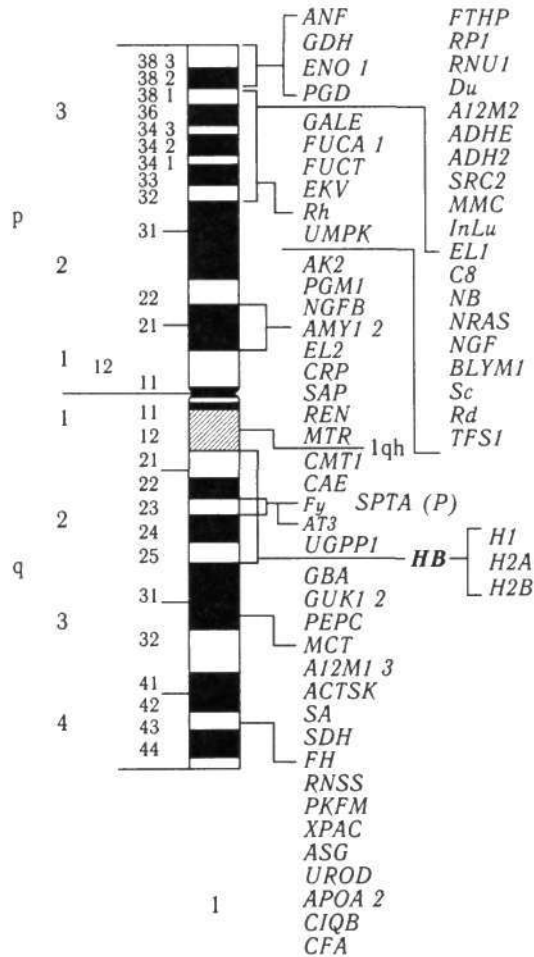


Рис. 17.5. Цитологічна карта генів хромосоми 1 людини
(Ф. Фогель, А. Мотульські)

Продукти деяких генів хромосоми 1 легко визначити у окремої людини, і тому їх можна використовувати для генетичного сімейно-

го аналізу. Саме такими є гени *AMY* (α -амілази), *GDH* (глюкозо-дегідрогенази), *PGD* (фосфоглюконатдегідрогенази), *Rh* (резус-фактора крові) та інші. Група генів, таких як *AK₂* (аденілаткінази-2), *ENO₁* (енолази-1), *FH* (фумаратгідратази), *PEPC* (пептидази С), *UMPК* (уридинмонофосфаткінази), ефективно використовуються в генетиці соматичних клітин.

Величина геному людини, виражена в одиницях рекомбінацій, складає 3000 сантиморган (*cM*), тобто 130 *cM* у середньому на хромосому. Найбільш сучасні методи забарвлення хромосом дали можливість виявити до 1000 смуг на всіх 23 хромосомах людини. Таким чином, одна смуга, що виявлена цитогенетично, відповідає 3 *cM*.

Генноінженерні методи мають значно більшу розрішальну здатність. Застосовуючи ці методи, можна картувати послідовності ДНК протяжністю від декількох пар нуклеотидів до 100 000 п. н., що відповідає приблизно 0,03 від розміру смуги забарвлення або 0,1 *cM*.

Досить успішно здійснюється куртування генів Х-хромосоми. Ген, відповідальний за кольорову сліпоту (дальтонізм), був локалізований в Х-хромосомі ще в 1911 році. Особливості успадковування генів, зчеплених з Х-хромосомою, дали можливість локалізувати в цій групі зчеплення понад 100 локусів.

В протилежність цьому, хромосомна належність першого аутосомного гена була визначена лише в 1968 році. Куртування аутосомних генів значно прискорилось після того, як було доведено їх зчеплення з іншими генами, точну локалізацію яких у хромосомах вдалося з'ясувати методами **генетики соматичних клітин**.

17.5.1. Гібридизація клітин у культурі і картування генів

Зливанню клітин організмів різних ліній і видів сприяють деякі речовини, наприклад поліетиленгліколь або інактивовані віруси, наприклад вірус Сендай. При цьому може утворитися гібридна клітина, що містить геноми обох батьківських форм. Якщо два ядра такої клітини зливаються в одне, то утворюється **синкаріон**, який містить хромосоми обох батьків. Протягом перших поділів гібридної клітини хромосоми одного із об'єднаних наборів швидко втрачаються. У гібридів клітин миші та людини елімінуються хромосоми людини. Через 30 поколінь гібридна клітинна лінія «миша—людина» містить повний хромосомний набір миші і зменшену кількість

хромосом людини; деякі з клітин утримують лише одну-дві пари людських хромосом.

Варіабельні втрати хромосом людини гібридними клітинами полегшують картування генів у цих хромосомах. Якщо наявність конкретної хромосоми людини корелює із здатністю гібридної клітини синтезувати певний білок, то дуже вірогідно, що ген цього білка належить саме цій групі зчеплення. Щоб скористатися цим методом і впевнено віднести досліджуваний локус до певної хромосоми, необхідно дотримуватися двох правил:

1) треба мати чіткі критерії ідентифікації даної хромосоми людини в гібридній клітині;

2) досліджувана ознака, що визначається хромосомою людини, повинна легко відрізнятися від аналогічної ознаки миші. Наприклад, мутантна лактатдегідрогеназа А (LDH-A) клітин людини і відповідний фермент клітин миші добре розділяються електрофоретично, тому їх легко розрізнити в гібридних клітинах.

Зчеплення генів у соматичних клітинах називають **синтенією** (від грецького «син» — сумісно, «тені» — підтримувати). Цей термін введено для того, щоб відрізнити дані про хромосомну локалізацію генів, отриманих в дослідах на соматичних клітинах, від даних по зчепленню генів, отриманих шляхом аналізу родоходів.

Із табл. 17.2 видно, що гени тимідинкінази (TK) і галактокінази (GALK) синтенічні і що вони локалізовані в хромосомі 17 людини.

Таблиця 17.2

Схема, що ілюструє процес визначення локалізації генів у хромосомах людини методом гібридизації соматичних клітин (Ф. Айала, Дж. Кайгер)

Показники	Гібридні лінії клітин					
	I	II	III	IV	V	VI
Гени, що експресуються						
LDHA (лактатдегідрогенази А)	+	+	-	+	+	-
GALK (галактокінази)	-	+	+	+	-	-
TK (тимідинкінази)	-	+	+	+	-	-
Наявність хромосом						
11	+	+	-	+	+	-
15	+	-	+	-	+	-
16	+	+	-	-	-	+
17	-	+	+	+	-	-

Примітка «+» і «-» означають наявність або відсутність досліджуваного ферменту або хромосоми у гібридних клітин

Віднесенню того чи іншого локуса до певної хромосоми дуже допомагають **селективні методи**, що дають змогу відбирати із усієї популяції гібридних клітин стабільні лінії з досліджуваними генами і хромосомами. Ці методи ґрунтуються на принципі, який лежить в основі добору певних рекомбінантів бактерій або дріжджів.

Якщо у батьківської лінії клітин миші відсутня будь-яка істотна функція, наприклад здатність синтезувати необхідну для життєдіяльності сполуку, то цей недолік можна компенсувати внесенням у таку клітину елементів геному людини. Отримана гібридна клітина миші і людини може поступово втратити всі хромосоми людини, за виключенням тієї групи зчеплення, що містить ген, відповідальний за незамінну функцію.

Один із таких селективних методів називається **ГАТ-селекцією** (ГАТ — аббревіатура від назв речовин гіпоксантину, аміноптерину і тимідину). Аміноптерин блокує синтез пуринів і піримідинів. За його наявності клітини мусять використовувати лише готові азотисті основи, що утворюються за деградації полінуклеотидів. Один із численних ферментів синтезу ДНК — тимідинкіназа (ТК) — здійснює перетворення тимідину в тимідинмонофосфат. Якщо цей фермент у клітинах миші відсутній, то на селективному середовищі ГАТ із-за відсутності тимідинмонофосфату можуть рости лише ті клітини, які отримали ген ТК у складі хромосом людини. Цитологічні дослідження показали, що всі клітини, яких вдається відібрати з допомогою ГАТ-селекції, містять хромосому 17 людини. Досконале дослідження таких ліній клітин дає можливість картувати не тільки ген ТК, але й інші гени, що локалізовані в сімнадцятій хромосомі. Селективне середовище ГАТ може бути використане також для добору клонів, що містять і інші хромосоми людини, гени яких взаємодіють з геном ТК за синтезу ДНК та її компонентів.

Картування генів дуже полегшують методи, які дають можливість отримувати гібридні лінії клітин лише з певними компонентами геному людини. Перш за все — це гібридизація клітин миші з мікроклітинами людини і поглинання (ендоцитоз) клітинами ізольованих людських хромосом.

Мікроклітини отримують культивуванням клітин у присутності колцеміду. За цих умов ядро клітини розпадається на декілька мікронуклеусів, кожен з яких містить одну або декілька хромосом. Після обробки таких клітин цитохалазином центрифугуванням виділяють фракцію мікроклітин, які являють собою мікронуклеуси, оточені тонким шаром цитоплазми. Цитологічно можна визначити, які саме хромосоми містять отримані мікроклітини. Гібридизація останніх з клітинами миші призводить до утворення гібридних клітин, що несуть лише певні хромосоми людини і весь набір хромо-

сом миші. Гени людини, що експресуються в отриманих гібридних лініях, можуть бути віднесені до чітко визначених хромосом.

Використовуючи можливості проточної мікрофлуориметрії, можна отримувати фракції індивідуальних хромосом людини високої чистоти. Якщо вільні хромосоми додати до культури клітин миші, то останні можуть поглинати цілі хромосоми шляхом **ендоцитозу**. В реципієнтній клітині захоплені хромосоми, як правило, руйнуються на фрагменти. Безцентромерні фрагменти можуть вбудовуватись у хромосоми миші і експресуватись у гібридних клітинах.

Послідовність генів у хромосомі людини можна визначити, трансформуючи реципієнтну клітину певним фрагментом хромосоми або його частинами. Крім того, послідовність генів і їх відносне зчеплення можна вивчати за частотою **котрансформації** цих генів. Експерименти зводяться до визначення частот сумісного вбудовування двох або більшої кількості генів у геном реципієнтної клітини. Чим більша частота котрансформації, тим менша відстань між досліджуваними генами.

17.5.2 Картування генів за допомогою хромосомних перебудов

Встановлення локалізації гена в тій чи іншій хромосомі людини — це лише перший крок у картуванні. Необхідно визначити послідовність розташування генів і їх точну локалізацію. В деяких випадках вже уважний аналіз родоводів дає змогу розташувати на генетичній карті хромосоми декілька маркерів. Більш надійну інформацію дають методи генетики соматичних клітин у поєднанні з цитогенетичним аналізом і паралельним вивченням фенотипових виявів хромосомних перебудов — делецій, транслокацій, дуплікацій.

Принципи цих методичних підходів можна зрозуміти з такого конкретного прикладу.

Цитологічним дослідженням каріотипів двох дітей, у яких були численні уроджені аномалії, вдалося показати наявність делецій у термінальній області короткого плеча другої хромосоми. У однієї дитини делеція хромосоми розпочиналася в термінальному районі смуги 2p23, а у другої охоплювала і проксимальний район цієї смуги. Культура клітин, отриманих від першої дитини, виявляла активність кислої фосфатази 1 (АСР1), в той час як культура клітин від другої дитини не мала такої активності. Можна зробити висновок, що ген АСР1 локалізований у проксимальному районі смуги 2p23.

У випадку транслокацій маркований ген переноситься в іншу хромосому, збереження якої в культурі гібридних клітин супровод-

жується збереженням відповідної функції навіть за втрати клітинами всіх інших хромосом людини. Так, якщо у гібридних клітин зберігається лише хромосома 14, що несе транслоковане довге плече X-хромосоми, то у таких клітин виявляється експресія трьох генів, локалізованих в X-хромосомі: фосфорибозил-гіпоксантин-трансферази, фосфогліцераткінази і глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази.

Дуплікація гена, як правило, супроводжується зміною рівня накопичення відповідного білка (ферменту), що в поєднанні з даними цитогенетичних досліджень допомагає картувати відповідний ген.

17.5.3. Картування геному за допомогою ДНК-зондів

Локуси, що не мають фенотипового вияву, можуть бути картовані лише методами молекулярної генетики. В основі багатьох таких методів лежить використання ДНК-зондів та ПЛР.

Перше застосування методів з використанням ДНК для картування генів людини полягало в гібридизації ДНК *in vitro*. Так було картовано гени α - і β -глобінів. Відповідні зонди (кДНК) були отримані за допомогою зворотної транскрипції на матрицях α - і β -глобінівих іРНК. Ці зонди утворювали стабільні дуплекси з комплементарними послідовностями ДНК людини в умовах денатурації і наступної ренатурації молекул *in vitro*. Поєднання цього підходу з методами генетики соматичних клітин і каріологічним аналізом дало можливість з'ясувати, що гени β -глобінового сімейства розташовані в хромосомі 11, а α -глобінові гени — в хромосомі 16.

Зазначений метод має чимало недоліків, багато з яких вдалося усунути завдяки блот-гібридизації за Саузерном. На першому етапі відповідний ДНК-зонд мітять радіоактивними ізотопами (^{32}P або ^3H). Для цього ДНК-зонд інкубують з невеликою кількістю ДНКаз-1, яка вносить декілька одноланцюгових розтинів у дволанцюгову ДНК. Потім додають радіоактивно мічені нуклеотиди і ДНК-полімерази, завдяки чому мічені нуклеотиди включаються в ДНК-зонд. Із гібридних ліній клітин, що містять певні хромосоми людини, виділяють тотальну ДНК і обробляють її рестриктазою. Отримані фрагменти ДНК розділяють гель-електрофорезом, денатурують і переносять на нітроцелюлозні мембранні фільтри. На фільтрах здійснюють гібридизацію з тим або іншим міченим ДНК-зондом. За необхідності відповідні фрагменти хромосомної ДНК клонують за допомогою плазмід або фагових векторів.

Після гібридизації фільтри кладуть на рентгенівську плівку, на якій після проявлення виявляються смуги, що відповідають рестрикційним фрагментам, гомологічним даному зондові. Гени відно-

сять до певної хромосоми людини на підставі кореляції між наявністю даної хромосоми в клітинах гібридної лінії і відповідної зонду смуги на радіоавтограмі.

Вирішенню основного завдання — повного картування геному людини — сприяє створення **бібліотек кДНК** і так званих **геномних бібліотек**. Бібліотеки кДНК, отримані на матрицях іРНК різних джерел, містять в основному унікальні послідовності активно функціонуючих структурних генів або їх частин, а також послідовності ДНК з їх найближчого оточення. Ці бібліотеки використовують для виявлення відповідних генів у хромосомах. **Геномні бібліотеки** отримують шляхом фракціонування тотальної ДНК рестрикційними ендонуклеазами і наступного клонування окремих рестриктів у векторах.

Нерідко в межах певної послідовності ДНК виявляється **рестрикційний поліморфізм**. Це означає, що сайти рестрикції можуть варіювати у різних людей. У таких випадках відповідні зонди можна використати для класичних досліджень зчеплення в сім'ях.

З'ясувалося, що один із типів поліморфізму ДНК полягає в різній кількості тандемних повторів, що мають спільну центральну ділянку із 10—15 п. н. («**мінісателіти**»). Довжина рестрикційних фрагментів у цих випадках залежить від кількості згаданих мінісателітів. Існують так звані **гіперваріабельні ділянки ДНК**, які часто межують із структурними генами і істотно впливають на їх експресію. Створено зонди, які пізнають гіперваріабельну ДНК. В різних хромосомах людини виявлено багато гіперваріабельних ділянок, гетерозиготність по яких є звичайним явищем, а гомозиготність зустрічається рідко. Рестрикційний аналіз гіперваріабельних ДНК показав, що їх окремі рестрикти успадковуються згідно з законами Менделя. Саме тому кожний індивід із родоходу легко відрізняється від будь-якого іншого (рис. 17.6).

За наявності мікро- та мінісателітів відмінності довжин рестриктів у батьків і їх дітей можуть ви-

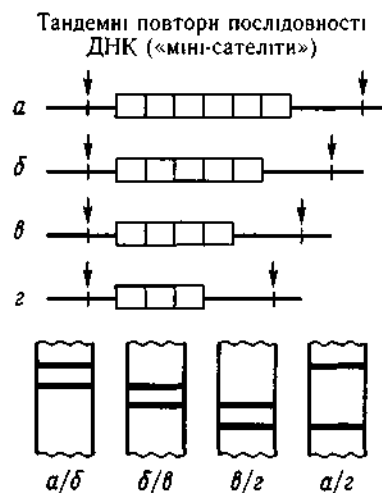


Рис 17.6 Варіанти довжин рестриктів із-за різної кількості в них «мінісателітів»

Послідовності а, б, в і з відрізняються на один повторювальний сегмент. Сайти рестрикції зазначено стрілками, гетерозиготи з різними комбінаціями рестриктів показані схематично (а/б, б/в і т. ін.)

никати не тільки внаслідок точкових мутацій у сайтах пізнання, але й в результаті неточної реплікації та нерівного кросинговеру.

Робота з геномною бібліотекою дуже трудомістка, враховуючи розміри геному людини і величезну кількість фрагментів (до 500 000), з яких необхідно вибрати один-єдиний або декілька, що містять необхідну послідовність. Для вирішення багатьох конкретних завдань краще мати **хромосомно-специфічну** бібліотеку. Отримання таких бібліотек сьогодні стало можливим завдяки сортуванню хромосом цитофлуорометричним методом.

Як зонди використовуються не тільки кДНК, але й синтетичні олігонуклеотиди, будова яких відповідає амінокислотній послідовності певного білка або його частини. Сьогодні існують автоматичні прилади (синтезатори) для синтезу будь-яких нуклеотидних послідовностей певної протяжності. Кінцевою метою таких досліджень є розшифровка повної нуклеотидної послідовності ДНК хромосоми і з'ясування властивих конкретним ділянкам ДНК специфічних функцій. На сьогодні принаймні перша частина цієї мети досягнута.

Деякі дуже протяжні гени за обробки рестриктазою розпадаються на фрагменти. В цьому випадку за допомогою відповідного зонда із геномною бібліотекою спершу «витагується» лише певна частина досліджуваного гена. Тоді застосовують методичний засіб, який образно називається «прогулянкою по хромосомі». Оскільки нуклеотидна послідовність фрагмента гена, як правило, значно довша, ніж зонд, то її кінці перекриваються з іншими фрагментами даного гена в бібліотеці. Вільні кінці цих фрагментів гібридизують з кінцями наступних фрагментів і т. д., поки весь структурний ген не буде повністю ідентифікований. Саме так був реконструйований структурний ген фактора VIII зсідання крові (антигемофільного фактора) людини, який знаходиться в X-хромосомі і має надзвичайно протяжну структуру.

Метод гібридизації за Саузерном, поєднаний з підходом, розробленим для генетичного аналізу соматичних клітин, успішно застосовується не тільки для картування певних генів, але й для локалізації послідовностей ДНК з невідомими функціями, знайденими в бібліотеках генів людини.

17.5.4. Гібридизація мічених зондів і метафазних хромосом *in situ*

Прямим способом картування генів є безпосередня гібридизація радіоактивних зондів і метафазних хромосом. Спершу цей метод використовували для картування політенних хромосом дрозофіли,

в останні роки гібридизацію *in situ* застосовують також для картування тандемних повторів (наприклад, генів рРНК) і навіть унікальних генів людини.

Принцип цього методу відносно простий. Метафазні хромосоми людини, розподілені на предметному склі, обробляють так, щоб зруйнувати домішки зв'язаної РНК і перевести ДНК хромосом у денатурований стан. Предметні стекла з метафазними хромосомами інкубують з міченим радіоактивним або флуоресцентним зондом, потім відмивають надлишок ДНК-зонду, що не зв'язався з денатурованою ДНК хромосом. Після інкубації з зондом локалізацію гібридизованих і негібридизованих ділянок ДНК у метафазних хромосомах виявляють радіоавтографічно, або з допомогою люмінесцентного мікроскопа.

Методом гібридизації *in situ* картовано чимало генів людини, серед них гени легкого ланцюга імуноглобуліну χ (*IGK*), гени гістонів (*H1*, *H2A*, *H2B*, *H3*, *H4*), інтерферонів α і β (*IFL*, *IFF*), інсуліну (*INS*), α -глобіну (*HBA*), кластер генів гормону росту (*GH*) та інші.

17.5.5. Деякі особливості генетичної карти людини

В останні роки досягнуто значних успіхів щодо вияву зчеплених генів і картування локусів у певних хромосомах. Краще з'ясовано генний склад хромосоми 1 і X-хромосоми.

Віднесення локусів до X-хромосоми не викликає утруднень, якщо родоводи виявляють типове X-зчеплене успадкування. Точна локалізація генів у конкретних сегментах X-хромосоми вимагає, крім сімейних досліджень, застосування складних сучасних методів. Майже всі X-зчеплені локуси (а їх значно більше сотні) віднесено до цієї хромосоми на підставі аналізу родоводів, а потім це було підтверджено методами гібридизації соматичних клітин. Значно менша частина генів картована з допомогою інших методів.

З'ясувалося, що оперонна організація генів, широко розповсюджена у бактерій, для геному людини не характерна. Тому функціонально пов'язані гени, навіть такі, що походять від спільного гена-предка, можуть виявлятися в різних хромосомах. Так, наприклад, ген лактатдегідрогенази А (*LDHA*) локалізується в хромосомі 11, а *LDHB* — в хромосомі 12. Гени α -глобінової групи за всіма ознаками мають спільне походження з генами δ -, β - і γ -глобінів, проте групи цих генів не виявляють зчеплення.

В протилежність цьому, значна частина генів людини утворює тісно зчеплені групи або кластери, які мають різну молекулярну організацію і систему регуляції функцій.

В Х-хромосомі ідентифіковано два генних кластери: *Xg*-кластер, що містить гени, зчеплені з геном групи крові *Xg*, і *G6PD*-кластер. Ген *Xg* розташований поблизу від кінця короткого плеча (сегмент Хр22.3) і тісно зчеплений з локусом іхтіозу (стероїдної сульфатази). Локус глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (*G6PD*) міститься в сегменті Хq28, недалеко від кінця довгого плеча. До цього кластера належать мутантні гени гемофілії А і В, гени, що обумовлюють крихкість Х-хромосоми і розумову відсталість, а також гени протанопії і дейтеранопії — різних форм кольорової сліпоти.

Встановлено, що локуси поблизу теломерного кінця короткого плеча (*Xg*, Х-зчеплений іхтіоз) не втягуються в інактивацію за гетерохроматинізації однієї з Х-хромосом. Під час мейозу цей сегмент Х-хромосоми кон'югує з Y-хромосомою.

Із генних банків Х-хромосом ізолювано і ідентифіковано чимало ДНК-зондів. В дослідях по гібридизації з такими ДНК-зондами показано, що Х-хромосома виявляє гомологію з Y-хромосомою не тільки в районах короткого плеча, але й в інших районах. Ці результати важливі для розуміння еволюції статевих хромосом і механізмів генетичної детермінації статі у людини.

В щойно наведених прикладах кластеризація генів людини не супроводжується їх сумісною функціональною організацією. Однак в інших випадках кластерна організація генів може бути пов'язана з функцією. Так, наприклад, в β -глобіновому кластері гени ϵ -, γ -, β - і δ -глобінових ланцюгів розташовані саме в тій послідовності, в якій вони експресуються в онтогенезі. У випадку імуноглобулінів тісне зчеплення окремих генів має істотне функціональне значення, оскільки продукти цих генів комбінуються за утворення різних класів антитіл.

Групи функціонально споріднених генів, що мають подібну структуру і спільне походження, називають **сімейством генів**. До одного сімейства може відноситись декілька кластерів. Так, наприклад, сімейство глобінових генів формує два кластери: α -глобінів в хромосомі 16 і β -глобінів в хромосомі 11. Інші сімейства генів, такі, наприклад, як гени білків м'язів, розкидані по багатьох хромосомах. Сьогодні гени, що детермінують актини і міозини, детально досліджені. І ті, і другі білки існують у людини як множинні ізоформи. Вони синтезуються в процесі індивідуального розвитку в чітко визначеній послідовності.

Кластери генів поверхневих антигенів клітин

В останні роки особливу увагу дослідників привертає генетична детермінація груп крові і антигенів гістосумісності. Ці генетичні

дослідження стимулюються проблемами переливання крові і пересадки органів або тканин.

Rh-комплекс генів

Генетичні аспекти груп крові системи АВО вже обговорювались (розділ 1.4). Серед інших систем дуже важливою є система груп крові Rh. Антитіла, що виникають у відповідь на антигенні чинники Rh, не мають нічого спільного з системами груп крові АВО, MN, P та іншими. Практична важливість системи Rh стала очевидною після того, як була з'ясована пряма залежність нещасливих випадків від згаданих антитіл за переливання крові. Крім того, з'ясувалося, що саме резус-несумісність матері і плода є чинником еритробластозу і гемолітичної хвороби у немовлят.

У представників білої раси 85% досліджених дають позитивні реакції з анти-Rh-сироватками. Сімейний аналіз показав, що Rh-позитивні люди — це гомозиготи *Rh/Rh* або гетерозиготи *Rh/rh*, тоді як Rh-негативні індивіди є гомозиготами *rh/rh*. В 1941 році були виявлені інші антитіла, що реагували з еритроцитами 70% всіх досліджених людей і не мали відношення до основного фактора Rh. Антиген, що викликав утворення цього класу антитіл, був позначений як Rh'. Невдовзі по цьому було виявлено ще одне антитіло (анти-Hr) і було з'ясовано, що Rh' і Hr — фактори кодомінантні. У кожної людини в крові наявні або антиген Rh', або Hr, або обидва ці антигени. В останньому випадку індивід передає своїй дитині лише один із антигенів, що свідчить про аallelність відповідних генів.

Ці та інші факти пояснює модель, запропонована Фішером, згідно з якою існує три пари міцно зчеплених аallelних генів, кожен з яких відповідає за один антиген. Відповідно за фактори Rh' і Hr відповідає пара алелей *C/c*, для антигенів Rh⁺ і rh⁻ постульована пара алелей *D/d*, а для пізніше відкритої третьої пари серологічних факторів — аallelні гени *E/e*. Слід зазначити, що продукти всіх цих аallelних генів сьогодні відомі, за винятком гена *d* (рис. 17.7).

На думку Фішера, крім зазначених найбільш розповсюджених трьох класів генів *Rh*-комплексу, деколи можуть виникати і комбі-

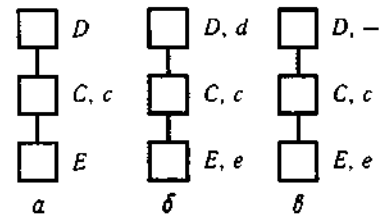


Рис. 17.7. Гіпотетична структура *Rh*-комплексу (за Ф. Фогелем, А. Мотульські):

а — на підставі даних, відомих на 1941 р.; б — антигени, передбачені Фішером і Рейсом; в — вже відкриті антигени (антиген *d* ще не виявлено)

нації їх послідовностей внаслідок нечастого кросинговеру між цими міцно зчепленими локусами.

Головний комплекс гістосумісності (МНС)

З'ясувалось, що **антигени гістосумісності** можна легко виявити в лейкоцитах, які і стали основним об'єктом відповідних досліджень. Методичним досягненням можна назвати розробку **тесту мікролімфоцитарної токсичності**. Принцип цього простого тесту полягає в тому, що клітина, яка містить певний антиген, реагує з відповідним антитілом і комплементом. При цьому порушується клітинна мембрана, і фарбник трипановий голубий проникає в клітину. Позитивна реакція (забарвлення клітин) вказує на те, що антиген клітинної поверхні розпізнано специфічним антитілом.

Завдяки цьому методіві, кількість відкритих лейкоцитарних антигенів швидко зростала, і в 1965 році було зроблено припущення, що більшість із них належить одній генетичній системі. Сьогодні відомо, що група зчеплених локусів головного комплексу гістосумісності (МНС) розташована в хромосомі 6 і містить чотири локуси основної системи *HLA* (Human leucocyte antigen), кожен з яких має багато алельних варіантів. Ці локуси позначені буквами *A*, *C*, *B*, *D*; вони розташовані в певній послідовності (рис. 17.8). Крім зазначених чотирьох локусів *HLA*-комплексу, в цьому районі

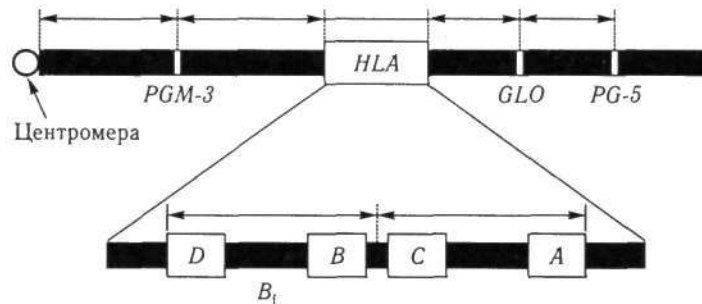


Рис. 17.8. Гени гістосумісності людини

хромосоми локалізовані і інші гени імунної відповіді, наприклад ті, що визначають будову окремих компонентів комплементу (C_2 , C_4 , C_8 , B_1) та ін. (рис. 17.9).

Для локусу *HLA-B* відомо більше 40 алельних генів; у локусах *HLA-A*, *HLA-C*, *HLA-D* (і його різновидності *HLA-DR*) нараховують від 10 до 20 алелів. В протилежність антигенам *HLA-A*, *HLA-B*

і HLA-C, які експресуються на поверхні Т- і В-лімфоцитів, антигени HLA-D виявляються переважно на В-клітинах і макрофагах.

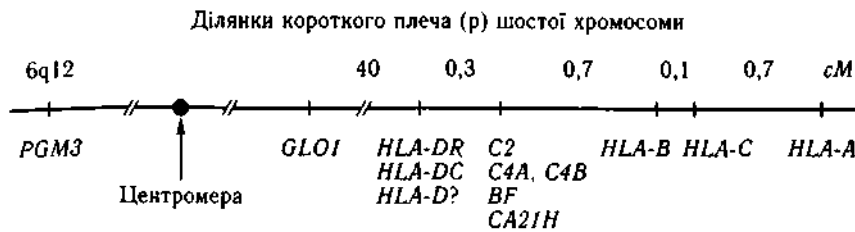


Рис. 17.9. Група зчеплення локусів головного комплексу гістосумісності (МНС) у хромосомі 6:

BF — пропердиновий фактор В; *C2* — компонента 2 комплементу; *C4A* — компонента 4А комплементу; *C4B* — компонента 4В комплементу; *CA21H* — уроджена гіперплазія (недостатність 21-гідроксилази); *GLO1* — гліоксалаза 1; *HLA-A (B, C)* — МНС антигени класу I; *HLA-D (DC, DR)* — МНС антигени класу II; *PGM3* — фосфоглюкомутаза 3

HLA район аналізували також на молекулярному рівні за допомогою методів рекомбінантних ДНК. Були ідентифіковані і секвензовані нуклеотидні послідовності генів основних класів *HLA*-антигенів, споріднених з ними генів і псевдогенів, а, крім того, виявлено поліморфізм по сайтах рестрикції.

Різноманітність алельного складу *HLA*-локусів і низька частота кожного з алельних генів у людських популяціях пояснюють ту обставину, що знайти двох індивідів з подібною, а тим паче ідентичною антигенною структурою дуже важко, або й неможливо. Одна із дуже важливих особливостей системи *HLA* — властивість деяких *HLA*-алелей зустрічатися разом значно частіше, ніж це мало б бути за умов незалежного комбінування. Сукупності зчеплених алелей, що разом попадають у статеву клітину, називають гаплотипом. Встановлено, що гаплотип (A_1, B_8) зустрічається в п'ять разів частіше, ніж очікується. Такі відхилення від рівноваги по зчепленню стимулюють в останні роки численні спроби знайти залежність між тим чи іншим алельним складом *HLA*-системи і певними хворобами. В ряді випадків ці спроби виявилися вдалими. Справа в тому, що нерівновага по зчепленню існує не тільки між локусами *HLA*, але також між ними і тісно зчепленими генами імунної відповіді. Асоціації (взаємозв'язаність) виявлено між *HLA*-антигенами і тими захворюваннями, для яких раніше постулювали аутоімунний характер.

Досліди з пересадками нирок свідчать, що у випадку несімейних пересадок частота приживлення органу не буває повною навіть

тоді, коли донор і реципієнт повністю сумісні за системою АВО і мають максимальну відповідність по антигенам HLA. Це говорить про те, що, крім головного комплексу гістосумісності, існують і інші системи, які визначають гістосумісність органів. Вважають, що існує складна цілісна генетична система, яка регулює контакти клітин поміж собою і їх кооперацію на різних стадіях імунної відповіді. Така кооперація спостерігається, наприклад, коли макрофаги, що першими зв'язують антиген, переносять його до Т-лімфоцитів, а потім Т- і В-лімфоцити разом ініціюють утворення антитіл.

Деякі дослідники вважають, що механізми розпізнавання клітин грають важливу роль у процесі ембріонального розвитку і диференціації. Можливо, що HLA-антигени визначають розвиток різних клонів імунокомпетентних клітин в ембріогенезі.

Інша важлива функція МНС-комплексу — це захист особин даного виду від мікроорганізмів та пухлинних клітин.

Система комплементу

Комплемент являє собою набір по меншій мірі десяти білкових факторів, що можуть бути знайдені у свіжій (неконсервованій) сироватці крові. Їх позначають як C_1 , C_2 , C_3 і т. д. Перший з них активується антитілами до відповідних антигенів, а потім C_1 активує C_2 , C_2 активує C_3 і т. д. Внаслідок цієї каскадної активації комплементу ушкоджується клітинна мембрана, що несе антиген, і може наступати навіть лізис клітини. Активовані компоненти комплементу грають важливу роль медіаторів імунної відповіді організму на мікробну інфекцію.

Система комплементу активується не тільки фактором C_1 (класичний шлях), але також і фактором C_3 — альтернативний шлях з використанням «пропердинових факторів», а саме фактора В (BF), який діє як «проактиватор» компоненту C_3 .

Відомі випадки спадкового дефіциту окремих компонентів комплементу, а також поліморфізму деяких компонентів (C_2 , C_3 , C_4 та ін.). Локуси факторів C_2 і C_4 належать до однієї групи зчеплення (хромосома 6) разом з локусами головного комплексу гістосумісності і локуса пропердинового фактора В (з основними алелями BF^F і BF^S). В протилежність цьому, локус C_3 (з алелями C_3^F і C_3^S) розташований в іншому місці геному.

Таким чином, є підстави вважати, що цілісна генетична система регуляції імунної відповіді складається з генних комплексів і окремих генів, які відносяться до різних хромосом.

17.6. Спадковість і патологія

17.6.1. Деякі сучасні узагальнення на рівні популяцій

Сьогодні у людини відомо понад чотири тисячі різних спадкових ознак хвороб та вродливостей, що обумовлені мутаціями — як хромосомними (поліплоїдії, анеуплоїдії, хромосомні перебудови), так і генними.

Частота хромосомних і геномних мутацій у популяціях набагато вища, ніж генних. Їх наявність у статевих клітинах пояснює високу летальність гамет і зигот на ранніх стадіях розвитку (до 50—70%). Отже, у людини діє досить ефективний пренатальний і постнатальний добір. Спонтанні викидні складають біля 15% всіх вагітностей, мертвонародження — 2%, а дитяча смертність — 2—3%. Жорсткому тиску добору підлягають у першу чергу хромосомні і геномні мутації. Про це свідчить прогресивне зменшення їх частоти в ряду ембріони → плоди → новонароджені. Все ж 3—4 дитини із кожної 1000 новонароджених уражені хромосомними хворобами. Більшість таких хвороб є **спорадичними**, тобто вони виникають заново внаслідок геномних (або хромосомних) мутацій у гаметах здорових батьків або у зиготах за перших їх мітотичних поділів.

Хворих з успадкованими хромосомними хворобами в популяціях людини небагато, бо такі хворі в переважній більшості помирають у дорепродуктивному віці. Все ж необхідно розрізняти **сегрегаційний** (вищеплення успадкованих мутацій) і **мутаційний** (за рахунок нових мутацій) **генетичний тягар** популяцій.

Генні мутації трапляються рідше, ніж хромосомні й геномні, проте вони не так часто супроводжуються летальними ефектами, в зв'язку з чим можуть довго зберігатися у популяціях, а за певних умов навіть накопичуватися. Дослідження летальних ефектів за близькородинних шлюбів показало, що біля 8% усіх людей несуть новоутворені мутації, і значно менша кількість цих генетичних аномалій успадковується. Згідно з існуючими даними, частота різних мутацій у людини коливається в досить широких межах (табл. 17.3).

Частота виникнення спонтанних мутацій залежить від генотипу, фізіологічного стану організму, віку людини та інших чинників. Аналіз численних даних по гемофілії привів Дж. Нолдейна до висновку, що відповідна мутація виникає значно частіше (можливо, в 10 разів) у чоловічих гаметах, ніж у жіночих. В той же час мутантний ген м'язевої дистрофії типу Дюшена виникає майже однаково часто у чоловіків і жінок.

Таблиця 17.3

Частота виникнення деяких мутацій у людини
(М. П. Бочков, О. Ф. Захаров, В. І. Іванов)

Ознаки (захворювання)	Частота мутацій на 1 млн гамет
Аутосомно-домінантні	
Ахондроплазія	5,1—13,0
Анірідія	2,6—2,9
Мікрофтальмія без психічних порушень	5,0
Синдром Марфана	4,2—5,8
Нейрофіброматоз	44—100
Множинний поліпоз товстої кишки	10—50
Ретинобластома	3,0—12,3
Хорея Гентингтона	1,0—10,0
Туберозний склероз	6,0—10,5
М'язова дистрофія (плечелопаткова форма)	8,0—11,0
Синдром Апера (акро-цефало-синдактилія)	3,0—4,0
Недосконалий остеогенез	7,0—13,0
Полікістоз нирок	65,0—120,0
Множинні екзостози	6,3—9,1
Синдром Гіпеля—Ландау	0,18
Аутосомно-рецесивні	
Мікроцефалія	27,0
Амавротична ідіотія	11,0
Бульозний епідермоліз	5,0
Іхтіоз (уроджений)	11,0
Рецесивні, зчеплені зі статтю	
Гемофілія А	37,0—52,0
Гемофілія В	2,0—3,0
М'язова дистрофія типу Дюшена	43,0—105,0
Іхтіоз	24,0

Найбільш переконливі дані отримано щодо впливу віку матерів на частоту виникнення хромосомних і геномних мутацій. У жінок віком за 35 років різко підвищується (приблизно в 10 разів) імовірність народження дітей із хромосомними хворобами. Вік чоловіків має значно менше значення.

В останні десятиріччя дуже зросла кількість спадкових та інших хвороб у зв'язку з несприятливими екологічними обставинами. Всі експериментальні розробки в області індукованого мутагенезу мають велике значення для гігієнічного нормування нових чинників зовнішнього середовища з генетичних позицій.

Крім добору та мутаційного процесу, на генетичну структуру популяцій людини діють і інші фактори динаміки, які розглядалися

раніше (розділ 15.9). Серед них особливої уваги заслуговують міграції та інбридинг.

Міграції людей і порушення меж системи шлюбів призводить до гетерозиготизації населення по численних поліморфних локусах. Фактором, що є причиною протилежних змін у генетичній структурі людських популяцій, можна вважати **репродуктивну ізоляцію**. Така ізоляція може бути як територіальною, так і соціально обумовленою. У відносно нечисленних популяціях або групах зростає ступінь спорідненості шлюбних партнерів, тобто **інбридинг**. Крім того, за цих умов може виявлятися вплив ще одного фактора генотипової структури популяцій — **дрейфу генів**.

Кровноспоріднені шлюби в людських популяціях зустрічаються тому, що іноді ці популяції обмежені географічними, національними або релігійними рамками. Однією із форм шлюбів, що за своїми наслідками наближається до кровноспоріднених, є вибірковий шлюб фенотипово подібних людей. Іноді люди одного зросту, розумових здібностей, а також, наприклад, глухонімі частіше паруються, ніж цього можна було б чекати за теорією вірогідності. В експериментальній генетиці та селекції подібні випадки називають **позитивним асортативним схрещуванням**.

Головним результатом інбридингу є гомозиготизація генотипів, ступінь якої можна визначити коефіцієнтом інбридингу (розділ 15.9). Кровноспоріднені шлюби, без сумніву, вважалися нормою на ранніх етапах розвитку людства (в племенах, родах). В наші дні в людських популяціях можна виділити декілька форм інбридингу (М. П. Бочков, О. Ф. Захаров, В. І. Іванов):

1. Інцесні (близькородинні) заборонені шлюби — між родичами першого ступеня родинності (батько — дочка, брат — сестра і т. ін.). Такі випадки як система спостерігались у стародавньому світі в Єгипті і багатьох східних країнах. Як приклад можна навести родовід правительки Єгипту Клеопатри VII, коханки Юлія Цезаря і Марка Антонія, відомої своєю красою і розумом (рис. 17.10). Однак, такі приклади є винятком. Як правило, багато дітей від інцесних шлюбів несуть ознаки виродження: їм властива розумова відсталість та наявність спадкових хвороб.

2. Кровноспоріднені шлюби, обумовлені **територіальною ізоляцією** невеликих популяцій. Ізольовані популяції (**ізоляти**) існують і в наші дні, хоч і є тенденція до їх руйнування. Вони зустрічаються в Дагестані, Сванетії, в Сибіру, на Далекому Сході, в країнах Середньої Азії (особливо в гористих районах) та інших місцях.

3. Кровноспоріднені шлюби, обумовлені **соціальною ізоляцією**. Серед деяких груп населення такі шлюби схвалюються з економічних або релігійних мотивів. Особливо це розповсюджено

у східних народів — серед деяких національних меншин японців, євреїв та ін.



Рис. 17.10. Частина родоводу Клеопатри VII, правительки Єгипту

Якщо частота рідкісного мутантного алеля у популяції складає не менше 1%, то говорять про спадковий збалансований поліморфізм. Це явище в популяціях людей є дуже розповсюдженим. Слід зазначити, що системи збалансованого поліморфізму підтримують безмежну генетичну гетерогенність людських популяцій і забезпечують генетичну індивідуальність кожної людини. Підраховано, що відмінності лише по 20 спадкових ознаках (13 груп крові і 7 ферментів) призводять до того, що двох однакових індивідів теоретично можна знайти лише серед 2 млн людей. Оскільки поліморфних систем у людини тисячі, то це означає, що однакових спадкових задатків у різних людей не існує, за винятком гомозиготних близнюків.

Збалансований поліморфізм розповсюджується не тільки на нормальні алелі, але й на шкідливі. Значна частота таких захворювань, як муковісцедоз, діабет, різні форми гемоглобінопатій, фенілкетонурія, може бути пов'язана з високим рівнем поліморфізму по відповідних локусах.

Дослідження ізольованих популяцій показали можливість широкої розповсюженості в них спадкових хвороб. Прикладом слугує

висока частота досить рідкісних спадкових хвороб серед амішів, деяких груп євреїв, азербайджанців тощо. Дослідження таких популяцій сприяє з'ясуванню генетичної гетерогенності спадкових хвороб. Крім того, вони переконують у тому, що всі фактори динаміки генетичної структури людських популяцій діють сумісно, і лише комплексне їх дослідження допомагає уникнути помилок у висновках. Так, наприклад, встановлено, що у формуванні відмінностей у частотах генів гемоглобінопатій в ізольованих популяціях істотну роль відігравали не тільки систематичні (добір), але й стохастичні (дрейф генів) процеси.

Проведено вивчення розповсюдженості спадкових хвороб у залежності від етнічних показників, географічної зони, історичних умов формування даної популяції та інших факторів. З'ясувалися досить цікаві факти:

1. У людини (в протилежність мишам, дрозофілі та іншим об'єктам) відомо більше домінантних ознак, ніж рецесивних. Цілком можливо, що це пояснюється недоліками визначення фенотипу, яке краще вдається у випадку домінантних хвороб.

2. Деякі рецесивні хвороби виявляються з високою частотою в особливих популяціях, що беруть свій початок від ізолятів. Дослідження таких популяцій та ізолятів дають змогу виявляти нові форми спадкових хвороб і відповідні мутантні гени. Це поглиблює існуючі знання про поліморфність генетичних локусів людини, а також про гетерогенність спадкових хвороб.

3. Частота спадкових хвороб у популяції (за умови, що хворі залишають потомків) не відображає частоти виникаючих мутацій, оскільки частина мутацій фенотипово не виявляється. Реалізація рецесивних мутацій у формі гомозигот істотно залежить від популяційно-генетичних чинників (інбридингу, ефекту родоначальника, міграції населення).

4. Рецесивні спадкові хвороби обміну речовин та інші уроджені аномалії дуже нерівномірно розповсюджені в різних регіонах світу, в різних країнах і серед різних народів. Так, наприклад, найнижча частота фенілкетонурії відзначена у Фінляндії, Японії і серед євреїв-ашкеназі в Ізраїлі, в той час як в Ірландії спостерігається найвища частота цієї хвороби. На Гавайських островах серед населення азійського походження частота муковісцидозу складає 1:90 000, а серед населення європейського походження — 1:3800. Це відповідає високій частоті муковісцидозу серед європейців (у Москві, наприклад, 1:2500) і низькій його частоті серед негрів Африки (1:77 000). Подібні коливання частот залежно від географічних та етнічних показників спостережені для великої кількості спадкових хвороб.

1762 Класифікація спадкових хвороб і їх успадковування

Спадковість і середовище грають важливу роль у патогенезі будь-якої хвороби, однак їх питомий внесок неоднаковий за різних захворювань. Виходячи з цього, всі спадкові хвороби можна поділити на такі три групи:

1 Спадкові хвороби, повністю обумовлені шкідливими мутаціями, роль середовища полягає лише в модифікації виявів захворювання. До цієї групи належать деякі моногенні хвороби (наприклад, фенілкетонурія, гемофілія та ін.), а також хромосомні хвороби.

2 Спадкові хвороби, також обумовлені шкідливими мутаціями, однак для їх прояву необхідний специфічний вплив середовища. Такими є вияви недоліків HbS у його гетерозиготних носіїв в умовах гіпоксичної гіпоксії, виникнення гострої гемолітичної анемії за недостатності глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази під впливом сульфаниламідів тощо. В інших випадках (наприклад, за подагри) патологічний ген виявляється в умовах довготривалої дії несприятливого фактора середовища (особливості харчування).

3 Третю групу складає переважна кількість розповсюджених хвороб, особливо у людей зрілого і похилого віку (гіпертонічна хвороба, ішемічна хвороба серця, виразкова хвороба шлунку чи дванадцятипалої кишки, більшість злоякісних пухлин і т. ін.). Основним чинником виникнення цих хвороб є несприятливі умови середовища, однак велике значення має також генетично детермінована схильність, чому ці хвороби називають **мультифакторіальними** або хворобами із **спадковою схильністю**. Є хвороби із слабкою, помірною і високою спадковою схильністю.

Генетичний аналіз захворювань першої групи, тобто моногенних захворювань, будується перш за все на дослідженні родоходів, тобто на з'ясуванні типу успадковування патологічного стану. Зовсім по-іншому провадять генетичне вивчення хвороб із спадковою схильністю. Тут головною є оцінка відносної ролі генотипу і середовища в етіології хвороби. Тому дуже важливим є близнюковий метод дослідження та інші методичні підходи.

Характерною ознакою **моногенних хвороб** слід вважати їх сегрегацію в поколіннях за законами Менделя. Молекулярна природа цих захворювань, як свідчать результати вивчення спадкових гемоглобінопатій (розділ II), може не обмежуватися точковими мутаціями, а полягати в більш протяжних ушкодженнях (делеції, нерівний кросинговер).

До категорії **полігенних хвороб** відносять перш за все хвороби із спадковою схильністю, оскільки останні мають багатофакторіальну природу.

Окрім генних, існує велика група хвороб з множинними пороками розвитку і з відхиленнями вмісту хромосомного матеріалу — це **хромосомні хвороби**, в основі яких лежать хромосомні та геномні мутації.

Якщо моногенні хвороби успадковуються за менделівськими законами, то полігенні хвороби мають значно складніше успадкування. Для з'ясування їх генетичної обумовленості застосовують досить складні методичні підходи, включаючи з'ясування **асоціацій** таких хвороб з певними генетичними маркерами.

Слід зазначити, що навіть моногенні хвороби в зв'язку з плейотропною дією мутантного гена можуть уражати численні органи і системи. Тому клінічна класифікація спадкових хвороб, що будується залежно від ураженої системи органів, є дуже умовною.

На заключення, слід звернути увагу на терміни, які вживаються як синоніми терміну «спадкові хвороби». Перший з них — «**уроджені хвороби**» — значно ширший, ніж поняття «спадкові хвороби». Уродженими є всі захворювання новонароджених, в тому числі індуковані в період ембріонального розвитку (травми плода, вірусні та бактеріальні інфекції тощо). Термін «**сімейні хвороби**» теж більш широкий, бо він охоплює і неспадкові хвороби, якщо вони зустрічаються у декількох членів сім'ї під впливом однакових факторів та умов життя.

Терміном «**уроджені вади (або пороки) розвитку**» в медичній генетиці позначають будь-які анатомічні або функціональні відхилення розвитку плода від норми. Причинами їх виникнення можуть бути різні типи мутацій, несприятливі впливи середовища на ембріон і плід (**тератогенез**), а також поєднання цих причин. Відомо чимало факторів зовнішнього середовища, як фізичних, так і хімічних, що виявляють ушкоджуючу (тератогенну) дію. Серед них — вірусна інфекція, алкогольна інтоксикація, вплив наркотичних речовин і т. д. Кількість відомих сьогодні уроджених синдромів у дітей складає декілька тисяч і вони є причиною 23—29% випадків дитячої смертності.

Генні хвороби

Природа генних мутацій (розділ 11.5) свідчить про те, що одні і ті ж аномалії фенотипу можуть бути наслідком різних порушень в одному гені або в різних структурних генах, якщо вони кодують продукти з комплементарною взаємодією. В медичній генетиці це

явище відоме як генетична гетерогенність спадкових хвороб. Її наявність була встановлена на підставі клінічно-генеалогічних даних С. М. Давиденковим ще у 30-х роках. Однак, широкого визнання концепція генетичної гетерогенності спадкових хвороб набула після утвердження в дослідницькій роботі біохімічних та молекулярногенетичних методів, які дали можливість провадити генетичний аналіз на рівні генних продуктів — РНК, білків, а також на рівні самого гена.

Наявність генетичної гетерогенності встановлена для багатьох спадкових хвороб. У випадку рецесивності мутантних генів нечасті шлюби двох гомозигот з однаковою аномалією практично завжди призводять до однозначного результату: якщо обидва батьки гомозиготні з одного і того ж рецесивного гена, то в такій сім'ї народжуються виключно уражені діти. Це трапляється за альбінізму, глухонімоти та інших спадкових захворювань. Однак, в деяких шлюбах між альбіносами або глухонімими народжувалися фенотипово здорові діти, що свідчить про існування у людини в кожному випадку принаймні двох локусів, відповідальних за ці хвороби. Тим самим підтверджується факт генетичної гетерогенності захворювань з однаковим аутосомно-рецесивним типом успадковування і з однаковим (або дуже подібним) фенотипом. У випадку альбінізму генетична гетерогенність хвороби доказана біохімічними дослідженнями.

Упровадження в практику досліджень клітинних культур, методів гібридизації клітин, виділення ДНК, специфічних молекулярногенетичних методів разом з іншими підходами призвели до істотного прогресу в з'ясуванні молекулярних основ спадкових хвороб та їх гетерогенності.

Встановлено, що спадкові порушення структури і функції окремих ферментів — так звані ензимопатії — явище досить нечасте і що для різних ферментів частота генетичних дефектів є різною. Однак, в цілому ензимопатії складають значну долю моногенних спадкових аномалій. За сучасними підрахунками, в організмі людини повинно діяти близько 10 000 різних ферментів. На сьогодні спадкові дефекти виявлено приблизно лише для 2—3% білків від їх теоретично можливої кількості.

Розпізнавання спадкової хвороби завжди розпочинається з клінічного дослідження. Наступним є генеалогічний аналіз, який в комплексі з іншими підходами дає змогу визначити тип успадковування і суть біохімічних і генетичних дефектів. Знання особливостей успадковування тієї чи іншої хвороби допомагає визначити її генетичну детермінацію (моногенна, полігенна, аутосомна, Х-зчеплена) і характер експресії мутантного гена (домінантність, рецесивність, кодомінантність тощо).

Аутосомно-домінантний тип успадковування має ту особливість, що ознаки хвороби виявляються не тільки у гомозигот з мутантного гена, але й у гетерозигот. Характерними рисами аутосомно-домінантних форм спадкових аномалій є такі:

1. У більшості випадків патологічна ознака виявляється в кожному поколінні у всіх носіїв мутантного гена. Співвідношення здорових і хворих сибсів у родовах складає приблизно 1:1. Прикладом може бути пельгерівська (Pelger-Huet) аномалія нейтрофілів. Це нешкідливе ураження поліморфноядерних гранулоцитів, за якого замість нормальної множинної сегментації ядер виявляються лише два сегменти. Хроматин виглядає грубим і зморщеним. Частота цієї аномалії складає $1-3 \cdot 10^{-3}$ в центральноевропейських популяціях людей, вона чітко успадковується по регулярному аутосомно-домінантному типу (рис. 17.11).

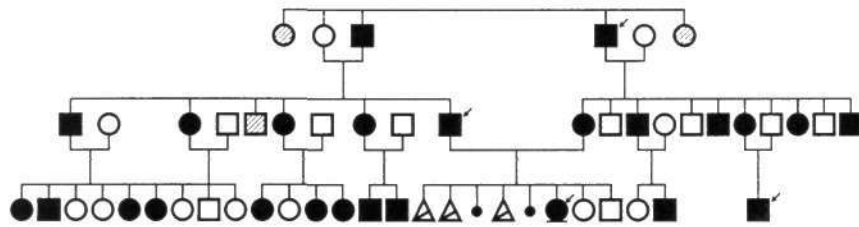


Рис. 17.11. Родовід з дівчинкою, гомозиготною по гену пельгерівської аномалії нейтрофілів:

□ ○ — норма; ■ ● — гетерозигота; ▨ ⊙ — не досліджено; ▩ ◌ — епілепсія; ● — гомозигота; ● — викидні; △ — смерть у ранньому дитинстві

2. Домінантна аномальна ознака не має повної пенетрантності і іноді не виявляється у окремих гетерозиготних носіїв мутації. У випадках неповної пенетрантності іноді одне покоління зовсім не виявляє ознак хворобливості, або кількість уражених сибсів значно менша очікуваної сегрегаційної частоти. Прикладом захворювання з неповною пенетрантністю слугує ретинобластома — злоякісна пухлина очей у дітей, яка в деяких сім'ях може успадковуватись за нерегулярним аутосомно-домінантним типом.

3. Домінантним спадковим ознакам властива різна виразність фенотипових виявів у гетерозигот не тільки в різних сім'ях, але й серед членів однієї сім'ї. Наприклад, у деяких гетерозигот, хворих на множинний нейрофіброматоз, спостерігаються чітко виражені фіброматозні пухлини і «кофейні» плями на шкірі, а у інших, навіть у тій же сім'ї, можна знайти лише плями.

4. В нечастих випадках гомозиготності по домінантному шкідливому алелю всі ознаки хвороби бувають більш виразними, ніж у гетерозигот. Це характерно для α -таласемії, сімейної гіперхолестеринемії та інших хвороб. Механізм дії домінантного гена за сімейної гіперхолестеринемії пояснюється зменшенням кількості рецепторів, які взаємодіють з ліпопротеїнами низької щільності. При цьому виявляються істотні відмінності між ураженими гомозиготами і гетерозиготами: повна відсутність рецепторів у гомозигот і зменшення їх кількості на 50% у гетерозигот. У хворих гомозигот розвивається масивна гіперхолестеринемія, і, як правило, вони помирають від інфаркту міокарда у віці до 30 років.

5. Деякі домінантно-аутосомні хвороби можуть проявлятися навіть через багато років після народження людини. Строки вияву аномального фенотипу дуже коливаються між членами окремих сімей і навіть в одній сім'ї (хорея Гентингтона).

Таким чином, для хвороб з домінантно-аутосомним типом успадкування характерними є пізні вияви (**маніфестація**), **неповна пенетрантність** і **варіююча експресивність** аномальних ознак.

Аутосомно-рецесивний тип успадкування постулюють у тих випадках, коли гетерозиготи фенотипово не відрізняються від нормальних гомозигот. Правда, іноді за допомогою спеціальних методів слабкі відмінності між ними все-таки можна виявити.

В протилежність домінантному успадкуванню, за якого майже всі уражені походять від шлюбів гетерозигот з нормальними (здоровими) партнерами, більшість шлюбів, які призводять до народження дітей з рецесивними хворобами, випадає на фенотипово нормальні гетерозиготи. В потомстві такого шлюбу генотипи *AA*, *Aa* і *aa* будуть представлені у співвідношенні 1:2:1, і вірогідність того, що дитина виявиться хворою, складає 25%. Це означає, що генетичний ризик для кожної наступної дитини є саме таким.

У сучасних малодітних сім'ях виявити рецесивний тип успадкування дуже важко. Допмагають вказівки на кровну спорідненість батьків, а також біохімічні та інші методи дослідження.

Одна із таких хвороб — пігментна ксеродерма — обумовлена нездатністю клітин хворого репарувати ДНК, ушкоджену ультрафіолетовим опроміненням. Внаслідок цього розвивається еритема, особливо на обличчі, з наступною атрофією і телеангіектазіями. Нарешті розвивається рак шкіри. На рис. 17.12 наведено типовий родовід з цією хворобою, в якому батьки є двоюрідними сибсами. Як правило, в подібних випадках батьки успадковують шкідливий ген від спільного предка, і цей ген може не виявлятися протягом декількох поколінь, зберігаючись у носіїв у гетерозиготному стані. Так буває за алкаптонурії, альбінізму, глухонімоти та інших спад-

кових захворювань. На можливість генетичної гетерогенності цих хвороб у різних сім'ях вже вказувалося.

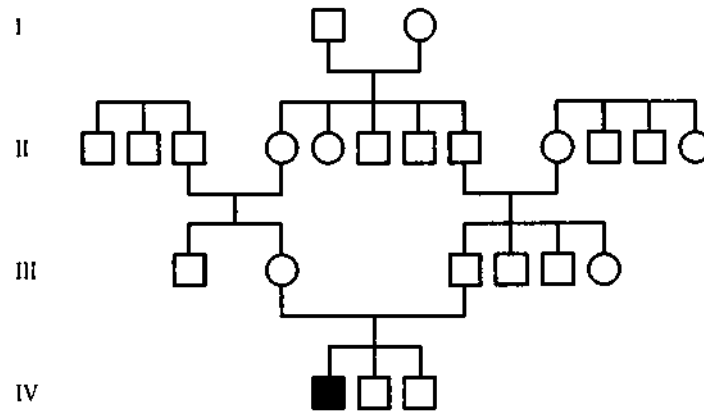


Рис. 17.12. Родовід з поодиноким випадком пігментної ксеродерми за шлюб двоюрідних сибсів.

Іноколи в популяції трапляються шлюби гетерозигот (Aa) і уражених гомозигот (aa). В цьому випадку серед дітей слід очікувати сегрегаційного співвідношення, близького до $1:1$. Оскільки це співвідношення властиве також домінантному успадкуванню, то за наявності рецесивного гена цю ситуацію називають **псевдомінуванням**.

X-зчеплене успадкування має свої особливості в зв'язку з гетерогаметністю чоловічої і гомогаметністю жіночої статі. В цьому випадку є певна залежність вияву аномального фенотипу від статі людини, а також від домінантності чи рецесивності мутантного гена.

У випадку **X-зчепленого рецесивного типу успадкування**, властивого таким розповсюдженим спадковим хворобам, як гемофілія А і В, деяким типам дистрофії м'язів та іншим, гетерозиготи є фенотипово здоровими. Останнє стосується жінок, бо лише їх клітини в нормі несуть дві X-хромосоми. Вияв X-зчепленої рецесивної хвороби у жінки можливий лише за гомозиготного стану (aa) шкідливого гена. Виключення складають жінки з каріотипом $45, X$, у яких мутантний ген знаходиться в гемізиготному стані так само, як і у чоловіків.

Основним джерелом хворих нащадків є шлюб гетерозиготної жінки і здорового чоловіка. В цьому випадку всі дочки будуть фенотипово здоровими, але половина з них є носіями аномального алеля (генотип Aa). Сини гетерозиготних матерів поділяються на ураже-

них і здорових у співвідношенні 1:1. Отже, як правило, за X-зчепленого рецесивного успадкування передача аномального фенотипу здійснюється від ураженого дідуся через фенотипово здорову матір ураженому внукові. Це правило не є абсолютним. Так, наприклад, воно порушується за нечастих шлюбів типу aa (жінка) \times A (чоловік), за яких аномальний фенотип від хворої матері переходить до всіх синів. Оpubліковано дані про кровноспоріднений шлюб гетерозиготної за геном гемофілії жінки і хворого на гемофілію чоловіка (рис. 17.13). Серед дітей цієї сім'ї [шлюб типу Aa (жінка) \times a (чоловік)] хворіли не тільки хлопчики, але й гомозиготні дівчатка, які складала половину всіх дочок, що народилися.

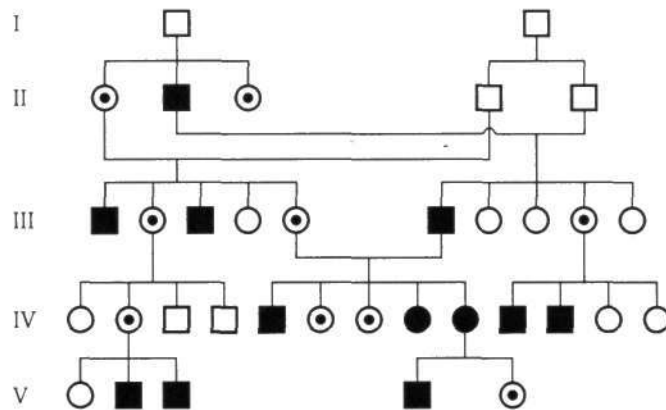


Рис. 17.13. Родовід з двома жінками, гомозиготними по X-зчепленій гемофілії:

Батьки — подвійні двоюрідні сибси

На рис. 17.14 показано знаменитий родовід потомків англійської королеви Вікторії в європейських королівських сім'ях. Одним із хворих на гемофілію був цесаревич Олексій у Росії.

Інше X-зчеплене рецесивне захворювання — це синдром Леша—Наймана — рідкісна аномалія обміну пуринів (дефект ферменту гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази), яка призводить до важкої гіперурикемії, неврологічних негараздів і невгамовного прагнення до самоушкоджень.

Деякі X-зчеплені захворювання є досить розповсюдженими. Найчастіше зустрічаються дефекти кольорового зору, поліморфні варіанти ферменту глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази та інші уроджені аномалії.

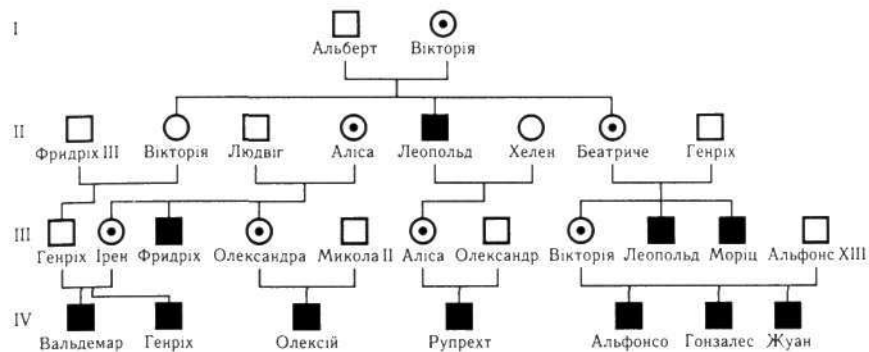


Рис. 17.14. Родовід з X-зчепленою рецесивною гемофілією А в європейських королівських сім'ях:

Королева Вікторія була гетерозиготною. Вона передала мутантний ген багатьом потомкам

X-зчеплений домінантний тип успадкування спостерігається за нечисленних форм патології, наприклад за стійкого до вітаміну D рахіту з гіпофосфатемією, фолікулярного кератозу, деяких форм летальності чоловічих зигот та ін. Аномальний фенотип у цьому випадку виявляється у гемізіготних чоловіків і гетерозиготних жінок.

У випадку, коли мати здорова, а батько хворий, спостерігаються такі особливості успадкування:

1. Всі сини і їх діти — хлопчики — не несуть аномальних ознак, оскільки від батька вони не отримують X-хромосоми.

2. Всі дочки уражених батьків будуть облігатними гетерозиготами і фенотипово хворими. Серед дітей гетерозиготних матерів спостерігається сегрегаційне відношення 1:1 незалежно від статі дитини, як це буває і за аутосомного домінантного типу успадкування.

3. Якщо уражені індивіди мають нормальну репродуктивну здатність, то в популяції хворі жінки зустрічаються приблизно в два рази частіше, ніж хворі чоловічої статі.

Більш важкий перебіг хвороби властивий чоловікам, бо у них відсутня компенсуюча дія нормального алеля в зв'язку з гемізіготністю генів X-хромосоми. Тому існують родоводи, в яких немає синів чоловічої статі, оскільки вони можуть гинути на стадії ембріонального розвитку. В таких родоводах сини представлені тільки жінками, з яких половина є хворими, а в анамнезі можна відзначити аборти і мертвонародження плодів чоловічої статі. Саме такий родовід описаний для хвороби, відомої під назвою Блоха—Сульцбергера (пігментний дерматоз), що супроводжується везикулярни-

ми ураженнями шкіри і появою «мармурових» плям (рис. 17.15). Іноді цей синдром поєднується з аномаліями зубів.

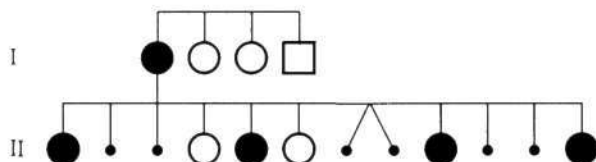


Рис. 17.15. Родовід з пігментним дерматозом:

● — пігментний дерматоз; ♦ — спонтанний аборт (викидень)

Існуючі статистичні дані підтверджують гіпотезу про Х-зчеплене домінантне успадкування за летальності чоловічих гемізігот. До цієї ж групи відносяться такі хвороби, як деякі виродливості рота і язика, медіанна заяча губа, особливий тип синдактилії, осередкова гіпоплазія шкіри, плямиста хондродисплазія, недостатність орнітинтранскарбамілази (летальна для новонароджених хлопчиків) та ін.

Y-зчеплений (або голандричний) тип успадкування характеризується передачею ознаки від батька сином. Класичними прикладами голандричних ознак вважалися важкі форми іхтіозу, волосистість вушних раковин та інші аномалії фенотипу. В останні роки виникли певні сумніви щодо однозначної залежності цих ознак від Y-хромосоми. Цілком можливо, що більшість «голандричних» ознак мають мультифакторіальну природу з обмеженням за статтю.

В протилежність цьому, детермінація Y-хромосоною H-Y-антигена не викликає сумніву. Як відомо, він вважається одним із факторів статевої диференціації, а саме — чоловічих гонад. H-Y-антиген експресується в усіх клітинах чоловічого організму, але тільки гонадні клітини мають H-Y-рецептор, що зв'язує цей антиген. Генетична здатність до синтезу H-Y-антигена в нормі успадковується разом з хромосоною Y, тобто голандрично.

Цитоплазматичний тип успадкування деяких хвороб у людини був виявлений на підставі аналізу родовидів і з'ясування структури мтДНК. Всі ці хвороби успадковуються по материнській лінії. Серед них — хвороба Лебера (спадкова атрофія зорового нерва), деякі порушення функцій мускулатури, мозку, серця, ендокринних залоз, які є наслідком недостатньо активної функції мітохондрій. Матері — носії спадкових цитоплазматичних хвороб, як правило, виявляють гетероплазмію, і їх клітини містять як мутантні, так і нормальні плазмогени. Тому їх потомки можуть виявляти розщеп-

лення і бути як хворими, так і здоровими. Існує думка, що процеси старіння значною мірою визначаються мутуванням мтДНК, в першу чергу в клітинах мозку і серця.

Хромосомні хвороби

Цей тип спадкових хвороб пояснюється змінами кількості хромосомних наборів, а також кількості і будови окремих хромосом (розділ 11.6).

Синдроми, що пов'язані з аномаліями кількості та структури хромосом, можуть бути викликані різними чинниками: поліплоїдизацією, нерозходженням хромосом у мейозі чи в мітозі на ранніх стадіях розвитку, втратою окремої хромосоми внаслідок «анафазного відставання» і, нарешті, хромосомними перебудовами.

Загальна поліплоїдія у живонароджених буває дуже рідко. Виявлена лише триплоїдія, за якої чисельність хромосом дорівнює $3n = 69$. У більшості випадків поліплоїдія не сумісна з життям, і такі зиготи гинуть на ранніх етапах розвитку. Набагато частіше зустрічається анеуплоїдія. Соматичне нерозходження хромосом у клітинах на ранніх стадіях розвитку може призводити до мозаїцизму з наявністю клонів нормальних клітин, трисоміків і моносоміків. Відомі хромосомні хвороби, що супроводжуються мозаїцизмом з двома популяціями клітин — еуплоїдними і трисомними — майже в рівних співвідношеннях.

Найбільш частою хромосомною патологією є **синдром Дауна** (рис. 17.16), який виявляється з частотою 1—2 на 1000 новонароджених. Хворі із зазначеним синдромом мають додаткову хромосому або у вигляді регулярної трисомії 21, або у формі транслокації, утвореної хромосомами 21 і іншою хромосомою (найчастіше 22, 13, 14, 15). Спостереження різних випадків реципрокної транслокації приводять до висновку, що саме дистальний район довгого плеча хромосоми 21 (сегмент 21q22) відповідальний у випадку його трисомії за виникнення характерного фенотипу.

Хворим з синдромом Дауна властивий характерний вираз обличчя, розумова відсталість, вкорочений строк життя, збільшена час-



Рис. 17.16. Зовнішній вигляд дитини раннього дошкільного віку з хворобою Дауна (трисомія 21) (за М. П. Бочковим, О. Ф. Захаровим та В. І. Івановим)

тота уроджених пороків серця і крупних судин, дуже висока чутливість до інфекційних хвороб через дефект імунної системи тощо. Чоловіки із синдромом Дауна безплідні, однак є дані про хворих жінок, у яких були діти. За статистикою, частота новонароджених з синдромом Дауна зростає з віком матері. 20—40% таких дітей народжується у матерів віком за 40 років, хоч останні складають не більше 2—3% усіх жінок дітородного віку.

Інші відомі захворювання, пов'язані з трисомією аутосом, — це трисомія по хромосомах 13 і 18 (рис. 17.17). Трисомія 13 (**синдром Патау**) супроводжується розумовою відсталістю, затримкою росту, глухотою, пороками серця, мікроцефалією, деформацією кінцівок та внутрішніх органів, рядом інших дефектів.

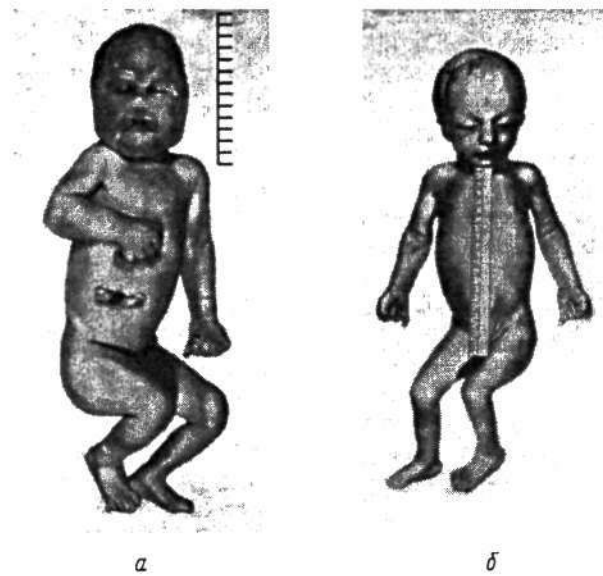


Рис. 17.17. Зовнішній вигляд померлих дітей грудного віку з синдромом Патау (а) і з синдромом Едвардса (б) (за М. П. Бочковим, О. Ф. Захаровим та В. І. Івановим)

Трисомія 18 (**синдром Едвардса**) у новонароджених фенотипово проявляється рядом аномалій, серед яких є доліхоцефалія, відкриті шви черепа, м'язевий гіпертонус, дефект міжшлуночкової перегородки, розумова відсталість, затримка росту та інші.

Спроба знайти нові синдроми аутосомних трисомій довгий час були марними, на підставі чого було зроблено загально вірний вис-

новок про те, що вони летальні. Відкриття трьох нових синдромів — трисомій 8, 9 і 22 — стало можливим після розробки методів диференційного забарвлення хромосом. Ці дуже нечасті хромосомні аномалії спричиняють важкі і комплексні пороки розвитку. Не дивно, що трисоміям по хромосомі 22, які нечасто зустрічаються у новонароджених ($1-2 \cdot 10^{-5}$), властива висока частота серед спонтанних викиднів. Новонароджені з подібними синдромами живуть дуже недовго.

Іноді зустрічаються і моносоміки по аутосомах 21 і 22. Найчастіше — це мозаїчні організми із значною долею нормальних клітин.

Моносомія всього організму відома для X-хромосоми (синдром Шершевського—Тернера). Індивід XO — це жінки з порушенням розвитку первинних і вторинних статевих ознак, низькі на зріст, з численними пігментними плямами, ознаками гормонального дисбалансу та ін. (рис. 17.18). Анеуплоїдія XO у людини зустрічається значно рідше, ніж деякі X-хромосомні полісомії.

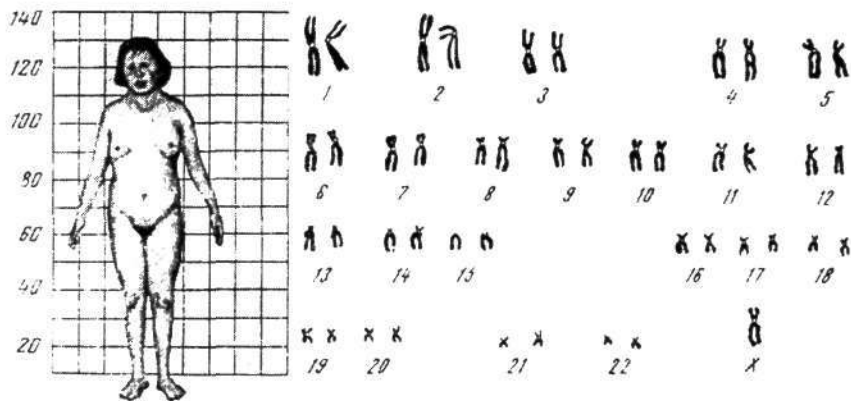


Рис. 17.18. Синдром Тернера (за М. П. Дубініним)

Частота найбільш розповсюдженого варіанта X-полісомії, тобто X-трисомії (47, XXX), враховуючи випадки мозаїцизму (46, XX/47, XXX), складає $1,3 \cdot 10^{-3}$. У більшості жінок з каріотипом 47, XXX спостерігається звичайний фенотип і дітородна функція, однак деякі жінки з X-трисомією виявляють ті чи інші психічні відхилення від норми, а також порушення функцій статевої системи (вторинна аменорея, дисменорея, рання менопауза і т. ін.). Ризик вияву хромосомних порушень у нащадків таких жінок є досить високим, однак він значно менший теоретично розрахованого.

Із збільшенням кількості Х-хромосом у клітинах хворих частота і ступінь відхилень від норми зростають, однак жінки з Х-тетрасомією можуть мати дітей. Із відхилень від норми у жінок Х-тетра- і Х-пентасоміків можуть виявлятися розумова неповноцінність, черепно-лицеві дисморфії, аномалії зубів, відхилення в системі статевих органів і т. ін.

Випадки дисомій і полісомій по Х-хромосомах за наявності у наборі хоча б однієї хромосоми Y об'єднують під назвою **синдром Клайнфельтера** (рис. 17.19). Типовий і найбільш частий варіант цього синдрому спостерігається у індивідів із хромосомним набором 47, XXУ. Проте зустрічаються хворі з більшою кількістю Х-хромосом і лише однією Y-хромосоною. Відомо біля 100 випадків каріотипу 49, XXXУ. Наявність Y-хромосоми в подібних випадках визначає чоловічу стать хворого, і до періоду статевого дозрівання хлопчики з аномальною кількістю Х-хромосом фенотипово майже не відрізняються від своїх нормальних ровесників. Генетичний дис-

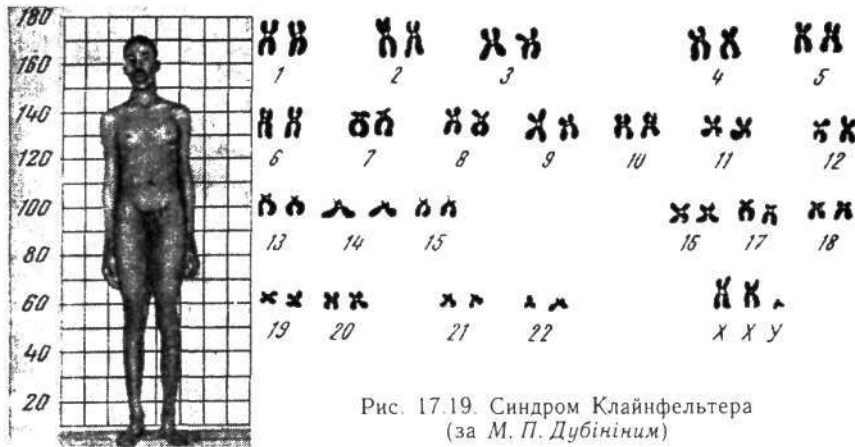


Рис. 17.19. Синдром Клайнфельтера
(за М. П. Дубініним)

баланс привносить зайвими Х-хромосомами в період статевого дозрівання; його наслідком є недорозвиток чоловічих статевих ознак. Гіпонадизм (недорозвиток яєчок) призводить до аномальних статевих ознак. Високі на зріст хворі мають жіночий тип будови скелета і тіла, гінекомастію, дуже часто розумово відсталі. Ступінь виразності всіх відхилень пропорційна кількості додаткових Х-хромосом у хворого.

До іншої цитогенетичної групи відносять хворих з виявами **YY-синдрому**, коли одна Х-хромосома в клітинах чоловіків поєднується з двома або більшою кількістю Y-хромосом. Більшість

Y-дисомії (47, XYY) виявляється випадково, оскільки фенотипово це чоловіки з нормальним фізичним і розумовим розвитком, високого зросту. Однак у дітей від батьків з цим синдромом часто спостерігаються ті чи інші хромосомні аномалії, а також підвищена частота пренатальної летальності. Деяка схильність чоловіків з Y-дисомією до антисоціальної поведінки пояснюється, можливо, гормональними негараздами.

Індивіди з полісомією одночасно по X- і Y-хромосомах (48, XXYY; 49, XXXYY) зустрічаються рідко. Їм властиві гіпогонадизм, значне зниження інтелекту, агресивність поведінки і т. ін.

Відомі також часткові X-трисомії і Y-дисомії, що виникають внаслідок таких подій:

1) X-аутосомних або Y-аутосомних реципрокних транслокацій, що привносять у зиготу надлишок X- або Y-хромосомного матеріалу;

2) незбалансованих X-X, X-Y або Y-Y транслокацій;

3) виникнення ізохромосом по одному із плечей статевої хромосоми і утворення трисомії відповідного плеча.

За структурних перебудов X-хромосоми трисомія по будь-якому її району переноситься без помітних наслідків, бо саме структурно змінені X-хромосоми в першу чергу генетично інактивуються. Ізохромосоми X і Y, як і дицентричні хромосоми, в одних клітинах тіла часто поєднуються з повними X-моносоміями в інших клітинах організму: фенотип хворих у цих випадках визначається X-моносомією.

Найбільш важливі кількісні і структурні аномалії статевих хромосом наведені в табл. 17.4.

Слід зазначити, що часткові трисомії і пов'язані з ними моносомії описані і для аутосом. Часткові моносомії аутосом виникають внаслідок делецій (рідше транслокацій), що охоплюють певні райони того чи іншого плеча хромосоми.

У 1965 році вперше була описана досить часта у живонароджених (1 : 100 000) моносомія по короткому плечу хромосоми 4, відома під назвою **синдром Вольфа—Хиршхорна**. Розміри делецій короткого плеча дуже різноманітні, проте критичним районом, втрата якого визначає основний комплекс аномалій розвитку, вважають дистальний сегмент (p16).

У людини важка спадкова хвороба — **синдром котячого крику (cri-du-chat)** обумовлена гетерозиготністю по дефіценсі в 5-й хромосомі. Новонароджені з таким синдромом легко розпізнаються із-за характерного крику («крик кішки») і в більшості рано гинуть. Синдром характеризується також мікроцефалією (малим розміром голови), виразним порушенням росту і дуже уповільненим розумовим розвитком: коефіцієнт інтелектуальності (IQ) у дітей з цим синдромом коливається від 20 до 40. Вперше хвора дитина з за-

Таблиця 17.4

Кількісні і структурні анеуплоїдії по статевих хромосомах у людини

Каріотип	Фенотип	Частота
XXY	Синдром Клайнфельтера	1/700 чоловіків
XXXY	Варіант синдрому Клайнфельтера	1/2500 чоловіків
XXXXY	Глибока розумова відсталість, сильний недорозвиток гонад та ін.	Дуже рідко
XXX	Іноді легка форма олигофренії, непостійні порушення функції гонад	1/1000 жінок
XXXX XXXXX	Фізично нормальні, важка розумова відсталість	Рідко
Мозаїки XXY/XY XXY/XX	Нагадує синдром Клайнфельтера, іноді з менш виразними симптомами	5—15% від усіх хворих із синдромом Клайнфельтера
Мозаїки XXX/XX	Співпадає з XXX	Рідко
XO	Синдром Тернера	≈ 1/2500 жінок за народження
Мозаїки XO/XX XO/XXX	Різні ступені прояву синдрому Тернера	Нерідко
Різні структурні аномалії X-хромосоми	Залежно від суті та локалізації аномалій, статі індивіда та ін.	Нерідко
XYY	Високий зріст, іноді аномалія поведінки	1/800 чоловіків
XXYY	Високий зріст, в іншому нагадує синдром Клайнфельтера	Рідко

значеним синдромом була описана в 1963 р.; зараз відомо, що частота всіх хворих дітей серед новонароджених складає 1:40 000—1:50 000.

Делеції типу дефішенсі відомі і для інших хромосом людини, деякі з них несумісні з життям, інші спричиняють тієї чи іншої важкості вродливості.

Хвороби із спадковою схильністю

Моногенним хворобам із спадковою схильністю властива та особливість, що схильність до хвороби визначається мутацією

одного гена, але для експресії цього шкідливого гена необхідна дія зовнішньосередовищного фактора, який, як правило, добре відомий, і для даної хвороби може вважатися специфічним

Більшість хвороб із спадковою схильністю є полігенними. Такі хвороби визначаються множинністю генів, кожен з яких є скоріше нормальним, ніж патологічним. Ідентифікація цих генів дуже утруднена, свої хвороботворні вияви вони здійснюють у взаємодії з цілим комплексом чинників зовнішнього середовища. Таким чином, названа група хвороб може вважатися мультифакторіальними, причому відносна роль генетичних і середовищних факторів може бути різною не тільки для окремої хвороби, але й для кожного хворого.

Мультифакторіальні хвороби складають до 90% хронічних неінфекційних хвороб людини, їх генетичний аналіз по з'ясуванню ролі окремих генів і чинників середовища являє собою дуже важке і на сьогодні ще мало вирішене завдання.

Для моногенно обумовлених хвороб, як і для нормальних ознак, характерною є альтернативність фенотипового виразу. Кількісний розподіл такої ознаки серед хворих і здорових людей виглядає як два окремих розподіли, що частково перекриваються (рис. 17.20). Такий тип розподілу називається бімодальним. Саме альтернативність прояву ознаки або хвороби дає можливість аналізувати подібні випадки за простими менделівськими закономірностями.

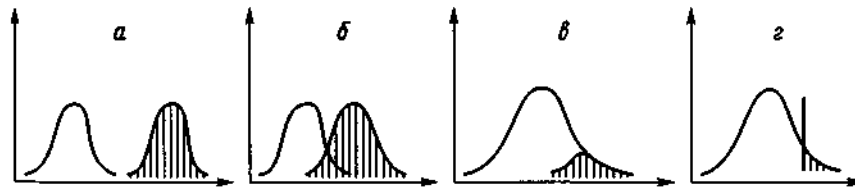


Рис 17.20 Розподіл індивідів у популяції за ознаками, які визначаються моногенно (а—б, альтернативний вигляд) або полігенно (в—г)

Альтернативна ознака має бімодальний розподіл (а) або розподіл, що перекривається (б). Розподіл за ознаками, що визначаються полігенно: аддитивна взаємодія генів без порогового (в) і з пороговим (г) ефектом.

Полігенні ознаки, а саме з ними приходиться мати справу за мультифакторіальних хвороб, характеризуються неперервним рядом значень від здорових людей до важко хворих; між тими і другими існує спектр перехідних форм. Численні матеріали генеалогічного і близнюкового аналізів, накопичені за роки вивчення хвороб із спадковою схильністю, переконливо свідчать про важливу роль спадковості в розвитку цих хвороб, дають можливість співставити

питому вагу генетичних і середовищних чинників в етіології і патогенезі хвороби. Певних успіхів у вирішенні цих та інших питань вдалося досягти завдяки використанню в генетиці людини сучасних цитологічних та молекулярнобіологічних методів, які підняли дослідження генетичного поліморфізму людських популяцій і генетичної гетерогенності спадкових хвороб на якісно новий рівень.

17.6.3. Генетичний поліморфізм і патологія

На прикладах локусів систем груп крові, головного комплексу генів гістосумісності (МНС) та інших вже демонструвався високий поліморфізм геному людини. Г. Харріс та інші дослідники показали, що принаймні третина структурних генів ферментів крові є поліморфними. Теоретично можливо, що у людини є тисячі поліморфних систем, але поки що їх виявлено значно менше — десь близько 200.

В останні роки виявляється все більше випадків поліморфізму ДНК по сайтах рестрикції, що відкриває нові можливості в картуванні геному. Встановлення тісного зчеплення з рестрикційними маркерами дало можливість локалізувати гени багатьох спадкових хвороб у конкретних сегментах хромосом. На рис. 17.21 показано родовід із хореею Гентингтона і зчепність домінантного гена цієї хвороби з одним із варіантів поліморфного сайту рестрикції (хромосома 4).

Такі тісні зчеплення певних алелей різних локусів поміж собою або із певними сайтами рестрикції дуже допомагають у справі діагностики і прогнозу захворювань. Слід зазначити, що для вирішення завдань медико-генетичного консультування і пренатальної діагностики достатньо одного маркера, тісно зчепленого з геном даної спадкової хвороби.

Із збільшенням кількості відомих локусів рестрикційного поліморфізму стає дуже важливим аналіз зчеплення і асоціацій не тільки між двома маркерами (наприклад, один із них — ген захворювання, а другий — рестрикційний маркер), але й між геном хвороби і цілим набором більш або менш зчеплених маркерів — гаплотипом. Визначення гаплотипів широко використовується для генетичного консультування і пренатальної діагностики таласемії та інших спадкових хвороб у представників окремих родинних кланів.

Необхідно розрізнити терміни «зчеплення» та «асоціація». Термін «асоціація» використовується в тих випадках, коли за конкретної хвороби (або ознаки) в популяції або родоводі спостерігається більш висока, ніж теоретично очікувана, частота певного гена-маркера. При цьому зовсім необов'язково, щоб ген хвороби і маркер-

ний ген були зчепленими, тобто відносилися до однієї хромосоми, хоч це і не виключається.

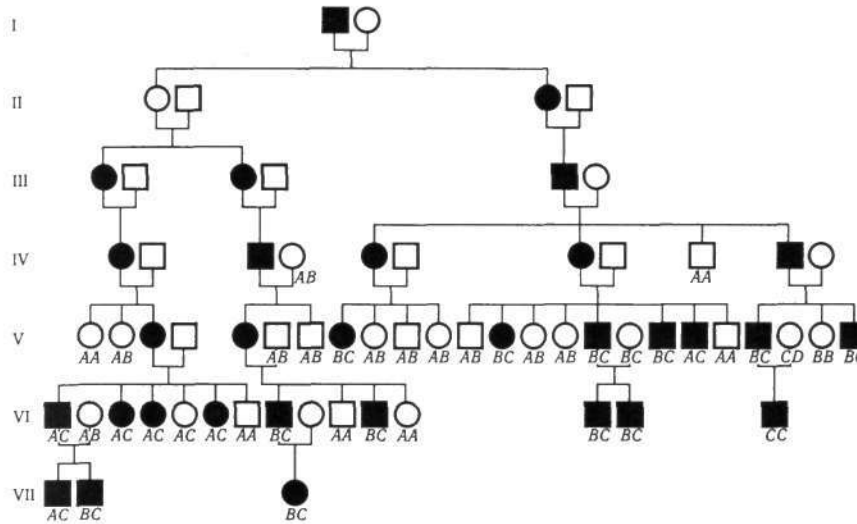


Рис. 17.21. Великий родовід із Венесуели з хворобою Гентингтона:

A, B, C — три різних «алелі» поліморфного ДНК-маркера. Ген хвороби Гентингтона передається разом з алелем C

Встановлення тих чи інших асоціацій дуже допомагає в діагностиці та прогнозуванні спадкових хвороб, особливо мультифакторіальних, яким властива спадкова схильність.

Асоціація захворювань з групами крові

Відкриття Rh-несумісності матері і плода було першим доказом певного зв'язку між групами крові і хворобою. Через деякий час такий зв'язок було виявлено і для інших розповсюджених захворювань. В 1953 році описана асоціація між групою крові A і раком шлунку; через деякий час з'ясувалося, що є ще декілька злоякісних пухлин, які частіше виявляються у людей з групою крові A. Така ж тенденція була виявлена і для інших хвороб — ревматизму, перніціозної анемії і — в дуже значному ступені — для тромботичних і тромбоемболічних захворювань. З іншого боку, виявлена асоціація виразкової хвороби дванадцятипалої кишки з групою крові O. Є дані, що концентрація алелей I^A і i^o у популяціях певним чином впливає на чутливість генотипів до інфекційних хвороб. Існує припущення,

що зменшення концентрації алеля i^0 в деяких популяціях людей пов'язане з розповсюдженням у минулому чуми, а зменшення концентрації I^A пояснюють епідеміями віспи, яка елімінує в першу чергу носіїв антигена А. Заслужують уваги дані про те, що серед здорових стариків віком понад 70 років переважають люди з генотипом i^0i^0 .

Таким чином, є підстави вважати, що антигени груп крові АВО вносять певний вклад у схильність людини до конкретних хвороб. Однак, подібні асоціації дуже слабкі і не завжди можуть бути виявлені.

Крім асоціацій деяких захворювань з розповсюдженими групами крові системи АВО чи Rh, відомі приклади спадкових аномалій, пов'язаних з генами антигенів крові, що рідко зустрічаються в популяціях, або з генами-модифікаторами цих генів. Є гени-модифікатори системи груп крові АВО, вони досліджені краще інших і не впливають істотно на здоров'я своїх носіїв.

Прикладом прямої асоціації між алелями нечастої групи крові і захворюванням може бути система групи крові Kell, антигени якої містяться в структурі клітинних мембран. В популяціях європейців виявлено два алелі аутосомного локуса Kell — K і k, із яких K зустрічається рідше. Неграм властивий алель J_s , який майже не зустрічається в інших популяціях і слугує гарним маркером для людей африканського походження. Гемолітична анемія новонароджених рідко викликається анти-Kell-антитілами, а коли це трапляється, то це нагадує резус-конфлікт.

Крім аутосомного локуса антигена Kell, існує X-зчеплений локус, який кодує речовину — попередника Kell, відому як K_x . В нормі всі люди містять антиген K_x в мембранах еритроцитів і лейкоцитів. У випадку X-зчепленої рецесивної мутації, що обумовлює відсутність K_x -антигенної детермінанти, виникає так званий маклеодівський фенотип еритроцитів: аномалія мембрани еритроцита призводить до акантоцитозу («колючі» еритроцити) і до їх руйнування. Тяжкість гемолізу може бути різною — аж до важкої гемолітичної анемії. Оскільки мова йде про X-зчеплену рецесивну ознаку, то маклеодівський фенотип виявляється тільки у чоловіків.

Система HLA і захворювання

Першою аномалією у людини, для якої була встановлена асоціація з комплексом HLA, була хвороба Ходжкіна — злоякісне новоутворення лімфатичної системи. Цій хворобі властивий значний рівень асоціації з алелем HLA-A₁. Ще більш сильні асоціації було знайдено для деяких незлоякісних захворювань, а саме анкілозуючого спондиліту, спру, множинного склерозу і псоріазу. Всі хворі

анкілозуючим спондилітом мали антиген HLA-B₂₇, а у багатьох зовні здорових носіїв цього антигену ретельне клінічне обстеження дало змогу виявити ознаки легкої форми захворювання. Множинний склероз і лепроматозна проказа асоціюють з HLA-B₇. Є дані, що носії антигену B₇ мають ослаблену імунну реакцію: їх Т-лімфоцити вимагають більше часу, щоб відповісти на певні антигенні стимули. В зв'язку з цим існує думка, що множинний склероз та деякі інші хвороби можуть викликатися повільною вірусною інфекцією, яка в першу чергу уражує осіб з аномальною імунною відповіддю.

Гени деяких чисто моногенних спадкових хвороб тісно зчеплені з комплексом HLA. Прикладами можуть бути ген недостатності 21-гідроксилази, який у гомозиготному стані призводить до уродженої гіперплазії наднирників, а також гени однієї із форм спиноцеребелярної атаксії і гемохроматозу (хвороба накопичення заліза, яка успадковується як аутосомно-рецесивна ознака).

З іншого боку, є хвороби, асоційовані з алелями HLA-комплексу, які не є моногенними і мають мультифакторіальну природу. Для багатьох таких захворювань (хронічний гепатит, міастенія гравіс, ревматоїдний артрит, тиреотоксикоз, юнацька форма цукрового діабету, множинний склероз та ін.) виявлено асоціації з D/DR-антигенами HLA-системи. Характерною рисою всіх цих хвороб є наявність аутоантитіл, чому вони класифікуються як аутоімунні або як імунноасоційовані хвороби.

Індивіди з певними D/DR-алелями HLA-комплексу більш здатні до утворення антитіл, ніж ті, у яких такі гени відсутні. Тому існує гіпотеза, що вищезгадані асоціації обумовлені або гіпотетичними генами імунної відповіді (I_r), тісно зчепленими з D/DR-алелями, або останні безпосередньо приймають участь у формуванні імунітету.

Органоспецифічні аутоантитіла є причиною різних аутоімунних захворювань. Синтез аутоантитіл певною мірою залежить від стимулів зовнішнього середовища, серед яких найбільш істотні — вірусного походження. Вірусна компонента припускається, наприклад, в синтезі аутоантитіл за цукрового діабету, гепатиту, множинного склерозу та ін. Асоціації цих хвороб з певними алелями HLA-локусів (в першу чергу з D/DR-локусом) і участь цих локусів (разом з багатьма іншими) в імунній відповіді принаймні частково пояснюють генетичну схильність до аутоімунних хвороб.

Поліморфізм α₁-антитрипсину і патологія

Поліморфізм α₁-антитрипсину асоційований у дорослих людей головним чином з однією хворобою — хронічною емфіземою легень, патогенез якої в основному з'ясований.

Із шести антипротеаз, ідентифікованих у сироватці людини, α_1 -антитрипсину і α_2 -макроглобуліну властиві найбільш високі концентрації. Ці білки інгібують чимало протеаз, в тому числі тромбін. Їх концентрація в крові швидко зростає після бактеріальної інфекції, після введення антитифозної вакцини і під час вагітності. Індивідуальні особливості були вперше виявлені в 1963 році. Шляхом електрофоретичного розподілу та ізоелектричного фокусування було ідентифіковано принаймні 23 різних фенотипи. Генетичною основою цієї гетерогенності слугують серії множинних алелів локуса *PI*. Ці алелі позначаються як PI^M , PI^Z і т. д., а фенотипи — як M/M , M/Z і т. п. Найчастіше зустрічаються PI^M алелі (M_1 , M_2 і M_3). Аналіз нуклеотидної послідовності клонованої кДНК показав, що виникнення, наприклад, Z -варіанта алелів обумовлене однічною нуклеотидною заміною. Варіанти Z і S мають особливе значення, бо саме вони визначають істотне зниження рівня α_1 -антитрипсину. За гомозиготного стану іншого, більш рідкого алеля PI -активність зазначеного білка зовсім не виявляється (нульовий алель). Гетерозиготи PI^M/PI продукують приблизно 50% нормальної кількості α_1 -антитрипсину.

Рівень можливої експресії різних алелей *PI*-локуса корелює з частотою виникнення у людей хронічної емфіземи легенів та інших захворювань дихальних шляхів. Встановлено, що введення протитифозної вакцини і диетилстильбестролу призводить до 100% збільшення активності α_1 -антитрипсину у людей з MM -генотипом. Гетерозиготи MZ -типу виявляють лише помірне збільшення, а у гомозигот ZZ зазначена активність взагалі не змінюється. Внаслідок аналізу сімей було з'ясовано, що емфізема легенів у гомозигот ZZ зустрічається в 15 разів частіше, ніж у загальній популяції людей.

Причиною цього, можливо, є те, що протеолітичні ферменти, які інтенсивно вивільняються гранулоцитами і макрофагами за процесів запалення, у гомозигот ZZ недостатньо інактивуються α_1 -антитрипсином. За наявності повторних бронхітів внаслідок, наприклад, паління або частих інфекцій, протеолітичні ферменти можуть викликати автолітичні ушкодження легенів. Отже, ZZ -гомозиготам і гетерозиготам слід утримуватися від паління і уникати виробництв, пов'язаних з подразненням бронхів.

Інша хвороба, яка також асоціює з низьким рівнем α_1 -антитрипсину у гомозигот ZZ , — деякі види цирозу печінки. Щоправда, частота цієї асоціації значно менша, ніж хронічної емфіземи легенів.

Підсумовуючи все сказане про асоціації, слід підкреслити, що групи крові АВО виявляють слабкі асоціації з великою кількістю захворювань. В протилежність цьому, для антигенів системи HLA продемонстровані більш сильні асоціації з меншим числом хвороб.

і в тому, і в іншому випадку механізм асоціації залишається не з'ясованим.

Третій приклад асоціації (між хронічною емфіземою легенів і поліморфізмом α_1 -антитрипсину) є більш зрозумілим з біохімічної точки зору, і є підстави сподіватися, що в найближчий час стане відомим біохімічний механізм і інших асоціацій, які зараз виявлені.

Особливий інтерес являють асоціації між поліморфізмом аполіпопротеїну E і атеросклерозом, деякими хворобами і відчуттям смаку фенілтіосечовини і т. ін.

Подальше накопичення інформації про зчепність генів спадкових хвороб з іншими генетичними маркерами, а також відкриття нових асоціюючих поліморфізмів сприятиме розробці нових методів діагностики, прогнозу і профілактики захворювань серед населення.

Спадково обумовлені реакції людини на дію зовнішніх факторів

Численні варіації ферментних систем, рецепторів клітин, їх антигенної будови і т. ін. обумовлюють індивідуальні особливості реакцій людини на ті чи інші хімічні речовини, біологічні агенти або фізичні чинники. Розділ генетики, що з'ясовує генетичну залежність чутливості організму до факторів зовнішнього середовища, отримав назву **екогенетики**.

В наші дні проблеми екогенетики стають все більш актуальними в зв'язку з тим, що навколишнє середовище все інтенсивніше забруднюється хімічними та фізичними чинниками, з якими люди не зустрічались або майже не зустрічались у процесі еволюції (ксенобіотики, радіонукліди, електромагнітні перенавантаження тощо). Сьогодні чітко визначились основні напрямки екогенетики. З'ясувалося, що спадкові відмінності можуть виявлятися у реакціях на окремі ліки, фізичні фактори, продукти харчування і особливо харчові добавки, забруднення води і атмосфери, професійні шкідливості тощо. Одним із важливих завдань екогенетики є скринінг зовнішніх чинників на їх здатність викликати аномальні спадково обумовлені реакції. Такі дослідження створюють наукову основу для обґрунтування критеріїв професійного відбору, виключення можливих отруєнь лікарськими препаратами, розробки індивідуальних дієт для хворих і т. ін.

Основи екогенетики були закладені в середині ХХ століття, коли вперше були виявлені спадково обумовлені патологічні відхилення в реакціях окремих людей на ліки. З'ясувалося, що ці відхилення обумовлюються недостатністю певних ферментів. Дослідження генетичних механізмів спадкових відмінностей в реакціях на ліки є

основною метою **фармакогенетики** — наукового напрямку, що є складовою екологічної генетики.

Генетичні особливості реакції людини на дію факторів зовнішнього середовища можуть бути виявлені генеалогічним (родинним), близнюковим або популяційно-статистичним аналізом. Ці методи доповнюють один одного у вияві нових екогенетичних варіацій. Крім того, вони доповнюються необхідними біохімічними, молекулярногенетичними, токсикологічними і фармакологічними дослідженнями.

Популяційногенетичний підхід дає можливість встановити, однозначна чи неоднозначна реакція людей на фактори зовнішнього середовища, визначається ця реакція однаковими алелями генів, чи різними. Характер розподілу індивідів по їх реакції на зовнішній фактор може вказувати на моногенну чи полігенну природу реакції. Криві розподілу можуть бути з однією модою або з декількома, якщо в популяції є індивіди з аномальною реакцією і кількість таких індивідів відносно велика.

Про генетичну обумовленість реакцій на зовнішні чинники свідчать відмінності серед різних етнічних груп, що проживають в однакових умовах.

Дані фармакогенетики вже використовуються в медицині для визначення лікарської толерантності і підвищеної чутливості у окремих хворих. Це сприяє індивідуалізації лікувальних заходів. Відомо значна варіабельність ефективності і побічної дії ліків серед різних груп населення і окремих осіб.

Доля сторонньої хімічної сполуки в організмі визначається ефективністю її біотрансформації — швидкістю проникнення крізь мембрани, взаємодії з рецепторами, метаболізму та виведення із організму. Всі ці та інші фармакокінетичні процеси здійснюються за допомогою білків, в першу чергу ферментів, які контролюються генами. В зв'язку з тим, що у людини принаймні по 1/3 білків і ферментів існує збалансований поліморфізм, спостерігаються різнотипні реакції окремих індивідів на лікарські та інші хімічні сполуки. Встановлено, що доля більшості хіміопрепаратів обумовлюється функцією декількох взаємодіючих генів, завдяки чому криві розподілу індивідів по концентрації хімічних сполук у крові після введення стандартних доз цих сполук в організм відповідають кривим полігенного успадкування. Дійсно, такі реакції, як ефективність дії лікарської речовини, швидкість її виведення із організму та інші в більшості випадків бувають мономодальними (рис. 17.22).

Однак, бувають реакції іншого типу. Як видно з рис. 17.23, крива розподілу індивідів у залежності від концентрації в плазмі ізоніазиду через 6 годин після його перорального введення має бімо-

дальний характер. Наявність двох піків на кривих розподілу свідчить про аномальну реакцію певної групи людей на хімічну сполуку. В наведеному прикладі з ізоніазидом біохімічна сутність відмінностей полягає в різній швидкості його ацетилювання, що визначається поліморфністю відповідного генного локуса.

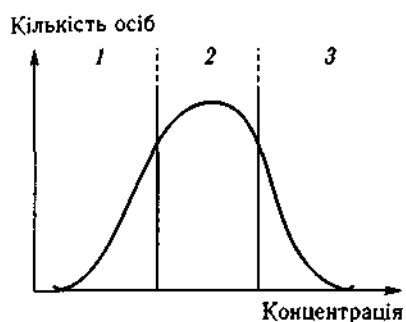


Рис. 17.22. Розподіл індивідів за концентрацією хіміопрепарату в плазмі після введення стандартної дози:

1 — відсутність ефекту від хіміопрепарату; 2 — оптимальний ефект; 3 — токсичний ефект

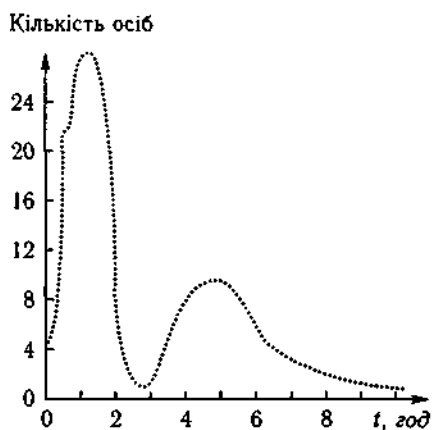


Рис. 17.23. Розподіл індивідів за швидкістю ацетилювання ізоніазиду

Сьогодні відомо чимало мутацій, які обумовлюють аномальні реакції на лікарські речовини та інші сполуки. В багатьох випадках з'ясовано типи їх успадковування і первинний біохімічний ефект.

Найбільш досліджена недостатність глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (Г-6-ФДГ) — рецесивна ознака, зчеплена з X-хромосомою. Мутації в локусі Г-6-ФДГ відносяться до серії множинних алелів (їх відомо більше 300), однак до розвитку аномальних реакцій на екзогенні хімічні сполуки призводять не всі. В деяких популяціях, що розташовані на територіях, де була розповсюджена малярія (Африка, Таїланд, Південний Китай, Середня Азія), у значної частини чоловіків (біля 20% серед негрів Африки) виникає гемоліз еритроцитів після прийому деяких ліків (антималярійних препаратів, сульфаніламідів, толуїдинового синього та ін.). У жінок ця реакція виникає рідко — лише за гомозиготності з мутантного гена. У гетерозиготних жінок, в повній відповідності з гіпотезою Лайон, у крові зустрічаються нормальні і аномальні еритроцити в різних співвідношеннях.

Незвичайна реакція на ліки спостерігається за мутацій у різних локусах, а іноді обумовлюється полігенно. Моногенною є недостатність редуктази метгемоглобіну. У гомозигот за цією мутацією мет-

гемоглобінемія розвивається без впливу зовнішніх факторів. Гетерозиготні носії виявляють приблизно 50% активності цього ферменту. У них виникають метгемоглобінемія і ціаноз після вживання примахіну, диафенілсульфону та інших речовин.

У деяких людей спостерігається сильне підвищення внутрішньочинного тиску після закапування очей розчином глюкокортикоїдів. У інших індивідів ці зміни є менш виразними, а у третіх тиск не підвищується зовсім. Реакція підвищення тиску особливо виразна у найближчих родичів хворих на глаукому. Вважають, що ця ознака сильно проявляється у гомозигот і в меншій мірі — у гетерозигот. Імовірність захворювання глаукомою у гетерозигот у 18 разів, а у мутантних гомозигот в 101 раз більша, ніж у гомозигот з нормальним алелем.

Відомий і інший тип фармакогенетичних порушень — уповільнене виведення хіміопрепарату із організму, обумовлене дефектами його метаболізму. В цьому випадку можливий синдром передозування за умови введення в організм нормальної дози сполуки. Прикладом таких мутацій є поліморфізм локуса ацетилтрансферази. Патологічний алель виявляє свою дію за аутосомно рецесивним типом. У гомозиготних рецесивів активність ацетилтрансферази дуже низька, і деякі сполуки, наприклад, протитуберкульозний препарат ізоніазид, дуже повільно виводяться із організму, провокуючи токсичні ускладнення.

Дуже непередбаченими можуть бути реакції на звичайні ліки з боку хворих спадковими хворобами у зв'язку з наявністю у них біохімічних дефектів. Відомо чимало прикладів парадоксальних реакцій у таких людей — від повної відсутності терапевтичного впливу лікарських препаратів до надзвичайної чутливості хворих, що призводить до серйозних ускладнень (кровотечі, паралічі та ін.).

Все зазначене щодо лікарських препаратів у повній мірі відноситься до хімічних забруднень навколишнього середовища, окремих компонентів продуктів харчування і косметики, деяких фізичних факторів і т. п. Мутантний генотип може виявляти парадоксальну реакцію на дію будь якого з цих чинників середовища.

Як уже зазначалося, найбільш дослідженою мутацією, що обумовлює патологічну реакцію на забруднення атмосфери, є недостатність α_1 -антитрипсину. Люди, гомозиготні по мутантному гену, схильні до хронічних запалювальних процесів і емфіземи легень, яка розвивається у них після 30—40 років і має важку форму.

У навколишньому середовищі є чимало вуглеводнів, в тому числі циклічних, які в організмі після гідроксилування (фермент арилгідрокарбонгідроксилаза) утворюють активні епоксиди. Останні є активними канцерогенними сполуками. З'ясовано, що до 30% хво-

рих раком легенів відносяться до групи з високою індукцією зазначеного ферменту, а в загальній популяції людей ця ознака зустрічається дуже рідко. Отже, людям, що мають високий рівень активності арилгідрокарбонгідроксилази в крові не варто палити і слід уникати контакту з вуглеводнями в професійних умовах.

Аномалії і навіть летальні реакції можуть спостерігатися за попадання в організм невеликих доз отрутохімікатів, важких металів, наркотиків і т. п.

Доброякісні харчові продукти теж можуть викликати небажані реакції у генетично уражених індивідів. Одним із прикладів цієї групи генетичних відхилень є непереносність молочного цукру — лактози. Гени непереносності лактози широко розповсюджені серед східних народів (до 95—100%), серед американських негрів і індіців (70—75%). Цей дефект полягає у відсутності синтезу лактази у кишечнику, внаслідок чого лактоза не гідролізується і слугує субстратом для розмноження гнилісної мікрофлори.

Деякі люди не переносять жирної їжі і в ранньому віці хворіють атеросклерозом і інфарктом міокарду. Генетичні дослідження свідчать, що схильність до гіперхолестеринемії є спадковою ознакою. В популяціях східних народів спостерігаються специфічні реакції на етиловий алкоголь — отруєння від малих доз. Вони пояснюються спадковими варіаціями ферментів, що окислюють спирт. Їстинні кінські боби викликають гемоліз у окремих індивідів із спадковою недостатністю Г-6-ФДГ.

Генетична обумовленість реакцій на фізичні фактори середовища (тепло, холод, сонячне опромінення) мало досліджена, проте індивідуальні і расові відмінності цих реакцій добре відомі. Так, наприклад, негри значно чутливіші до холоду, ніж представники кавказької раси. Прикладом генетично обумовленої індивідуальної підвищеної чутливості до ультрафіолетового опромінення є нечаста аутомно-рецесивна хвороба — пігментна ксеродерма (розділ 5.3), за якої уражується репаративна система ДНК.

Мутації в генах ферментів, що є компонентами тих чи інших репаративних систем, слід вважати основним чинником високої чутливості окремих організмів щодо мутагенних і канцерогенних факторів.

ДНК-діагностика генетичного поліморфізму і спадкових захворювань у людини

В основі багатьох швидких і надійних методів діагностики лежить гібридизація нуклеїнових кислот — спаровування двох елементарних сегментів різних молекул ДНК. В цих випадках, як

правило, один із ланцюгів ДНК-мішені, фіксований на мембранному фільтрі, спаровують з міченим одноланцюговим ДНК-зондом, після чого виявляють гібридні молекули зонд/мішень. Дослідники успішно здійснюють гібридизацію з ДНК-мішенями, які знаходяться в зразках калу, сечі, крові, змивах зіву і в тканинах без їх попередньої очистки. Якщо концентрація послідовності-мішені в досліджуваному зразку дуже мала, цю ДНК-послідовність можна ампліфікувати з допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

В останні роки в ролі зондів використовують штучно синтезовані олігонуклеотиди, комплементарні певним послідовностям гена-мішені. Так, для діагностики серповидноклітинної анемії використали два олігонуклеотиди довжиною по 19 п. н.: один був комплементарним нормальному алелю β -глобінового гена (β^A), а другий — мутантному (β^S). ДНК здорової людини ($\beta^A\beta^A$) гібридизувалася тільки з β^A -зондом, ДНК хворого серповидноклітинною анемією ($\beta^S\beta^S$) — тільки з β^S -зондом, а ДНК гетерозиготних людей — з обома зондами.

Можна використовувати зонди, мічені радіоактивними ізотопами (наприклад, ^{32}P), однак більш зручними є нерадіоактивні зонди. У більшості випадків застосовують ДНК-зонди, що містять зв'язаний біотин. До останнього приєднують авідин (білок курячого яйця) або стрептавідин (бактеріальний аналог авідину), які в свою чергу здатні приєднувати до себе лужну фосфатазу та інші ферменти. За успішної гібридизації зонд/мішень в подібних системах відбувається ферментативне перетворення доданого хромогенного або хемілюмінесцентного субстрату з виникненням специфічного забарвлення або проявом хемілюмінесценції в пробі (рис. 17.24).

Якщо за гібридизаційного аналізу використовується ПЛР, то ампліфікований продукт можна помітити флуоресцентним барвником, приєднуючи його до 5'-кінця кожного праймера. В якості барвників часто використовують флуоресцеїн і родамін, які випромінюють відповідно зелене і червоне світло. Якщо ДНК-мішені у пробі немає, то флуоресценції не спостерігається.

Один із недавно розроблених нерадіоактивних методів детекції гібридних молекул зонд/мішень оснований на використанні зонда, який називається «молекулярним маяком». Цей зонд складається із 25 нуклеотидів, із яких 15 середніх є комплементарними до ДНК-мішені і не спаровуються між собою, а по п'ять кінцевих нуклеотидів гібридизуються і утворюють шпильку. До 5'-кінця зонда приєднано флуорофор, а до 3'-кінця — нефлуоресцентний хромофор (гасник). Якщо флуорофор і гасник знаходяться у тісному контакті, то флуоресценція флуорофора гасне. Якщо ж 15 середніх нуклеотидів гібридизуються з комплементарною послідовністю ДНК- або

РНК-мішені, то флуорофор і гасник просторово відокремлюються, і зонд випромінює світло. Мутантні ДНК-мішені не здатні гібридуватися з зондом, і тому навіть одиничні заміни нуклеотидів у гені легко розпізнаються з допомогою «молекулярного маяка».

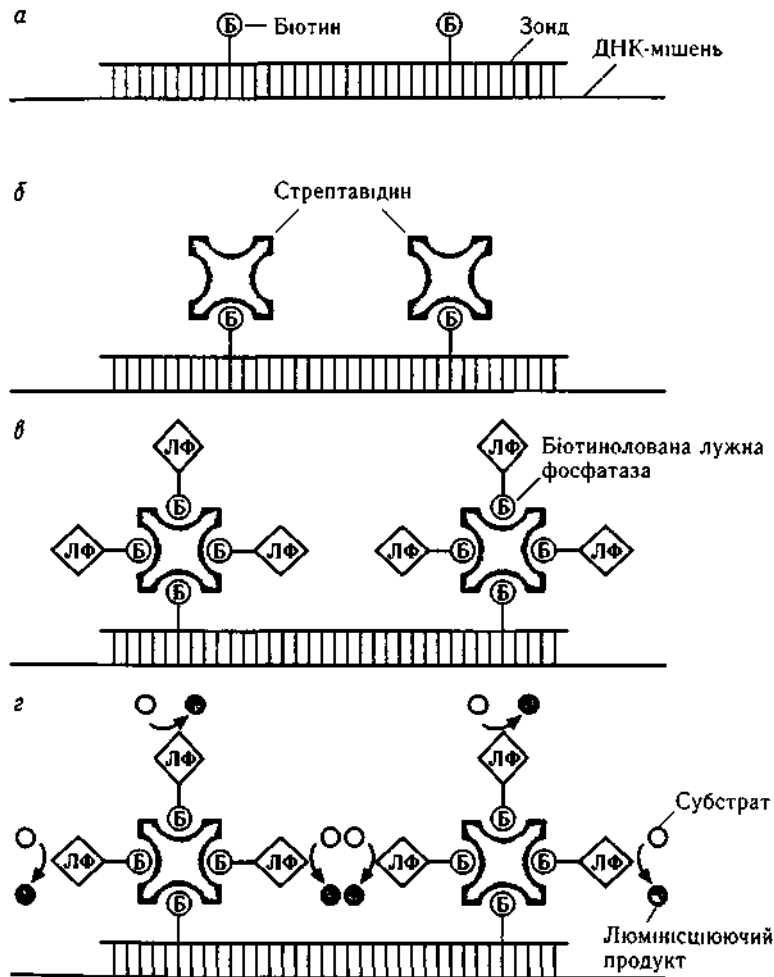


Рис. 17 24. Хемілюмінесцентний метод виявлення ДНК-мішені

a — зв'язування біотинолованого зонда з ДНК-мішенню, *б* — зв'язування стрептавідину з біотином, *в* — зв'язування біотинолованої лужної фосфатази із стрептавідином, *г* — утворення люмінісцючого продукту за дії лужної фосфатази Б — біотин, ЛФ — лужна фосфатаза

Досить часто використовують рестрикційний аналіз, за якого рестрикти ДНК (крові, сперми, шкіри, волосся) гібридизують з мінісателітними ДНК. В цьому випадку відмінності спостерігаються внаслідок збільшення або зменшення кількості мінісателітних тандемних повторів у індивідів. Характер розташування мінісателітних ДНК за Саузерн гібридизації є не менш індивідуальним, ніж відбитки пальців. Згадану **геномну дактилоскопію** застосовують у судовій медицині, а також з метою визначення батьківства. Якщо досліджуваної ДНК кількісно замало, можна ампліфікувати невеликі ділянки мінісателітної ДНК з допомогою ПЛР, а потім провести їх секвенування. Останній метод набагато чутливіший, ніж визначення поліморфізму довжин тандемних повторів.

Крім методів, основаних на гібридизації ДНК, для ДНК-діагностики та ДНК-типуювання використовують і інші досконалі підходи, прикладами яких є методи ПЛР і ЛОЗ (лігування олигонуклеотидних зондів).

Діагностика серповидноклітинної анемії шляхом використання ПЛР полягає в наступному. Заміна одного нуклеотиду в β -глобіновому гені, яка призводить до серповидноклітинної анемії, супроводжується втратою сайту для рестриктази *CvnI*. Використовуючи праймери, фланкуючі сайт *CvnI*, ампліфікують з допомогою ПЛР незначну кількість досліджуваної ДНК. Ампліфікований фрагмент обробляють *CvnI*, рестрикти розділяють гелем електрофорезом і забарвлюють бромистим етидієм. За наявності *CvnI*-сайту на електрофореграмі виявляється специфічний набір смуг, у відсутність сайту рестрикції (хворі люди) кількість зазначених смуг зменшується.

Зазначеним методом можна швидко визначити генетичний статус обстеженого, не проводячи при цьому процедури гібридизації. Однак не всі генетичні порушення, що викликають появу дефектних генів, супроводжуються втратою або зміною сайту рестрикції, і тому для виявлення одонуклеотидних замін застосовують також інші методи. В одному з них поєднуються метод ПЛР і метод лігування олигонуклеотидних зондів (ЛОЗ).

В цьому методі використовують два коротких (20-нуклеотидних) зонди, комплементарних суміжним послідовностям ДНК, які фланкують точкову мутацію. Якщо досліджуваний фрагмент ДНК утримує немутовану послідовність нуклеотидів, то обидва зонди повністю гібридизуються з зазначеною послідовністю, і їх 3' і 5' кінці (розташовані поряд) легко зшиваються лігазою (лігуються). У випадку точкової мутації (наприклад, заміни) кінець одного із зондів не може гібридизуватися з неканонічним нуклеотидом, і лігазна реакція між двома зазначеними зондами стає неможливою.

Маючи дві пари зондів (одну — для нормальної ДНК, другу — для мутантної), можна визначити генетичний статус будь-якої людини. ДНК гетерозиготних носіїв дає позитивну відповідь з обома парами зондів, а ДНК здорових людей та гомозиготних носіїв мутантного гена — тільки з відповідною парою комплементарних зондів. Щоб мінімізувати необхідну для аналізу кількість вихідної ДНК, ділянку ДНК-мішені, яка містить досліджуваний сайт, ампліфікують методом ПЛР. Тому цей підхід отримав назву методу ПЛР/ЛОЗ, він повністю роботизований, що дає можливість проводити до 1200 аналізів за день.

Дуже важливим напрямком сучасної молекулярної генетики є розробка тестів для діагностики генетичної гетерогенності окремих спадкових захворювань. Випадки, коли мутації трапляються в різних сайтах одного гена і це призводить до виникнення однієї і тієї ж спадкової хвороби, досить часті. Прикладом може бути β -таласемія — спадкова хвороба, пов'язана з втратою активності β -глобіну. Індивіди, гомозиготні по одному із (як мінімум) восьми мутантних сайтів, потребують регулярного переливання крові та іншого лікування.

Для скринінгу мутацій, виникаючих у різних сайтах одного гена, розроблена стратегія ПЛР/гібридизація, основана на проведенні однієї реакції. Для цього синтезують набір специфічних 20-нуклеотидних зондів, кожен із яких повністю комплементарний гену-мішені, що несе відому мутацію. До 3'-кінця кожного зонда приєднано гомополімер полі-(dT) довжиною приблизно 400 нуклеотидів, з допомогою якого ДНК-зонд зв'язується з попередньо визначеною точкою на найлоновому фільтрі, а інша частина зонда залишається вільною і може гібридизуватися. Сегменти досліджуваних ДНК, кожен із яких містить по одному із можливих мутантних сайтів, одночасно ампліфікують з допомогою ПЛР, причому один праймер із кожної пари на 5'-кінці утримує біотин. Ампліфіковані фрагменти досліджуваної ДНК-мішені гібридизують із зондами, прищитими до фільтра, за умов, коли гібридизація можлива тільки за повної комплементарності послідовностей. В гібридизаційну суміш додають стрептавідин, зв'язаний з певним ферментом (лужною фосфатазою, пероксидазою хрину, уреазою). Після промивки фільтра додають незабарвлений субстрат ферментативної реакції, яка може відбутися лише за повної комплементарності і гібридизації ампліфікованого фрагмента ДНК-мішені та олігонуклеотидного зонда. У цьому випадку утворюється забарвлений продукт реакції і на фільтрі появляється кольорова точка. На одному фільтрі можна зафіксувати цілий ряд різних специфічних олігонуклеотидних зондів, попередньо позначивши точки їх фіксації. Аналізуючи кольорову мозаїку

точок, що виникає після гібридизації досліджуваних фрагментів ДНК-мішеней і олігонуклеотидних зондів, можна ідентифікувати можливі сайти мутації.

Заключаючи, слід зазначити, що в цілому існує два типи молекулярної діагностики генетичного поліморфізму. Один із них оснований на вивченні поліморфізму білків і на імунологічній реакції «антиген — антитіло», а другий — на ідентифікації специфічних нуклеотидних послідовностей шляхом гібридизації нуклеїнових кислот або використання ПЛР. У багатьох випадках для виявлення мутації або екзогенної ДНК інфекційного агента в досліджуваному зразку достатньо провести ПЛР з наступним електрофоретичним розподілом продуктів. Не викликає сумніву, що у майбутньому з допомогою ДНК-діагностики можна буде виявляти більшість, а можливо і всі найбільш розповсюджені генетичні та інфекційні хвороби, а також новоутворення.

17.6.4. Генна терапія, досягнення та перспективи

Спадковим хворобам властиві складні клінічні прояви, і їх лікування багато в чому є чисто симптоматичним. Окремі порушення метаболізму корегують призначенням спеціальної дієти, що зменшує рівень токсичних речовин в організмі, накопичення яких обумовлено мутаціями в певних генах. Так, за фенілкетонурії, яку виявляють у немовлят з допомогою біохімічного аналізу крові, призначають безаланінову дієту. Для ослаблення симптомів спадкових хвороб, пов'язаних з дефектом певного білка, вводять внутрішньовенно таку його функціонуючу форму, яка не викликає імунної реакції. Саме така «заміщуюча» терапія застосовується, наприклад, за лікування гемофілії, важкого комбінованого імунодефіциту (SCID, від англ. Severe combined immunodeficiency) та ін. Іноді для компенсації певних втрачених функцій здійснюють трансплантацію кісткового мозку та інших органів. Існуюча терапія, на жаль, в переважній більшості випадків мало ефективна, а саме лікування слід проводити багаторазово, незважаючи на його високу вартість.

Принципово новим методом, ефективним і до того ж таким, що знешкоджує генетичну причину спадкового захворювання, слід вважати **генотерапію**, тобто введення нормальних генів у дефектні соматичні клітини. Ідея методу виникла зразу ж після відкриття явища трансформації у бактерій, але реальністю генна корекція соматичних клітин стала після 1980-х років, коли було розроблено методи отримання ізольованих генів, створено еукаріотні експресуючі вектори, стали звичними переноси генів у мишей та інших

тварин. В 1990 р. була зроблена перша спроба застосування генотерапії для лікування SCID у двох дівчаток. В цьому випадку клоновану кДНК аденозиндезамінази (АДА) вводили в лімфоцити, отримані від кожної пацієнтки, і ці модифіковані клітини, синтезуючі АДА, культивували і протягом двох років вводили дівчаткам. Через чотири роки після початку лікування у обох пацієнток спостерігались експресія гена АДА і ослаблення симптомів SCID. Цей дослід не був переконливим доказом власне генної корекції у пацієнтів, але довів нешкідливість самої процедури генної терапії. У зв'язку з цим розпочалися дослідження по застосуванню генної терапії щодо різних видів злоякісних пухлин, гемофілії, СНІДу, муківісцидозу, гиперхолестеролемії та інших хвороб.

Оскільки генна терапія являє собою новий напрям у медичній генетиці, а хвороби, які пробують лікувати цим способом, дуже різноманітні, то створено чимало оригінальних методичних підходів до цієї проблеми. В даний час дослідження по генотерапії в основному спрямовані на корекцію генетичних дефектів соматичних, а не статевих клітин, що пов'язано з етичними і чисто технічними проблемами, а також з міркуваннями безпеки.

Нові підходи до генної терапії соматичних клітин можна поділити на дві великі категорії: генна терапія *ex vivo* і *in vivo*. Розробляються специфічні лікарські препарати на основі нуклеїнових кислот: антизмістовні олігонуклеотиди; РНК-ферменти, модифіковані методами генної інженерії; олігонуклеотиди, корегуючі генні мутації *in vivo*, тощо.

Генна терапія *ex vivo* передбачає такі етапи: 1) отримання клітин від хворого; 2) виправлення генетичного дефекту шляхом переносу потрібного гена в ці ізольовані клітини; 3) добір і накопичення генетично «виправлених» клітин; 4) інфузія або трансплантація цих клітин пацієнту.

Для того, щоб процедура переносу генів у дослідах *ex vivo* була ефективною, а потрібний ген стабільно зберігався і експресувався, потрібні надійні вектори. Найкращими для цієї мети виявилися вектори, отримані на основі ретровірусів мишей.

Геном ретровірусу дикого типу складається із двох ідентичних одноланцюгових молекул РНК, кожна з яких містить шість ділянок: довгі кінцеві повтори (5'-LTR і 3'-LTR); некодуючу послідовність пси⁺ (Ψ^+), необхідну для упакування РНК в капсид; три гени, які кодують: структурний білок внутрішнього капсиду (*gag*), зворотну транскриптазу (*pol*) і білок оболонки (*env*).

Для отримання ретровірусного вектора повнорозмірну РНК ретровірусу вбудовують у плазмиду і шляхом ендонуклеазного розщеплення вилучають більшу частину гена *gag* і гени *pol* і *env*, залиша-

ючи 5'-кінцеву ділянку гена *gag* і 5'- та 3'-LTR. Після цього поруч з Ψ^+ -послідовністю вбудовують «терапевтичний» ген, транскрипція якого контролюється 5'-LTR-промотором. Якщо необхідно, то можна вбудувати і селективний ген із власним промотором. За цією схемою створено чимало ретровірусних векторів; максимальний розмір ДНК-вставки, яку може переносити ретровірусний вектор, — приблизно 8 т. п. н.

Розроблена методика пакування повнорозмірної РНК ретровірусного вектора в інтактні вірусні частки, що гарантує приникнення вектора у клітину і вбудовування відповідної ДНК у геном клітини-хазяїна. Для цього з допомогою генної інженерії створена спеціальна «пакуюча» лінія клітин, трансфекція яких ДНК ретровірусного вектора не супроводжується утворенням здатних до реплікації ретровірусів дикого типу (рис. 17.25.). За використання «пакуючої» лінії клітин у вірусні капсиди упаковується лише РНК вектора і виключається можливість злоякісного переродження клітин за подальших генноінженерних процедур.

Для переносу генів в інтенсивно ростучі клітини-мішені останні обробляють очищеними частками з упакованою ДНК ретровірусного вектора, або ж клітини-мішені і «пакуючі» клітини культивують сумісно. Трансдуковані клітини-мішені тестують на наявність синтезу продукту «терапевтичного» гена, відсутність ретровірусів дикого типу і на ефективність росту та функціонування. Після зазначеного тестування трансдуковані клітини нарощують у великих кількостях і з різними інтервалами вводять пацієнту.

Найбільш вірогідними кандидатами для проведення генної терапії *ex vivo* з допомогою ретровірусних векторів є пацієнти із спадковими хворобами, для лікування яких застосовують трансплантацію кісткового мозку. Терапевтичний ефект пересадки кісткового мозку пояснюється наявністю в ньому тотипотентних ембріональних стовбурних клітин, які зустрічаються з частотою 10^{-4} — 10^{-5} . Ці клітини здатні до проліферації і диференціювання в різні типи клітин, такі як В- і Т-лімфоцити, макрофаги, еритроцити, тромбоцити і остеобласти.

Генноінженерна модифікація тотипотентних стовбурних клітин з наступною інфузією або трансплантацією їх пацієнту сьогодні розглядається як основний спосіб генної терапії *ex vivo*. На жаль, стовбурні клітини кісткового мозку важко виділити і культивувати. Дослідження по *ex vivo*-генній терапії SCID, спровокованого дефіцитом АДА, здійснювали на аутологічних (власних) Т-клітинах, модифікованих з допомогою ретровірусних векторів.

Крім Т-лімфоцитів, за генної терапії захворювань гемопоетичних клітин можна використати кров пуповини, яка містить стовбурні клітини.

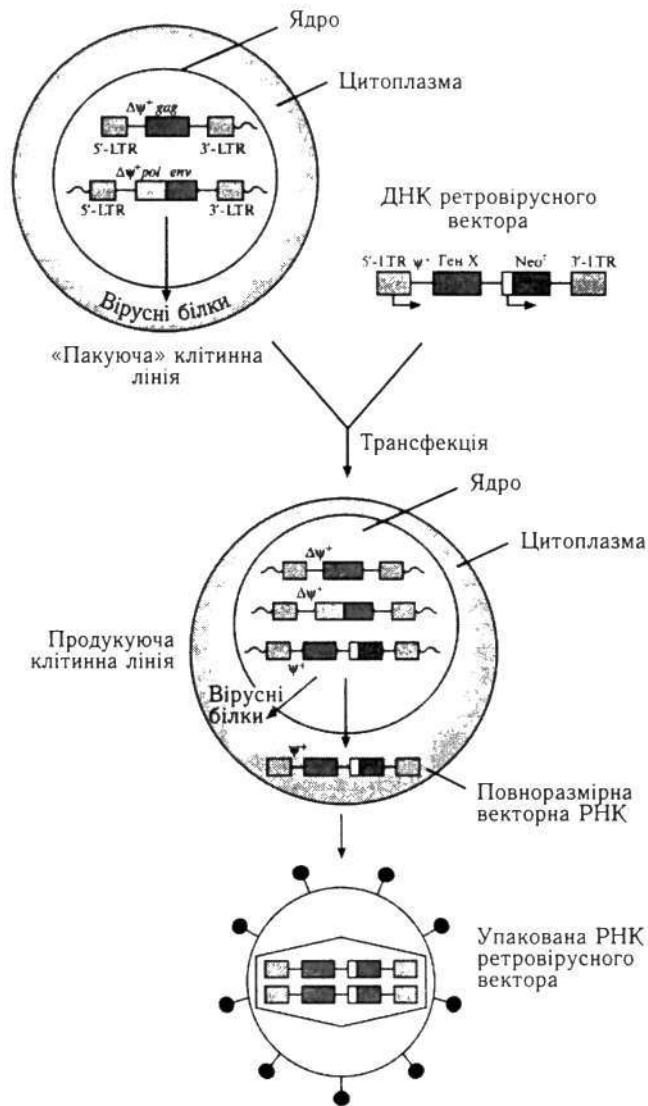


Рис. 17.25. Отримання упакованого ретровірусного вектора з допомогою «пакуючої» клітинної лінії.

$\Delta\Psi^+$ — відсутність в ДНК послідовності, необхідної для пакування; Ψ^+ — наявність такої послідовності; Ген X — «терапевтичний» ген; *Neo^r* — селективний маркерний ген; *gag*, *pol*, *env* — гени ретровірусу

Прикладом успішної генної терапії *ex vivo* з використанням аутологічних клітин є спостереження на пацієнці, гомозиготній по рецесивному гену сімейної гіперхолестеролемії. Її гепатоцити не мали рецепторів ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ). В гепатоцити пацієнтки ввели кДНК ЛПНЩ-рецептора і здійснили інфузію цих гепатоцитів в печінку хворої, де вони прижились і виробляли функціонуючий рецептор як мінімум 18 місяців.

Використання в зазначених технологіях власних клітин хворого дає можливість уникнути імунної реакції з боку пацієнта, однак звужує сферу застосування генної терапії *ex vivo*. Тому в останній час розробляють способи захисту неаутологічних (алогенних) клітин від імунної відповіді пацієнта з метою їх застосування у якості переносників «терапевтичних» генів.

Неаутологічна генна терапія *ex vivo* полягає у виділенні тканин-носпецифічних клітин, здатних добре рости в культурі (фібробластів або кератиноцитів шкіри, астроцитів мозку, гепатоцитів, міобластів і т. п.), та введенні в них необхідного для генної терапії гена з наступним розмноженням цих клітин. Трансформовані клітини в організм пацієнта імплантують в ізольованому стані. Ізоляція досягається завдяки штучній напівпроникливій мембрані, через яку виходить продукт «терапевтичного» гена, а входять живильні речовини, необхідні для існування клітин. Мембрана неімуногенна і не викликає сенсibiliзації пацієнта і реакції відторгнення імплантованих клітин.

З допомогою інкапсульованих клітин, синтезуючих ціліарний нейротрофічний фактор (CNTF), робляться спроби допомогти пацієнтам з боковим аміотрофічним склерозом та хореею Гентингтона.

Генна терапія *in vivo* передбачає доставку необхідного для лікування гена безпосередньо в клітини певних тканин хворого. Ретровірусні вектори проникають лише у клітини, які поділяються, однак у багатьох тканинах дорослої людини більшість клітин втрачає здатність до поділу. Саме тому розроблено чимало інших (вірусних і невірусних) векторних систем доставки «терапевтичних» генів до тканин-мішеней організму.

Серед вірусних систем доставки генів використовують дефектні по реплікації ретровірусні вектори. Створена конструкція, названа плазмовірусом, яка містить ретровірусні гени *env*, *gag* і *pol*, 5'-LTR-промотор, а також «терапевтичний» ген. Після трансфекції плазмовірус запускає утворення дефектних по реплікації вірусних часток, що лежить в основі безпечного застосування плазмовірусу як переносника потрібних генів. Для того, щоб плазмовірус міг проникати в клітини, які не поділяються, здійснена його генноінженерна модифікація і підвищена трансдукуюча активність. Крім того,

вдалося штучно підвищити специфічність інфекції. Для цього рекомбінантний ретровірусний вектор упаковують в оболонку іншого вірусу, білок якої визначає специфічність зв'язування і спектр інфікованих клітин. Це явище називається **фенотиповим змішуванням**. Специфічність ретровірусного вектора можна змінювати, маніпулюючи структурою вірусної оболонки або гена *env*.

Із інших вірусних векторів заслуговують уваги аденовірусні, які здатні інфікувати клітини, що не поділяються, Аденовіруси широко використовуються як живі вакцини, що свідчить про перспективність їх застосування в якості векторних систем за генної терапії *in vivo*.

Аденовірусні вектори, у яких вірусний ген *E1* замінено на «терапевтичний» ген, використали в клінічних випробуваннях по генній терапії муковісцидозу. Для отримання безпечного трансдукуючого аденовірусного вектора сконструювали спеціальну «пакуючу» лінію клітин, які утримують необхідний для пакування ген *E1* і ряд інших вірусних генів, що не входять у склад трансдукуючої ДНК і не попадають в клітини-мішені. Специфічність аденовірус-опосередкованого переносу генів можна збільшити, якщо сконструювати вірус, проникаючий переважно у певний тип клітин. Для цього у ген, відповідальний за утворення ниток аденовірусу, передбачається включити послідовність, кодує домен білка, який взаємодіє з клітинноспецифічним рецептором.

Не менш перспективним є використання векторів, створених на основі аденоасоційованих вірусів (ААВ) — невеликих непатогенних вірусів людини з одноланцюговим ДНК-геномом (4,7 т. п. н.), який може вбудовуватися у специфічний сайт хромосоми 19. Свою назву ці віруси отримали завдяки тому, що для їх розмноження необхідні білки іншого вірусу (вірусу-помічника), наприклад аденовірусу.

Векторні системи, створені на основі ААВ, випробовуються на ефективність трансдукції *in vivo* гепатоцитів за гемофілії та клітин легенів за муковісцидозу.

В природі існують віруси, яким властива висока спорідненість до певного типу клітин. Саме таким є вірус простого герпесу (HSV), який інфікує нейрони, викликаючи у людини так звані «простудні» висипи, а інколи — енцефаліт. Внаслідок тропності HSV до нервових клітин він є перспективним вектором для генної терапії захворювань центральної і периферійної нервової системи: пухлин, нейродегенеративних хвороб (Альцгеймера, Паркінсона) та ін.

Заміна сегмента геному HSV довжиною біля 30 т. п. н. ДНК-вставкою не впливає на реплікацію HSV, пакування його ДНК та інвазійну здатність. Однак великий розмір геному HSV утруднює генетичні маніпуляції з ним. Для вирішення цієї проблеми в плазмі-

ду *E. coli* вбудували «урізаний» геном HSV, який містить точку ініціації реплікації і послідовність, відповідальну за пакування. Отримані HSV-похідні назвали **ампліконами (амплікон-плазмідами)**. Для отримання рекомбінантного HSV здійснюють трансфекцію амплікон-плазмід в інфіковану вірусом-помічником клітину хазяїна.

Невірусні системи доставки «терапевтичних» генів полягають у прямому введенні ДНК-конструкцій у клітини-мішені. Цього можна добитися шляхом ін'єкцій рекомбінантних ДНК в тканину, введення в клітини кон'югованих з ДНК частинок золота діаметром 1—3 мкм тощо.

Проникнення ДНК через мембрану клітин можна полегшити, оточивши генетичну конструкцію ліпідною оболонкою, яка утворює ліпідну сферу (**ліпосому**). Створено ліпосоми з позитивним зарядом поверхні; вони зв'язуються з негативно зарядженою молекулою ДНК, утворюючи ДНК-ліпідний комплекс (**ліпоплекс**). Ліпоплекси отримати досить легко, але ефективність переносу генів з їх допомогою не дуже висока, бо більша частина ДНК після проникнення у клітину руйнується лізосомами. Для того, щоб уникнути лізосомного руйнування ДНК, останню кон'югують з іншими молекулами. Так, наприклад, полі-L-лізин ковалентно з'єднують з молекулою, здатною зв'язуватися із специфічним клітинним рецептором, а потім додають ДНК. При цьому утворюється компактна, щільно скручена структура (тор), на зовнішній поверхні якої розташовуються сайти зв'язування с клітинним рецептором. На жаль, цей кон'югат має низьку трансфекційну активність і тому не знайшов широкого застосування.

Можливо, більш придатними терапевтичними векторами стануть штучні хромосоми (мікрохромосоми) людини, в які генноінженерними методами вмонтовують необхідні структурні гени. Один із методів отримання мікрохромосом — це штучне вкорочення існуючих у клітині груп зчеплення. Основною проблемою на шляху практичного використання штучних хромосом є доставка цієї гігантської молекули ДНК в ядро клітини-мішені. Можливо, першим кроком у цьому напрямку буде використання імплантованих інкапсульованих клітин із штучними хромосомами.

До сфери генної терапії відносяться і деякі інші методичні підходи, які зараз успішно розробляються. Одним із них є знищення проліферуючих пухлинних клітин з допомогою ганцикловіра, активованого продукту гена тимідинкінази вірусу простого герпесу (*HSVtk*). Для цього проводять *in vivo* трансдукцію або трансфекцію пухлинних клітин геном *HSVtk*, а через деякий час вводять ганцикловір. Вірусна тимідинкіназа разом з кіназами клітини-хазяїна синтезує ганцикловіртрифосфат, який інгібує ДНК-полімеразу

і зупиняє синтез ДНК в проліферуючих клітинах пухлини. Одна експресуюча ген *HSVtk* пухлинна клітина може призвести до загибелі ще до 10 немодифікованих клітин пухлини шляхом розповсюдження ганцикловіртрифосфату за міжклітинних контактів. Таким чином, продукт пересаженого гена *HSVtk* в цій системі виконує роль активатора лікувальних властивостей ганцикловіру, який виявляє лікувальний вплив у формі ганцикловіртрифосфату.

У більшості випадків генної терапії *ex vivo* і *in vivo* використовуються клоновані генетичні конструкції, компенсуючі функцію білків, які не синтезуються в організмі хворого або синтезуються у дефектній формі. Однак є чимало хвороб, пов'язаних з надпродукцією нормальних білків. Для лікування таких хвороб розроблено терапевтичні системи з використанням олігонуклеотидів. Олігонуклеотид, що гібридується з самим геном і блокує його транскрипцію, називають «антигенним», а той, що гібридується з відповідною іРНК, — «антизмістовним». Можна створити також синтетичні молекули ДНК, які здатні приєднуватися до специфічних білків-мішеней і блокувати їх функцію. Нарешті, можна використати модифіковані рибозими — природні РНК-ферменти, здатні розтинати специфічні іРНК. Всі ці методичні підходи в майбутньому знайдуть широке застосування, і в першу чергу об'єктом наукових розробок будуть «антизмістовні» послідовності і особливо «антизмістовні» олігонуклеотиди. Прикладом таких конструкцій можуть бути епісомні експресуючі вектори з вбудованою в них кДНК інсуліноподібного фактора росту 1 або його рецептора із зворотною орієнтацією нуклеотидів. Подібний вектор, обумовлюючий синтез «антизмістовної» іРНК, трансфікували в культуру клітин гліоми. За одночасного введення щуром клітин нетрансфікованих і трансфікованих «антизмістовною» кДНК інсуліноподібного фактора, розвитку пухлин не спостерігали, в той час як у контрольному досліді (введення щуром лише нетрансфікованих клітин гліоми) пухлини виникали як правило.

Олігонуклеотиди руйнуються внутрішньоклітинними нуклеазами, тому важливо захистити їх від дії нуклеаз, зберігши їх здатність взаємодіяти з мішенями ДНК, іРНК або білками. У найбільш уживаних сьогодні «антизмістовних» олігонуклеотидів вільний атом кисню фосфодіефірного зв'язку заміняють на сульфогрупу, внаслідок чого виникає тіофосфатний зв'язок. Отримано також «антизмістовні» олігонуклеотиди з фосфорамідитним та поліамідним (пептидним) зв'язками. Такі молекули дуже стійкі щодо дії нуклеаз. Проникнення «антизмістовних» олігонуклеотидів у клітину можна значно поліпшити, помістивши ці сполуки у ліпосоми.

Проведені доклінічні випробування показали, що «антизмістовні» олігонуклеотиди є досить ефективними лікарськими засобами.

Вивчається можливість їх використання для лікування стенозу коронарних і сонних артерій, атеросклерозу, цукрового діабету і т. ін.

Чимало генетичних дефектів можна скорегувати, замінивши помилкову пару нуклеотидів у мутантному гені на «правильну» пару. Можливість корегування мутацій з допомогою химерних (ДНК — РНК) олігонуклеотидів вивчали з використанням як кДНК у складі плазмід, так і хромосомної ДНК. В обох випадках мутантний сайт з високою частотою замінювався на нормальний. Однак для того, щоб химерні олігонуклеотиди стали ефективними лікарськими засобами, необхідні подальші дослідження.

Все сказане свідчить про те, що генна терапія сьогодні ще не вийшла за межі експериментальних розробок, і на шляху практичного застосування вона зробила лише перші кроки. Проте є всі підстави сподіватися, що генотерапія в майбутньому стане найбільш ефективним методом лікування спадкових хвороб. Вже сьогодні є повідомлення, що облітеруючий ендартеріт та ішемічну хворобу серця можна успішно лікувати парентеральним введенням гена, який обумовлює розвиток колатеральних кровоносних судин.

Рекомендована література

- 1 Айала Ф, Кайгер Дж Современная генетика В 3 т — М Мир, 1987—1988
- 2 Алиханян С И, Акифьев А П, Чернин Л С Общая генетика — М Высш шк, 1985
- 3 Альбертс Б и др Молекулярная биология клетки В 5 т / Б Альбертс, Д Брей, Дж Льюис, К Робертс, Дж Уотсон — М Мир, 1986—1987
- 4 Бердышев Г Д, Дуброва Ю Е, Карпенчук К Г Структура, функции и эволюция генов — К Наук думка, 1980
- 5 Бочков Н П, Захаров А Ф, Иванов В И Медицинская генетика — М Медицина, 1984
- 6 Ватти К В, Тихомирова М М Руководство к практическим занятиям по генетике — М Просвещение, 1979
- 7 Гершензон С М Основы современной генетики — К Наук думка, 1983
- 8 Геном растений / Под ред академика АН УССР К М Сытника — К Наук думка, 1988
- 9 Глазко В И и др ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / В И Глазко, Е В Шульга, Т Н Дымань, Г В Глазко — Белая Церковь Белоцерковский гос аграрный университет, 2001
- 10 Глеба Ю Ю, Сытник К М Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений — К Наук думка, 1982
- 11 Глик Б, Пастернак Дж Молекулярная биотехнология Принципы и применение — М Мир, 2002
- 12 Давыденко О Г Нехромосомная наследственность Курс лекций — Минск, БГУ, 2001
- 13 Дубинин Н П Общая генетика — М Наука, 1986
- 14 Жученко А А Адаптивное растениеводство — Кишинев Штиинца, 1990
- 15 Захаров А Ф и др Хромосомы человека / А Ф Захаров, В А Бенюш, Н П Кулешов, Л И Барановская — М Медицина, 1982
- 16 Инге-Вечтомов С И Генетика с основами селекции — М Высш шк, 1989
- 17 Кучук М В Генетическая инженерия высших растений — К Наук думка, 1997
- 18 Лобашев М Е, Ватти К В, Тихомирова М М Генетика с основами селекции — М Просвещение, 1979
- 19 Льюис Б Гены — М Мир, 1987
- 20 Методы генетики соматических клеток В 2 т / Под ред Дж Шея — М Мир, 1985

21. *Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот*: Учеб. для биол. спец. вузов / Под ред. А. С. Спирина — М.: Высш. шк., 1990.
22. *Николайчук В. І., Горбатенко І. Ю.* Генетична інженерія: Підручник для студентів біол. спеціальностей вищих закладів освіти. — Ужгород, 1999.
23. *Пирузян Э. С.* Основы генетической инженерии растений. — М.: Наука, 1988.
24. *Равич-Щербо И. В., Марютина Т. М., Григоренко Е. Л.* Психогенетика: Учебник для вузов — М.: Аспент Пресс, 2000.
25. *Рокицкий П. Ф.* Введение в статистическую генетику. — Минск: Высшейш. шк., 1978.
26. *Російсько-український словник наукової термінології*. Біологія. Хімія. Медицина. — К.: Наук. думка, 1996.
27. *Рыбчин В. Н.* Основы генетической инженерии. — Минск, 1986.
28. *Сассон А.* Биотехнология: свершения и надежды. — М.: Мир, 1987.
29. *Сиволап Ю. М.* Геном растений и его улучшение. — К.: Урожай, 1994.
30. *Стрельчук С. І.* та співавт. Генетика з основами селекції / С. В. Демидов, Г. Д. Бердишев, Д. М. Голда. — К.: Фітосоціоцентр, 2000.
31. *Тихомирова М. М.* Генетический анализ: Учебное пособие. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990.
32. *Ткачук З. Ю., Морозова М. М., Полипчук О. Я.* Основы загальної генетики: Учебно-навч. посібник. — К.: Вища шк., 1995.
33. *Тоцький В. М.* Генетика: Підручник для студентів біологічних спеціальностей університетів: В 2-х т. — Одеса: Астропринт, 1998.
34. *Фогель Ф., Мотульски А.* Генетика человека: В 3-х т. — М.: Мир, 1989—1990.
35. *Хесин Р. Б.* Непостоянство генома. — М.: Наука, 1985.
36. *Шахбазов В. Г., Чешко В. Ф., Шерешевская Ц. М.* Механизмы гетерозиса: История и современное состояние. — Харьков: Основа, 1990.
37. *Weaver R. F.* Genetics / Third edition. — Wm. C. Brown Publishers, 1997.

Авторський покажчик

- Агол І І 445, 584
Айала Ф 555
Акиф'єв А П 3
Алиханян С І 3, 574, 588
Андрощук А Ф 586
Астауров Б Л 24, 238, 253, 371
Аттарди Д 265
Ауербах Ш 294, 381
- Балтимор О 162
Барски Г 606
Баур Є 271
Беквіт Дж 459
Бенеден ван Е 15, 21, 42
Бензер С 297, 447, 449, 450, 452
Бергер П 593
Бердишев Г Д 3, 480
Бетсон В 6, 210, 441
Блетнер Ф 595
Бідл Дж 476, 477
Бовери Т 15, 21, 42
Бойер Г 596
Борлауг Н 565
Борстел Р фон 377
Бочков М П 645
Бреннер С 317
Бриджес К 25, 211, 245, 246, 393
Бриттен Р 495, 513
Бурлов В В 586
Бутенко Р Г 606
- Вавлов М І 16, 18, 25, 290, 563, 572, 584
Вайнберг В 535
Вальдейер В 15, 21
Вейгле Дж 396, 403
- Винге О 372
Вінклер Х 393
Вірхов Р 15
Вішаус Е 509
Вольман Е 432, 433
- Гальтон Ф 610
Гаркавий П Ф 584
Гвоздьов В А 276
Гейденгайн М 21
Гемерлінг Г 24
Георгієв Г П 56, 276, 294
Гердон Дж 487
Геррод А 476, 610
Гертвіг О 15, 21, 23
Гертнер А 14
Гершензон М С 478
Гершензон С М 3, 18, 284, 381, 442, 478, 525, 585
Глазко В І 586
Глеба Ю Ю 587, 606
Голд Д М 3
Гольшмідт Р 246
Голубовський Д М 294
Гонторовський В О 586
Горовиц Н 309
Горожанкін І М 15, 21
Гостев О О 586
Грін М 446
Грей С 379
Гріфітс Ф 426
Гривелл Л 226
Гришко М М 584
Губернатор В С 584
Гудзь С П 589
Гуляев Г В 3

- Густафсон А. 573, 581
- Давиденков С. М. 650
 Дарвін Ч. 14, 15, 284, 442, 549, 578
 Даскалов С. 583
 Дати П. 38
 Девенпорт Г. 582
 Девідсон Е. 495, 513
 Девіс Б. 306
 Делоне Л. М. 573, 584, 585
 Дельбрук М. 395, 403
 Деміденко Б. Г. 586
 Демідов С. В. 3
 Дженкінс Р. 603
 Джонс Д. 525, 582
 Джунс Т. 529, 560
 Дивиденков С. М. 609
 Дідусь В. І. 573, 585
 Добржанський Ф. Г. 17, 235, 517
 Донкастер Л. 238
 Дубінін М. П. 16, 445, 525, 529
 Дука С. Х. 585
- Еймс Б. 390
 Ефрусі Б. 204, 268, 476, 606
- Еголіна Н. А. 391
 Ельська Г. В. 497
- Жакоб Ф. 432, 433
 Жебрак А. Р. 364, 572
- Захаров О. Ф. 391, 644
 Захаров І. А. 237
 Зосимович В. П. 585, 586
- Іванов В. І. 645
 Інґе-Вечтомов С. Г. 3, 288
 Інґрем В. М. 522
 Інґрем Дж. 477
 Іст Е. 525
- Йогансен В. 285, 441, 524
- Кайгер Дж. 533
 Карпеченко Г. Д. 18, 369, 370
 Кельрейтер І. 14, 581
 Кернс Дж. 386
 Кінг Дж. 529, 560
 Кімура М. 560
 Кириченко Ф. Г. 584
 Клодницький І. І. 18
- Ключко П. Ф. 586
 Книш А. І. 586
 Ковалевська М. Ф. 586
 Коен С. 596
 Кожухов З. О. 586
 Козаченко М. Р. 586
 Козубенко В. С. 582, 586
 Кольцов М. К. 479
 Коржинський С. І. 24
 Корренс К. 6, 238, 241, 271
 Костов Д. 372
 Краев С. Я. 566
 Крейтон К. 219
 Крик Ф. 16, 30, 33, 34, 35, 181, 317
 Кулик М. І. 586
 Кунах В. А. 5, 587
 Курлянд Ц. Г. 182
 Кучук М. В. 587
- Ламарк Ж. Б. 284
 Ларченко Е. О. 586
 Лебедев В. М. 585
 Левицький Г. А. 17
 Ледерберг Дж. 305, 306, 421, 429
 Леопольд У. 309
 Ліндегрєн К. 393, 402
 Лифенко С. П. 586
 Лобашов М. Ю. 294, 357, 375, 381, 442, 481, 609
 Лотсі Дж. 441
 Лубенець П. А. 584
 Лукін Е. І. 584
 Лук'яненко А. П. 572
 Люка П. 14
 Льюїс Е. 446, 452, 509, 511
- Майр Е. 550
 Мак-Клінток Б. 21, 219, 226, 294, 354
 Мак-Карті М. 426
 Мак-Леод К. 426
 Максимов М. Г. 5, 585
 Малюта Д. І. 586
 Манзюк В. Т. 586
 Марченко І. І. 585
 Маттеї Дж. 32
 Машталер С. Г. 586
 Мейстер Г. К. 572
 Меллер Г. 25, 211, 294, 379, 442
 Мельников П. В. 587
 Мендель Г. 6, 8, 10, 15, 24, 195, 299, 441, 442, 525
 Меріл Д. 603

Месельсон М 396, 403
 Мітчел М 402
 Монтегю ван М 598, 600
 Морган Л В 259
 Морган Т Х 25, 211, 222, 238, 443, 445, 525
 Моргун В В 586
 Мотульські А 527
 Мусійко О С 582, 586
 Мюнтцинг А 364, 372
 Мюц К 602

Наваліхіна Н К 586
 Навашин М С 17, 293, 368
 Надсон Г А 25, 294, 379, 442
 Найт Т 14
 Негелі К 14, 284
 Нільсон-Еле З 11, 207
 Нренберг М І 32
 Ноден Ш 14
 Нолдейн Дж 643
 Нюслайн-Волард Х 509

Овері О 426
 Олівер К 446
 Отоленчі С 427
 Очоа С 32

Пастер Л 15
 Пастернак Т П 587
 Пахомова В П 586
 Пеннет Р 191, 193, 210
 Пильнев В Н 585
 Письменко М О 585
 Погорлецький Б Л 586
 Полінг Л 610
 Полшвайк М Н 586
 Поляков І М 584
 Понтекорво Г 232
 Попереля Ф О 586

Рабль К 15, 21
 Райт С 525, 529, 542
 Рапопорт І А 294, 381, 573
 Резнікова С О 586
 Рибін В А 372
 Робертсон В 358
 Робсон Дж 294
 Роде М 273
 Ромашев Д Д 525, 529
 Ру В 15, 23
 Рубін Г М 604

Савватеев В Б 253
 Савченко М О 584
 Сажре О 14
 Самсон Л 386
 Салегін А О 18, 572, 573, 584, 585
 Саузерн 462
 Сафін М К 586
 Сахаров В В 294, 364, 381, 442, 574
 Серебровський О С 25, 338, 445, 580
 Сеттон 24, 194
 Сибірний А А 574, 589
 Сиволап Ю М 5, 469, 587
 Ситько П О 584
 Созинов О О 586
 Соколов Б П 582, 586
 Соннеборн Т 275
 Спрінг О С 38
 Спредлінг А Ц 604
 Стадлер Дж 442
 Стертевант А 25, 211, 223, 228, 506
 Страсбургер Е С 15, 21, 23
 Стрельчук С І 3
 Струнников В О 238, 253, 573, 583
 Супруненко О І 585

Татум Е 305, 421, 478
 Тейлор Д 394
 Тимірязев К А 559
 Тимофеев-Ресовський М В 198
 Токин Б П 490
 Тонегавва С 410
 Тоцький В М 96, 170, 528
 Троценко А Г 586

Уїлкінс М 34
 Уїлмут Я 488
 Уолес А Р 549
 Уотсон Дж 16, 33, 34, 35

Федоренко В О 574, 589
 Філіпов Г С 25, 294, 379
 Філіпченко Ю О 516, 567
 Фішер Р 525
 Флемінг В 15, 21
 Фогель Ф 527
 Франклін Р 34
 Фріз де Г 6, 289, 290

Хаджінов М І 273
 Харді Х 535
 Харріс Г 527, 664
 Хаустова Н Д 528

Хейс В 433, 434
Хейфлик Л 503
Хербст К 23
Херші А Д 395, 403
Хогнес Д 276
Холдейн Дж 227 228
Холдей Р 396
Хорет Ю 603
Хотчкіс Р 427
Худяк М І 586

Циндер Н 429
Цицин М В 572

Чаргаф Е 34
Чейлеп С 297
Чередніченко В Н 586
Чермак Е 6
Чернін Л С 3
Четвериков С С 200, 526
Чилтон М Д 598
Чистяков Г Д 21

Шавловський Г М 574, 589
Шапіро Дж 459
Шахбазов В Г 5, 583, 586
Швани Т 15, 21
Шевцов І О 586
Шел Дж 598
Шестаков С В 602
Шибальські В 607, 609
Шиманський Т К 586
Шильперут Р 598
Шкварников П К 586
Шлейден М 15, 21
Шмальгаузен І І 17, 200, 554, 584
Шмальгаузен І Ф 17
Штерн К 219
Шулидин А Ф 226, 585, 586

Юр'єв В Я 567, 584

Ямамото Т 253
Янсєнс Ф 215

Предметний покажчик

- А-хромосоми 46
А-центр рибосоми 173
Аберації 318
Автополіплоїдія 363
Автосинтез 368
Адаптація
— генетична (філогенетична) 528
— онтогенетична 528
Адаптивна шинність 549
Аденін 27
Азотисті основи 27
Активатор 148, 495
Активні центри рибосоми 181—182
Акцепторні ділянки ДНК 10
Алелізм
— множинний 12, 443
— ступінчастий 445
Алелеморфізм 442
Алень 11, 442
— домігантний 11
— рецесивний 11
— серія 443
Алодиплоїд 368
Алополіплоїди 362
Алозими 521
Алосинтез 368
Алостеричний центр 72
Алотетраплоїд 368
Алофенні тварини 500
Алоферменти 521
Альтернативний сплайсинг 146
Альтернативні ознаки 187
Амбер-кодон 209, 298
Аміноацилденілат 178
Аміноацил-тРНК 178
Аміноацил-тРНК-синтетаза 178
Аміноацильний центр рибосоми 173
Аміноглікозидні антибіотики 288
Ампліфікація гена 109, 324
Амфігаплоїд 368
Амфідиплоїд 368
Аналіз
— гібридологічний 187
— генеалогічний 614
— двофакторний 223
— клональний 588
— моносомний 360
— тетрадний 191, 216, 241
— трифакторний 223
Аналізуюче схрещування 188
Андрогенез 362
Андреногенетична зигота 27
Анеуплоїдія 319, 357, 358
Антигени гістосумісності 640
Антимутагенія 376
Антитермінація 68
Антитіла 407
Антропологетика 608
Апоміксис 363
Апуринізація 121
Апуринові сайти 121
Асортативне схрещування 541
Асоціації 641, 649, 664
Атенуатор 73, 131
Атенуація 74
Ауксотрофія 302
Аутбридинг 575
Аутосоми 238
Афлотоксин 384
Ахроматинове веретено 43

- Бактеріальний геном 70—79
 Бактеріофаги 429—438
 — трансдукуючі 429
 Балансова модель популяції 525
 Балансуюча хромосома 334
 Барра тільця 249
 Батьківський тип успадкування 263
 Бекрос 188
 Бібліотеки
 — кДНК 635
 — геномні 635
 Білки
 — активатори 148
 — репресори 72
 — синтез 169
 — шоківі 286
 Біогенетичний закон 483
 Біотехнологія клітинна 483
 Біополімери 27
 Біосинтез репараційний 102
 Баланс генний 200, 560
 Банк генів 463
 Бластодерма
 — клітинна 505
 — синцитіальна 505
 Близнюки 616
 Близнюковий метод 616
 Блотинг по Саузерну 461
- В-хромосоми 46**
 Віддалені гібриди 368
 Віроїди 60
 Вектори 591, 603
 — плазмідні 594, 597
 — фагові 595, 597
 Величина С 82
 — інтерференці 228
 — кросинговеру 223
 Виключення алейне 410
 Вилка реплікації 96
 Віддалені гібриди 368
 Віроїди 60
 Вірусний геном 59—70
 Вилка реплікації 96
 Високочастотні повтори 87
 Випадіння (делеції) 314—315
 Властивості коду 30—31
 Вставки (інсерції) 314, 315, 317
 Вузолки рекомбінаційні 397
- Галактозний оперон 78
 Гамети рекомбінантні 213
- Гаметогенез 485
 Гаплоїд 273
 Гаплоїдія 319, 373
 Гаплотип 641, 664
 Гарячі точки 454
 ГАТ-селекція 632
 Гель-електрофорез 519
 Гемоглобін 327
 Гемоглобінопатії 315
 Ген 6, 26
 — антимулятор 293
 — гіпостатичний 203
 — головний 567
 — гомейозисний 289, 506, 511
 — доза 480
 — домінуючий 208
 — епістатичний 203
 — інтегратор 495
 — інтенсифікатор 202
 — кодомінуючий 11
 — модифікатор 202, 209
 — мозаїчний 83
 — мутатор 293
 — однозначний 207
 — положення 480
 — перекривання генів 67
 — регуляторний 10
 — рецесивний 208
 — сімейство генів 638
 — сильний 567
 — слабкий 567
 — структурний 10
 — супресорний 202
- Генетика**
 — біохімічна 611
 — екологічна 389, 562
 — етапи розвитку 14—19
 — імуногенетика 611
 — клінічна 611
 — людська 608
 — медична 608
 — поведінки 612
 — популяційна 611
 — розвитку 612
 — розмноження 612
 — соматичних клітин 612, 630
 — формальна 611
 — статі 238
 — цитогенетика 611
- Генетико-автоматичні процеси 544
 Генетична (філогенетична) адаптація 528, 560

- Генетична детермінація 484
 Генетична екологія 389
 Генетична інженерія 591
 Генетична карта 223
 Генетична предетермінація цитоплазми 277
 Генетична рекомбінація 93
 Генетичні нуклеїнові кислоти 26
 Генетичний аналіз 8
 Генетичний гомеостаз 556
 Генетичний код 31
 Генетичний тягар 559, 619, 643
 Генна інженерія 16, 591
 — конверсія 193
 — терапія 678—686
 Генний баланс 560
 Гени 441
 — бактерій 70—81
 — відновники фертильності 273
 — вірусів 155—162
 — еукаріотів 81—87
 — зиготичні 509
 — зчеплені 210
 — істотні і неістотні 66, 310
 — материнського ефекту 261, 509
 — надранні, ранні, пізні 66
 — незалежне комбінування 187—208
 — структурні і акцепторні 478
 — тканинноспецифічні 484
 Геном 59—60, 92
 Геномні мутації 318
 Геномний аналіз 373
 Генотип 9
 Генофонд 532
 Гетероалелі 453
 Гетерогаметна стаття 239
 Гетерогенність генетична популяцій 525
 Гетерогенність генетична хвороб 650
 Гетеродуплекс ДНК 399
 Гетерозигота 12
 Гетерозиготність популяцій 529
 — середня 530
 — очікувана 530
 Гетерозис 526, 554
 — моногенний 582
 — пристосовний 581
 — репродуктивний 581
 — соматичний 581
 Гетерокаріон 231
 Гетеромультимер 478
 Гетероплоїдія 358
 Гетерохроматин
 — конститутивний 45
 — факультативний 45
 Гетерохромосома 240
 Гібридизація
 — ДНК—ДНК 634
 — ДНК—РНК 83, 474
 — віддалена 368, 576
 — соматичних клітин 630
 Гібридологічний аналіз 8
 Гібридний дисгенез 280, 355—356
 Гігантизм 363
 Гіандроморфи 242
 Гіногенез 362
 Гіпотези
 — запрограмованої загибелі клітин 503
 — копи-чойз 394
 — маргіномію 504
 — неоднозначної відповідності кодонів і антикодонів 182
 — один ген — один поліпептидний ланцюг 478
 — один ген — один фермент 204, 477
 — один поліпептидний ланцюг — один ген 481
 — одна РНК — один ген 481
 — розрив-воз'єднання 394
 — симбіогенетична 263
 Гістидиновий оперон 74
 Гістони 50
 Голандричні ознаки 256
 N-глікозиди 27
 Гомеобокс 87, 506
 Гомеодомен 506
 Гомеозис 289
 Гомеозисні мутації 506
 Гомеологічні хромосоми 368
 Гомеостаз генетичний 556
 Гомоалелі 453
 Гомогаметна стаття 239
 Гомозигота 12
 Гомологічні хромосоми 43
 Гомомультимер 477
 Горизонтальний перенос генів 277
 Група зчеплення 210
 Група комплементу 450
 Групи крові у людини 12—13, 665
 Гуанін 27

- Дальтонізм 539
 Дауна синдром 359, 657
 Дволанцюгова ДНК, структура 27—33
 — рекомбінація 212
 — репарація 118—124
 — реплікація 95—109
 — рестрикція 112—116
 — суперспіралізація 33—37
 — транскрипція 128—169
 Двофакторний аналіз 233
 Деліції 314, 315, 319
 — інтерстиційні 320
 — кінцеві 320
 Демінуща хроматину 486
 Денатурація ДНК 84
 Депресія імбредна 575
 Детермінація генетична клітин 484
 Дефектні фаги 417
 Дефішенсі 320
 Ділянки ДНК
 — гіперваріабельні 409, 635
 — лідерні 176
 — незначущі 57
 — регулювальні 58
 — повторювальні 627
 Дигетерозигота 192
 Дигбридне схрещування 188, 192
 Дизиготні близнюки 617
 Дизруптивний добір 554
 Диплоїдний організм 9
 Дисгенез гібридний 280, 355
 Диски хромосом 47
 Диски імагінальні 506
 Дискордантність 617
 Дискретність
 генотипу і фенотипу 10, 187
 Дисплазія 301
 Диференціація клітин 483, 486
 Диференційна активність генів 484,
 491—499
 Диференційна реплікація 491
 — транскрипція 491
 — трансляція 497
 Диференційне дозрівання продуктів ге-
 нів 497
 Диференційне забарвлення хромосом
 46
 ДНК
 — зиготенна 96, 398
 — конформаші 35
 — лінкерна 52
 — напівметильована 117
 — пахитенна 96
 — сателітна 87, 627
 — секвенування 469
 ДНК-діагностика 673
 ДНК-зонди 460, 634, 674—677
 ДНК-лігази 121
 ДНК-N-глікозилази 30, 121
 ДНК-полімерази 92, 120
 ДНК рекомбінантна 593
 ДНК-рестриктази 93
 Добір
 — дизруптивний 554
 — індивідуальний 579
 — масовий 578
 — направлений 554
 — негативний 550
 — позитивний 550
 — природний 548
 — руховий 554
 — стабілізувальний 554
 — частотнозалежний 555
 — штучний 548, 578
 Довгий кінцевий повтор 164
 Доза гена 199
 Дозова компенсація 247
 Домени варіабельні імуноглобулінів
 409
 Домінування 189—200
 Дрейф генів 543, 645
 Дуплікації 86, 232, 319, 323

 Еволюція біологічна 517, 529, 560
 Екзогенота 432
 Екзон 70, 83
 Екзонуклеази 30, 107, 121
 Екогенетика 669
 Експресивність 199
 — неповна 199
 — варююча 652
 Експресія генів диференційна 490,
 491—499
 Ексізія 120
 Ексізаза 416
 Електронна мікроскопія генів 144
 Електрофорез 519
 Елементи контролюючі
 — автономні 354
 — неавтономні 354
 Елементарна еволюційна подія 517
 Елементарна одиниця еволюції 517
 Елементарні ознаки (фени) 10

- Елементи геному рухомі 339
 Елонгація
 — реплікації 96
 — транскрипції 96
 — трансляції 96
 Ембріогенез соматичний 490
 Ендогенота 432
 Ендомітоз 47
 Ендонуклеази 30, 107
 Ендополіплоїдія 363
 Ендосимбіонти 63
 Ензимопатії 650
 Ендоцитоз 633
 Енхансер 150, 510
 Епігенетична спадковість 484
 Епісома 81
 Епістаз 203
 Еухроматин 45
 Ефект
 — дози гена 199
 — засновника 545
 — материнський 261, 261, 277
 — мейотичний 377
 — пляшкової шийки 545
 — положення гена 329
 — полярний 316
 Ефективна чисельність популяції 544
 Ефективне число алелей 531
 Ефектори, регуляція функції генів 150

Закони
 — біогенетичний 483
 — гомологічних рядів 25, 290, 563
 — Менделя 189, 192
 — незалежного успадкування генів 194
 — Харді—Вайнберга 535
 Заміни азотистих основ 314
 Затравка 98
 Збалансований поліморфізм 558
 Збалансовані поліплоїди 362
 Зворотна транскрипція 162—169
 Зв'язки фосфодіефірні 27
 Зворотні мутації 296
 Зворотні схрещування 188
 Зигота 9, 12, 481
 Зигота андрогенетична 24, 253
 Злиття хромосом 358
 Зонд ДНК 460
 — мічений 460, 674
 — РНК 460

 Зсув рамки зчитування 317
 Зчеплення генів
 — неповне 211, 222, 257
 — повне 211, 222
 Зчеплення молекул ДНК 399
 Зчеплення зі статтю 255
 Зчепне успадкування 233, 257

І
 Ідеальна популяція 578
 Ідіограма 624
 Ізоляція
 — репродуктивна 645
 — територіальна 645
 — соціальна 645
 Ізомери ДНК топологічні 104
 Ізоферменти 521
 Ізоформи 521
 Ізошизомерази 113
 Імпринтинг 609
 Імуногенетика 408, 502, 611
 Імуноглобуліни 407—409
 Інбредна депресія 575
 Інбредна лінія 575
 Інбридинг 575, 645
 Інверсії 319, 329
 Інвертовані повтори 36, 85, 628
 Індекс
 — фенотиповий 194
 — центромерний 623
 Індивідуальний добір 579
 Індукована репарація 125
 Індукований мутагенез 294, 378
 Індуктор 73, 150
 Індукція ембріональна 492
 Індукцибельний оперон 74
 Ініціація
 — реплікації 96
 — транскрипції 137
 — трансляції 176
 Інсерції 314, 317
 Інтеграза 166, 416
 Інтеграція профага 416
 — ретровірусів 162—169
 Інтерсекси 246
 Інтерстиційні делеції 320
 Інтерференція 227
 Інтрон 70, 82
 Інфекційні агенти клітини 275
 Інформосоми 175, 497
 Інцизія 120
 Інцухт 579

- Капсид 63
 Каріотип 43
 Карта
 — генетична 235, 459
 — рестрикційна 458
 — комплементарній 449
 — цитогенетична 235
 — фізична 459
 Картування у бактерій
 — кон'югаційне 432
 — трансдукційне 437
 Каскадна регуляція 66
 Катенан 62
 κДНК 163
 Кеп 41, 142
 Клітини
 — зародкові 481
 — компетентні 427
 — стовбурові 481
 Кластери генів 71, 86, 637
 Клон 524, 588
 Клонування 605
 Клонуючі вектори 463
 Коінтеграція 345
 Коінциденція 227
 Кoadаптація генетична 560
 Код, властивості 32
 Кодон
 — значущий 32
 — ініціюючий 32
 — термінуючий 176
 Кодомінування 12
 Коефіцієнт добору 550
 Коінтеграція 345
 Коінциденція 227
 Коконверсія 403
 Колінеарність генів та білків 317
 Колхіцин 364
 Компаунд 201
 Компенсація дозова 250
 Комплементарність 204
 Комплементарія
 міжклеточна 201, 209, 456
 Комплон 449
 Конверсія генів 393
 Конкатемер 438
 Конкордантність 617
 Конфігурації мутацій 447
 Конформації ДНК 35
 Кон'югація
 — бактерій 79, 235, 419
 — хромосом 47, 397
 Коректорські властивості ДНК-полі-
 мераз 116
 Корепресор 73, 150
 Котрансдукція 437
 Котрансформація 633
 Криптомерія 204
 Крис-крос-успадкокування 256
 Критерії аделізму 443
 Критерії нехромосомного успадкову-
 вання 262
 Кросинговер 212
 — індукований 234
 — гоніальний 229
 — мітотичний 213, 232
 — мейотичний 213, 232
 — множинний 215
 — нерівний 232
 — рівний 232
 — соматичний 213, 229
 Летальні гени 283, 302
 Літерна послідовність ДНК 73
 Лідируючий ланцюг ДНК 99
 Лізис 62
 Лізогенія 62, 428
 Лізогенні бактерії 63
 Лінії
 — чисті 274, 541
 — з заміщеними хромосомами 370
 — інбредовані 581
 Лінкерна ДНК 52
 Літична інфекція 62
 Локус 11, 192
 Макроеволюція 516
 Маніфестація 652
 Материнський ефект 261
 Матураза 146
 Мейоз 21, 364, 368
 Мейотична поліплоїдія 357
 Мейотичний ефект 377
 Меродиплоїди 425
 Мерозиготи 425, 232
 Метилтрансфераза 119
 Методи
 — близнюковий 616
 — Вайнберга 616
 — відбитків пальців 522
 — генетики людини 613-622
 — гібридизації колоній 463

- гібридизації нуклеинових кислот 467, 673
- делецій, що перекриваються 453
- збагачування 306
- збалансованих леталей 313
- зимограм 520
- концентрування мутантів 306
- Максама-Гілберта 469
- Меллер-5 312
- онтогенетичний 621
- пептидних карт 522
- переривчастої кон'югації 432
- популяційний 619
- реплік 306
- селактивні 632
- селективних середовищ 309
- Сенгера 469
- сибсів 616
- схрещування 188
- SuL/Pm 313
- цитогенетичний 619
- гібридологічного аналізу 8
- xi-квадрат 197
- Міграції або потік генів 546
- Міграція галузки ДНК 399
- Мігруючі (транспозибельні) генетичні елементи 58, 339, 342
- Міжалельна комплементация 201, 456
- Мікроделеші 320
- Мікроеволюція 516, 517
- Мікроклітини 632
- Мікросателіти 87
- Мінісателіти 635, 676
- Мінливість 6
 - комбінаційна 93, 283
 - модифікаційна 283—289
 - мутаційна 284, 289—293
 - полігенна 568
 - соматональна 388
- Мітоз 21
- Мітохондри 25
- Мічені зонди 236
- Множинний алелізм 12, 443
- Множинний сайт клонування 594
- Множинна трансдукція 431
- Мобільні генетичні елементи 233
- Модифікації 112, 284, 278, 288
- Модифікації-рестрикції системи 27
- Мозаїки 300, 362
- Мозаїцизм 229, 300
- Мозаїчні гени 83
- Молекулярна селекція 595
- Моніторинг 387
- Моногенні хвороби 613, 648
- Моносоміки 358
- Морфогенез 482, 483
- Морфогени 490
- Морфози 287
- Мультиплікації 324
- Мутагени 378
- Мутагенез 375 — 391
 - індукований 294, 378
 - сайт-специфічний 295, 385
- Мутагенний ефект
 - іонізуючих опромінь 379
 - ультрафіолетового опромінення 378
- Мутанти
 - ауксотрофи 304, 307
 - супресорнозалежні 303
 - температурнозалежні 303, 309
 - умовно летальні 302
- Мутацій класифікація 291
- Мутації 93, 284
 - ауксотрофності 302
 - біохімічні 292, 301
 - брунькові 300
 - генеративні 292, 299
 - гени 293
 - геномні 293
 - гомейозисні 506
 - доміантні 291
 - індуковані 291
 - істотних генів 310
 - зворотні 292, 296
 - корисні 292
 - місенс 315
 - морфологічні 292, 301
 - нейтральні 292, 315, 528
 - нонсенс 315, 296
 - полярні 456
 - прямі 292, 296
 - рецесивні 291, 295
 - соматичні 292, 299
 - спонтанні 291, 293
 - супресорні 292, 296
 - точкові 292, 314
 - фізіологічні 301, 292
 - умовнолетальні 302
 - хромосомні 292
 - цитоплазматичні 292
 - ядерні 292
- Мутаційна теорія 24
- Мутаційний тиск 547

- Мутаційний тягар 643
 Мутон 479
- Набір генів** 196
 Наддомінування 554
 Надлишковість геномів 57
 Напівконсервативний синтез ДНК 95
 Напівметильовані ДНК 117
 Напівхвізми 399
 Направлений мутагенез 295, 385
 Негістони 51
 Нейтральна еволюція 560
 Нейтральні заміни в ДНК 315
 Непермісивні умови 302
 Нерезипрокна рекомбінація 392
 Нередуковані спори (гамети) 357
 Нереплікаційний синтез ДНК 102
 Нерівний кросинговер 232
 Нерозходження хромосом 258, 259
 Нехромосомне успадкування 261
 Новоутворення 204
 Нозерн-блотинг 143
 Нонсенс-мутації 332
 Нонсенс-супресії 296
 Норма реакції 283
 Нуклеази 29
 Нуклеоїд 25
 Нуклеомер 56
 Нуклеосома 52, 53
 Нулісомики 358
- Обмежений протеоліз** 498
Однозначні гени 207
Ознаки
 — альтернативні 187
 — домігантні 190
 — кількісні 10
 — моногенні 9
 — полігенні 9
 — рецесивні 190
 — якісні 10
- Олігонуклеотиди** 30, 385, 674
Онкогени 167
Онтогенетика 481
Опал-мутації 209, 297
Оператор 58, 72, 149
Оперон 66, 128, 175
 — анаболітний 71
 — арабінозний 76
 — галактозний 78
 — гістидиновий 74
 — катаболітний 71
 — лактозний 72
 — репресибельний 74
 — триптофановий 74
- Ориджин переносу** 420
Організатори ядерцеві 628
Ортоплоїдне число хромосом 361
Основне число хромосом 372
Охра-кодон 209, 297
- Паліндроми** 85, 627
Панміксія 518
Парасексуальний цикл 231
Партеногенез 362
Пенетрантність 198, 652
Перебудови хромосом 319—373
Перекривання генів 68
Перенос генів горизонтальний 277
Пермутація генів 438
Перестановки 314
Перетяжки хромосом 43-44
Пігментна ксеродерма 122, 124
Плазмиди 58, 70, 79
Плазмогени 25, 261
Плазмон 261
Плазмотип 261
Пластом 261
Пластиди 25
Плейотропія 208
Плечі хромосоми 44
Повтори послідовностей ДНК 86
Повтори термінальні 324
Поділи хромосом 358
Позахромосомні елементи клітин 275
Позиційна інформація 490
Полігаплоїди 374
Полімеразна ланцюгова реакція 468, 674
Поліморфізм популяції 527
 — рестрикційний 635
Поліморфність локусів 527
Поліплоїдизація 362
Поліплоїдні ряди 372
Полрибосома 172
Політенні хромосоми 46
Положення гена 199
Положення мутацій 446
Популяція 517
Порода 564
Послідовності ДНК 176
 — зворотні 85
 — значущі 57, 85
 — незначущі 57, 85

- сигнальні 85
- унікальні 86, 628
- Правило чистоти гамет 191
- Праймер 98
- Праймосома 102
- Предетермінація цитоплазми 261
- Пристосованість 549
- Пробанд 615
- Провірус 61, 63, 416
- «Прогулянка по хромосомі» 636
- Проліферація 483
- Промотор 58, 129
- Промутагени 384
- Проретровірус 352
- Протаміни 50
- Протопласти 427
- Профаг 416
- Процесинг 93, 138
 - варіабельний 499
- Псевдоалелізм 445
- Псевдогени 58, 86, 353
- Псевдомінантність 254, 257, 321, 653
- Пуфінг 235, 493
- Рамка зчитування** 32, 67
- Ранні гени вірусів 66
- Раси 556
- Реактивація
 - пряма 118, 119
 - Уейгла 126
- Реасоціація ДНК 84
- Реверсія 296
- Ревертаза 164
- Регенерація 490
- Регулон 76, 496
- Регулювальні ділянки ДНК 58
- Редукція подвійна 365
- Рекомбінатори 401
- Рекомбінація
 - генетична 93, 212
 - консервативна 392
 - незаконна 233, 392
 - нереципрокна 392
 - реплікаційна 233, 392
 - реципрокна 392
 - сайт-специфічна 233, 392, 414
- Рекон 478
- Репарація ДНК 27
 - ексцизійна 119
 - індуквана 124
 - пряма 118
 - рекомбінаційна 122—124
 - світлова 119
 - SOS 124, 125
 - темнова 118
- Реплікатор 48, 422
- Репліказа 60
- Реплікаційна вилка 96
- Реплікони 96
- Репресор 149
- Рестриктази 30, 92, 112—115
- Рестрикція 112
- Ретровірус 60, 163
- Ретроген 353
- Ретропозони 352
- Ретротранспозони 276, 352
- Решітка Пеннета 193
- Рибозими 141, 685
- Рибосоми 27, 33, 94
- РНК**
 - інформаційна 26, 32, 38, 40
 - рибосомна 26, 33, 38
 - транспортна 26, 33, 38
- РНК-віруси**
 - (+) РНК геноми 32, 60
 - (–) РНК геноми 60
- РНК-полімерази 60, 128
- РНК-попередник 83
- Розвиток бактеріофагів 152
- Розщеплення
 - хромосомне 217, 359, 365
 - хроматидне 217, 359, 365
- Сайти**
 - att 166
 - апуринові 30, 111
 - метилювання 114
 - пізнання 111
 - рестрикції 113
 - рецепторний 495
- Самосплайсинг 140
- Сателіт 44
- Сегрегаційний тягар 643
- Секвенування ДНК 469
- Сексдукція 421, 425
- Селекція 563, 572, 595
- Сексвіполіплоїд 368
- Сімейство генів 638
- Сибси 615
- Симбіогенетична гіпотеза 263
- Синдром
 - Блума 124
 - Вольфа—Хиршхорна 661

- Дауна 657
- Едвардса 359, 658
- Клайнфельтера 660
- крику кішки 661
- Леша—Наймана 654
- Патау 658
- Шерешевського—Тернера 659
- Синкаріон 630
- Синтез ДНК 102
- Синтенія 631
- Скринінг 389, 564
- Сорт 564
- Спадкові хвороби 613, 648
- Спадковість 6
 - епігенетична 94, 484
 - сигнальна 609
 - цитоплазматична 261, 263
 - ядерна 23
- Спейсери 58, 86
- Сплаймосома 146
- Сплайсинг 140, 147
- Спороутворення 152
- Спрямований мутагенез 295
- Стать гетерогаметна, гомогаметна 239
- Стерильність 273
- Структура ДНК
 - первинна 30
 - вторинна 33
 - третинна 35
- Структура Холідея 399
- Структурні гени 10, 72
- Ступінчастий алелізм 444
- Суперген 561
- Супермутагени (надмутагени) 294, 381
- Суперпродуценти (надпродуценти) 564
- Суперспіралізація (надспіралізація) 36, 104
- Супресивність 269
- Супресія 202
- Супресорний ген 202
- Супресорні мутації 292
- Супутник хромосоми 44
- Схрещування
 - аналізуюче 188
 - асортативне 541, 645
 - дигібридне 188
 - зворотне 188
 - моногібридне 188
 - неспоріднене (аутбридинг) 575
 - реципркне 188
 - споріднене (інбридинг) 575, 645
- Таутомери 382
- Теломера 49
- Теломераза 110
- Теорії
 - біохімічного збагачення 582
 - визначення статі 245
 - гена центрова 445
 - домінантності 296, 582
 - наддомінування 582
 - компенсаційних комплексів генів 583
 - мішені 380
 - нерівномірного розподілу морфогенів 486
 - однакових генетичних потенцій 486
 - ядерної спадковості 23
- Тератогенез 649
- Термінатори 58, 72, 129, 138
 - р-залежні 131, 154
 - р-незалежні 131, 153
- Термінація 96
- Термінуючий триплет 32
- Тестикулярна фемінізація 251
- Тест на комплементацию 443
- Тест-системи 389
- Тест цис-транс 447
 - лімфоцитарної токсичності 640
- Тетрадний аналіз 191, 216
- Типи успадковування 615
- Типи реплікації
 - Y-тип 99
 - сигма-тип 95, 100
 - тета-тип 100
- Тиск мутацій 547
- Топоізомерази 37, 104, 166
- Топологічні ізомери 104
- Тотипотентність 484
- Транзиції 315
- Транс-гетерозигота 448
- Трансверсії 315
- Трансгеноз 591
- Трансдетермінація 506
- Трансдукція 235, 417, 419, 428
 - абортівна 429
 - загальна 429
 - множинна 431
 - обмежена 429
- Транскрипт 83
- Транскриптон 129, 176
- Транскрипція 27, 93, 128
 - диференційна 491

- зворотна 162
- Транслокації 182, 319, 335
- Трансляція 27, 94, 128
 - диференційна 497
- Транспозаза 339, 345
- Транспозиція 93, 233, 338
 - вереплікативна 347
 - реплікативна 345
- Транспозони 346
- Транс-сплайсинг 147
- Трансфекція 428
- Трансформація 235, 419
- Трейлер 176
- Триплет 31
- Тубулін 364

- Убіквітин 51
- Ультрафіолетова ендонуклеаза 120
- Унікальні послідовності 85
- Успадковування 6, 187
 - аутосомно-домінантне 651
 - аутосомно-рецесивне 652
 - голандричне 656
 - материнське, батьківське, змішане 272
 - епігенетичне 288
 - зчеплене 210
 - зчеплене зі статтю 255
 - Х-зчеплене у людини 653
 - цитоплазматичне 656
 - Y-зчеплене у людини 656
- УФ-індукований мутагенез 378

- Фаги
 - помічники 431, 683
 - дефектні 417, 430
 - трансдукуючі 417
- Фазування нуклеосом 54
- Факторіальна гіпотеза спадковості 190
- Фактори
 - динаміки популяцій 540
 - компетентності клітин 427
 - транскрипції 133, 510
 - трансляції 176
- Фармакогенетика 612, 670
- Фен 10
- Фенокопія 287
- Фенотиповий індекс 194
- Фізіологічна теорія мутагенезу 375
- Філогенетичне дерево генів 326

- Фосфодіестерази 29
- Фотоліаза 119
- Фрагменти Оказаки 99

- Харді—Вайнберга закон 353
- Хелікази 102
- Хіазма 215
- Хіазмотипія 215
- Химери 300, 362
- Хлоропласти 271
- Хондріом 261
- Хорея Гектінгтона 621
- Хроматиди 46
- Хроматин 43
- Хромомер 56
- Хромосоми 42
 - акроцентричні 44
 - гігантські 46
 - гетерологічні 43
 - гомеологічні 368
 - гомологічні 43
 - кросоверні 215
 - метацентричні 44
 - нерозходження 357
 - політенні 46
 - рекомбінантні 215
 - статеві 238
 - субметацентричні 44
 - телоцентричні 44
- Хромосомна теорія спадковості 24, 236, 442
- Хромосомні перебудови 319
 - внутрішньохромосомні 318
 - геномні 318
 - міжхромосомні 318

- Центральна догма молекулярної біології 93, 285
- Центри
 - активні рибосоми 173
 - доместикації 564
 - походження культурних рослин 564
- Центричне злиття 319
- Центричний поділ 319, 358
- Центромера 43, 49, 264
- Центромерний індекс 623
- Цикл парасексуальний 231
- Цис-активні послідовності 10, 149
- Цис-гетерозигота 448

Цис-транс-тест 447
Цистрон 450, 478
Цитогенетика
— молекулярна 619
— людини 611
Цитогета 272
Цитологічний метод 9
Цитоплазма 23
Цитоплазматична спадковість 25
Цитотип 481
Цитофлуорометрія 626

Частота
— алельних генів 533
— генотипів 533

— кросинговеру 223
Чистоти гамет правило 191
Чоловіча стерильність у рослин 273

Штам 564
Штами полауксотрофні 307
Штучне регулювання статі 253
Штучний андрогенез 253
Штучний добір 578
Штучні хромосоми 48

Ядерна теорія спадковості 23
Ядерцевий організатор 44, 628
Ядро 23

Зміст

Передмова	3
Розділ 1. Генетика як наука	6
1.1. Основна мета та проблеми генетики	6
1.2. Зв'язок генетики з іншими науками. Методи генетики	8
1.3. Окремі поняття та термінологія	9
1.4. Алельність гена та множинний алелізм	11
1.5. Скорочене позначення генів у генетиці	13
1.6. Основні етапи розвитку генетики	13
1.7. Розвиток генетики в Україні	17
 Частина I. МАТЕРІАЛЬНІ ОСНОВИ СПАДКОВСТІ	
Розділ 2. Клітина як носій генетичної інформації	21
2.1. Роль ядра і цитоплазми в спадковості	23
2.2. Нуклеїнові кислоти як носії і гаранті реалізації генетичної інфор- мації	26
2.2.1. Первинна структура нуклеїнових кислот	27
2.2.2. Макромолекулярна організація ДНК	33
2.2.3. Макромолекулярна структура РНК	37
2.3. Хромосоми. Роль хромосом у спадковості	42
2.3.1. Морфологія хромосом. Каріотип	43
2.3.2. Гігантські хромосоми	46
2.3.3. Штучні хромосоми еукаріотів	48
2.4. Молекулярна і надмолекулярна організація хромосом еукаріотів ..	49
2.4.1. Гістони	50
2.4.2. Негістонні білки хроматину	51
2.4.3. Надмолекулярна організація хромосом еукаріотів	52
Розділ 3. Організація і функція геномів	57
3.1. Деякі загальні риси організації та функції геномів	57
3.2. Геноми вірусів	59
3.3. Структура і функція геномів бактерій	70
3.3.1. Гени та оперони	71
3.3.2. Плазмиди та епісоми	79

3.4. Геноми еукаріотів	81
3.4.1. Особливості будови генів еукаріотів	83
3.4.2. Типи нуклеотидних послідовностей еукаріотних геномів	84

Частина II. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ НАЙВАЖЛИВІШИХ ГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Загальна характеристика молекулярногенетичних процесів	91
--	----

Розділ 4. Реплікація ДНК як передумова передачі генетичної інформації нащадкам	95
4.1. Загальна характеристика процесів реплікації	95
4.2. Білки реплікації, їх генна детермінація	102
4.3. Механізми реплікації ДНК у кишкової палички	107
4.4. Особливості реплікації ДНК еукаріотів	109

Розділ 5. Генетичні процеси, що забезпечують відносну стабільність геному	111
5.1. Системи модифікації і рестрикції ДНК у бактерій	112
5.2. Системи виправлення помилок реплікації	116
5.3. Механізми репарації ушкодженої ДНК	118
5.3.1. Пряма реактивація ушкоджених молекул ДНК	119
5.3.2. Екзцизійна репарація ДНК	119
5.3.3. Постреплікаційна (рекомбінаційна) репарація	122
5.3.4. Системи індукованої репарації. SOS-репарація	124

Розділ 6. Механізми реалізації генетичної інформації	128
6.1. Транскрипція	128
6.1.1. Промотори і термінатори. Транскриптон	129
6.1.2. ДНК-залежні РНК-полімерази	132
6.1.3. Цикл ДНК-залежної транскрипції	135
6.1.4. Процесинг первинних транскриптів	138
6.1.5. Основні шляхи регуляції транскрипції	148
6.1.6. Особливості реплікації/транскрипції геномів РНК-вірусів	155
6.1.7. Зворотна траскрипція і життєвий цикл ретровірусів	162
6.2. Трансляція	169
6.2.1. Молекулярна організація рибосом	169
6.2.2. Інформаційна РНК як матриця для синтезу білка	173
6.2.3. Механізми трансляції	178

Частина III. ЗАКОНОМІРНОСТІ УСПАДКОВУВАННЯ ХРОМОСОМНИХ І НЕХРОМОСОМНИХ ГЕНІВ

Розділ 7. Незалежне (менделівське) успадкування	187
7.1. Гібридологічний аналіз та типи схрещувань	187
7.2. Закономірності незалежного успадкування	189
7.3. Відхилення від менделівських формул розщеплення за незалежного успадкування генів	196
7.3.1. Причини відхилень від формул менделівського розщеплення ..	196

7.3.2. Взаємодія генів як одна із причин відхилень у розщепленні за фенотипом	200
7.3.3. Біохімічні механізми взаємодії генів	208
Розділ 8 Зчепне успадкування і кросинговер	210
8.1. Закономірності успадкування за повного і неповного зчеплення генів	210
8.2. Цитологічні докази кросинговеру	215
8.2.1. Тетрадний аналіз як метод дослідження кросинговеру	215
8.2.2. Інші цитологічні докази кросинговеру	219
8.3. Генетичні докази кросинговеру	222
8.4. Величина кросинговеру і побудова генетичних карт	223
8.5. Інтерференція і коінциденція	227
8.6. Розрахунок частоти кросинговеру по розщепленню в F_2	228
8.7. Мітотичний кросинговер і картування генів	229
8.8. Деякі загальні дані про генетичну рекомбінацію	232
8.9. Регуляція кросинговеру	234
8.10. Порівняння генетичних і цитологічних карт	235
Розділ 9 Стать і зчепне зі статтю успадкування	238
9.1. Генетика статі	238
9.1.1. Типи хромосомного визначення статі	239
9.1.2. Докази хромосомного визначення статі	241
9.1.3. Гени, що визначають та змінюють стать	244
9.1.4. Теорії визначення статі	245
9.1.5. Гетерохромосоми і дозова компенсація	247
9.1.6. Особливості визначення статі у ссавців	250
9.1.7. Кількісне співвідношення особин різної статі і його регуляція	252
9.1.8. Методи штучного регулювання статі	252
9.2. Успадкування ознак, зчеплених зі статтю	254
9.2.1. Особливості успадкування за повного і неповного зчеплення зі статтю	255
9.2.2. Особливості успадкування за нерозходження статевих хромосом	258
Розділ 10. Нехромосомне успадкування	261
10.1. Цитоплазматична спадковість	263
10.1.1. Мітохондрії і пластиди як носії генетичної інформації	263
10.1.2. Методи вивчення структури та функцій хондріому	268
10.1.3. Методи дослідження структури та функцій пластоми	271
10.1.4. Ознаки, що контролюються генами і цитоплазми, і хромосом	273
10.2. Інфекційні агенти і позахромосомні елементи клітин	275
10.3. Предетермінація цитоплазми або материнський ефект	277

Частина IV. ГЕНЕТИЧНІ ЗАСАДИ МІНЛИВОСТІ

Розділ 11. Типи мінливості. Модифікації і мутації	283
11.1. Класифікація мінливості	283
11.2. Модифікаційна мінливість	284

11.3.	Мутаційна мінливість	289
11.3.1.	Мутації і модифікації, їх відмінності	290
11.3.2.	Класифікація мутацій	291
11.3.3.	Загальна характеристика деяких типів мутацій	293
11.4.	Методи вивчення мутацій	303
11.4.1.	Дослідження мутацій у мікроорганізмів	304
11.4.2.	Дослідження мутацій у еукаріотів	310
11.5.	Генні (точкові) мутації	314
11.6.	Хромосомні мутації	318
11.6.1.	Загальна характеристика та класифікація	318
11.6.2.	Перебудови хромосом, що впливають на кількість інформації в геномі	319
11.6.3.	Перебудови хромосом, що змінюють локалізацію генів	329
11.7.	Перебудови, що змінюють кількість хромосом	357
11.7.1.	Злиття та поділи хромосом	358
11.7.2.	Анеуплоїдія	358
11.7.3.	Поліплоїдія	361
11.7.4.	Гаплоїдія	373
11.8.	Механізми спонтанного та індукованого мутагенезу	375
11.8.1.	Передмутаційні зміни генетичного матеріалу. Фізіологічна теорія мутагенезу	375
11.8.2.	Мутагенні чинники і ДНК	378
11.9.	Екологія і мутагенез	386
Розділ 12. Генетична рекомбінація як механізм комбінаційної мінливості		
12.1.	Молекулярні механізми загальної генетичної рекомбінації і конверсії генів	393
12.1.1.	Гіпотези «розрив-воз'єднання» та «копі-чойз»	394
12.1.2.	Молекулярні механізми загальної (гомологічної) рекомбінації	396
12.1.3.	Молекулярні механізми конверсії генів	402
12.1.4.	Особливості загальної рекомбінації у вірусів	403
12.1.5.	Спеціалізовані системи гомологічної рекомбінації	404
12.1.6.	Спеціалізована соматична рекомбінація і гени імуноглобулінів у ссавців	407
12.2.	Сайт-специфічна рекомбінація	414
12.3.	Генетична рекомбінація у бактерій	419
12.3.1.	Плазмиди, епісоми і рекомбінація у бактерій за кон'югації	420
12.3.2.	Трансформація як процес, що веде до рекомбінації	426
12.3.3.	Генетична рекомбінація в явищах трансдукції	428
12.4.	Принципи побудови генетичних карт у бактерій	431
12.5.	Принципи генетичного картування бактеріофагів	438
Частина V. ОКРЕМІ ПРОБЛЕМИ ГЕНЕТИКИ		
Розділ 13. Проблеми дослідження гена		
13.1.	Хромосомна теорія спадковості і класичні уявлення про ген	441
13.2.	Непрямі методи дослідження гена	443
13.2.1.	Критерії аелізму	443

13 2 2	Концепція ступінчатого алелізму та псевдоалелізму	444
13 2 3	Цис-транс-тест і побудова генетичних карт	447
13 2 4	Комплементацийний аналіз у еукаріотів	450
13 2 5	Рекомбінаційний тест і тонка структура гена	452
13 2 6	Рекомбінаційний тест і тонка структура генів еукаріотів	455
13 2 7	Деякі обмеження цис-транс-тесту. Міжжалельна комплементация	456
13 3	Ген с позицій молекулярної генетики	457
13 3 1	Деякі прями методи дослідження гена	458
13 3 2	Ген як одиниця функції	476
Розділ 14	Генетичні аспекти онтогенезу	481
14 1	Онтогенетика. Об'єкти і методи	481
14 2	Деякі загальні закономірності та стадії індивідуального розвитку	483
14 3	Генетична детермінація і диференціація клітин. Тотипотентність	485
14 4	Диференційна активність генів і її регуляція в процесі розвитку	491
14 5	Взаємодія генів у процесі розвитку	499
14 6	Летальна диференціація клітин за розвитку еукаріотів	502
14 7	Генетичні моделі на прикладі дрозофіли та інших об'єктів	504
14 8	Деякі узагальнення щодо генетичної регуляції розвитку	514
Розділ 15	Генетика популяцій	516
15 1	Генетика популяцій і її значення	516
15 2	Популяція — одиниця еволюційного процесу	517
15 3	Методи вивчення структури популяцій	518
15 4	Генетична гетерогенність природних популяцій, її визначення та оцінка	523
15 5	Деякі показники генетичної мінливості популяцій	526
15 6	Частоти генів та генотипів у популяції	532
15 7	Закон Харді—Вайнберга	535
15 8	Практичне використання формули Харді—Вайнберга	537
15 9	Фактори динаміки генетичної структури популяцій і мікроеволюція	540
15 9 1	Відсутність або обмеження панміксії	540
15 9 2	Обмеження чисельності популяцій (дрейф генів)	543
15 9 3	Міграції особин або потік генів	546
15 9 4	Мутаційний процес (тиск мутацій)	547
15 9 5	Вплив добору	548
15 10	Генетична структура популяцій, адаптація і еволюція	555
Розділ 16	Генетичні основи селекції	563
16 1	Селекція як наука	563
16 2	Сорти, породи і штами як засоби виробництва	564
16 3	Моделі сортів і порід	566
16 4	Генетика кількісних ознак у селекції	567
16 5	Основні етапи селекційного процесу	571
16 6	Створення вихідного матеріалу для селекції	571
16 6 1	Комбінаційна мінливість як джерело вихідного матеріалу	572
16 6 2	Мутаційна мінливість як джерело вихідного матеріалу	573
16 7	Типи схрещувань у селекції	575

16.8. Типи добору	578
16.9. Гетерозис у селекції	580
16.10. Селекція сільськогосподарських рослин і тварин в Україні	584
16.11. Селекція мікроорганізмів	587
16.12. Нетрадиційні методи селекції	591
16.12.1. Генетична інженерія	591
16.12.2. Методи генетики та селекції соматичних клітин	604
Розділ 17. Генетика людини та медична генетика	608
17.1. Історія генетики людини: виникнення двох концепцій	609
17.2. Основні напрямки наукових досліджень	611
17.3. Методи генетики людини. Типи успадковування	613
17.4. Хромосоми людини та методи їх дослідження	622
17.5. Геном і картування генів людини	626
17.5.1. Гібридизація клітин у культурі і картування генів	630
17.5.2. Картування генів за допомогою хромосомних перебудов	633
17.5.3. Картування геному за допомогою ДНК-зондів	634
17.5.4. Гібридизація мічених зондів і метафазних хромосом in situ	636
17.5.5. Деякі особливості генетичної карти людини	637
17.6. Спадковість і патологія	643
17.6.1. Деякі сучасні узагальнення на рівні популяцій	643
17.6.2. Класифікація спадкових хвороб і їх успадковування	648
17.6.3. Генетичний поліморфізм і патологія	664
17.6.4. Генна терапія, досягнення та перспективи	678
Рекомендована література	687
Авторський покажчик	689
Предметний покажчик	693

Навчальне видання

ТОЦЬКИЙ Владлен Миколайович

ГЕНЕТИКА

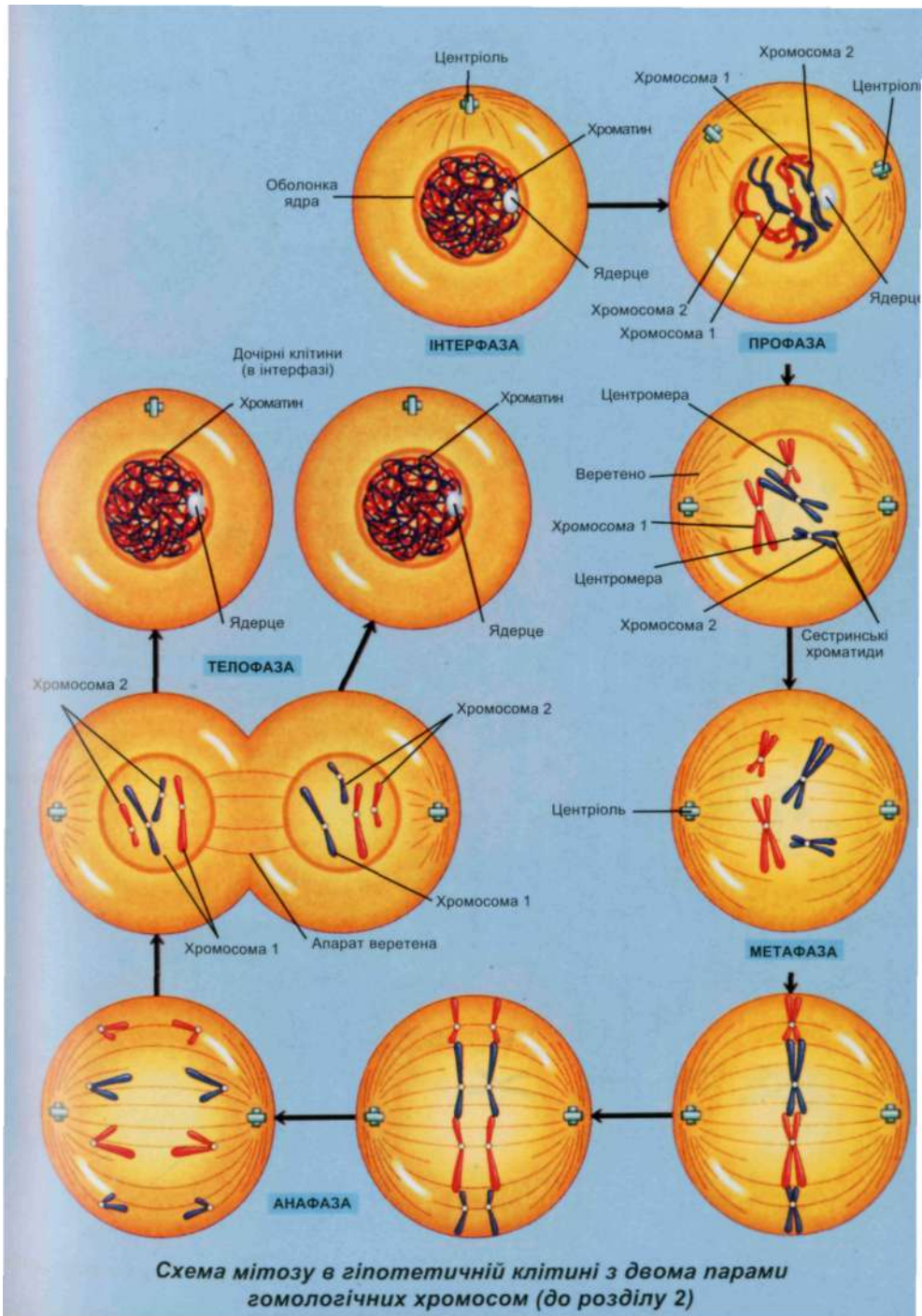
2-е видання,
виправлене та доповнене

Підручник

Зав. редакцією *Т. М. Забанова*
Редактор *Ж. Б. Мельниченко*
Технічні редактори *Р. М. Кучинська,*
Д. М. Островеров

Здано до набору 12.11.2001. Підписано до друку 06.08.2002. Формат 60×84/16. Папір офсетний. Гарнітура Літературна. Друк офсетний. Ум. друк. арк. 41,39. Обл.-вид. арк. 40,17. Тираж 1000 прим. Зам. № 776.

Видавництво і друкарня «Астропринт»
(Свідоцтво ДК № 132 від 28.07.2000 р.)
65026, м. Одеса, вул. Преображенська, 24.
Тел.: (0482) 26-98-82, 26-96-82, 37-14-25.
www.astroprint.odessa.ua



МЕЙОЗ I

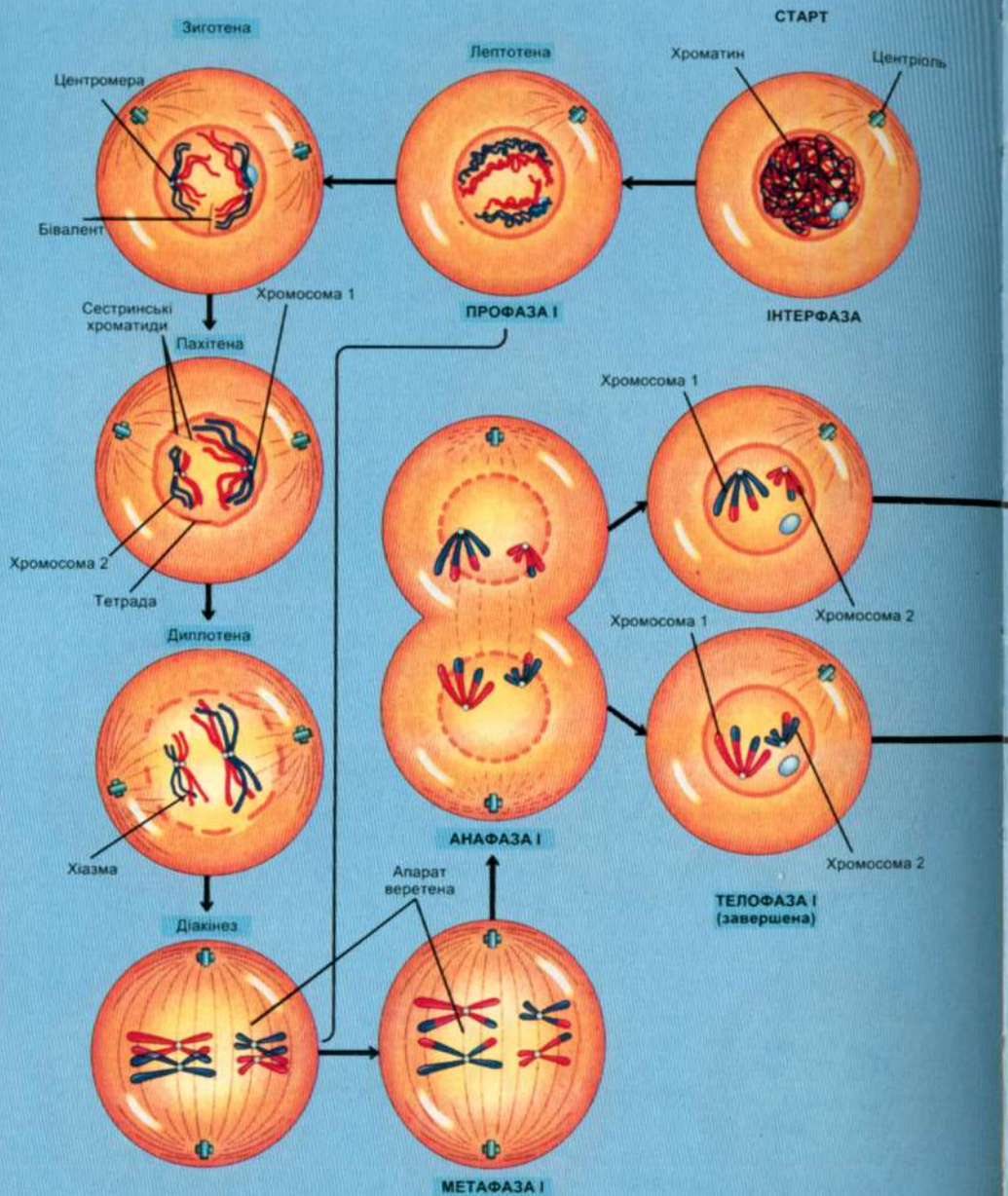
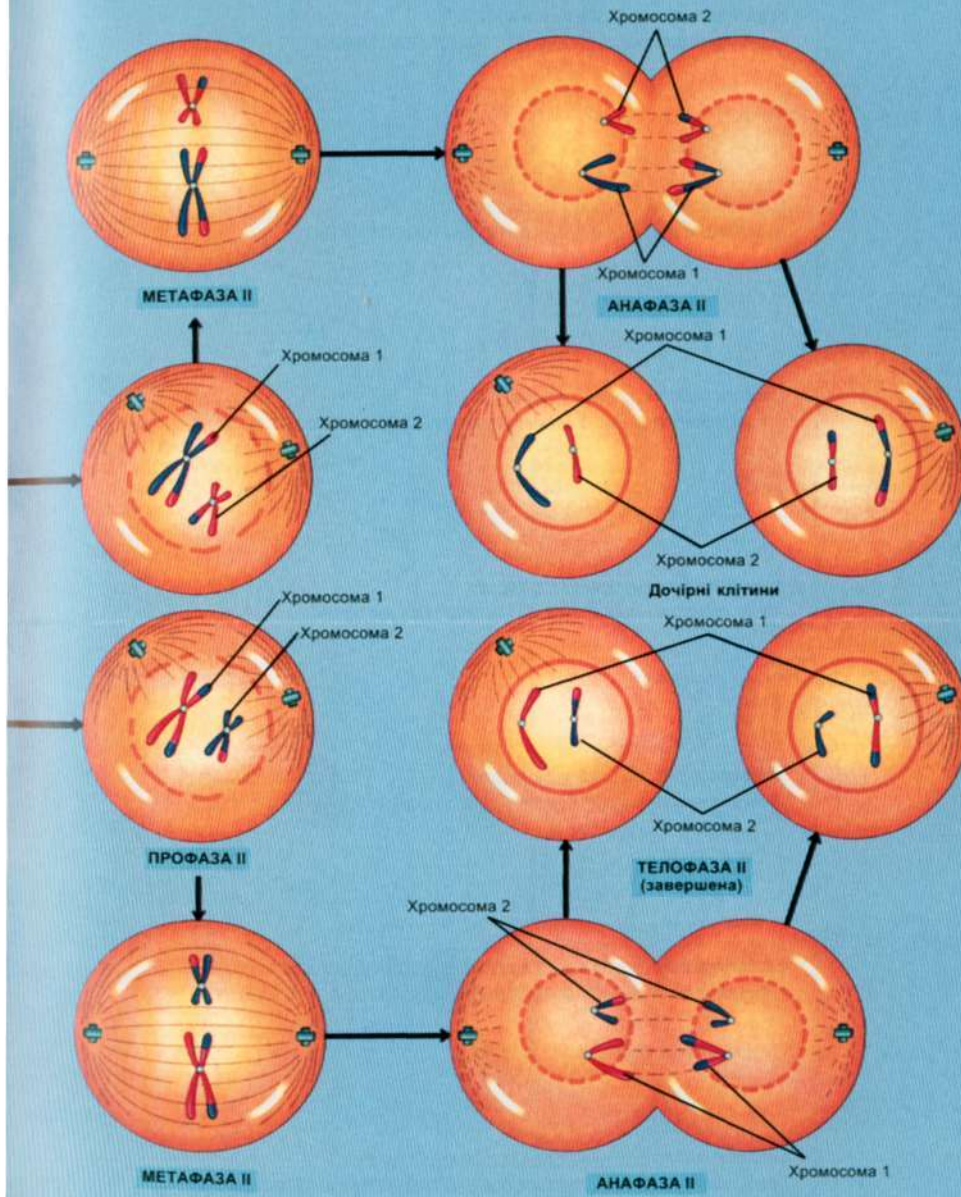
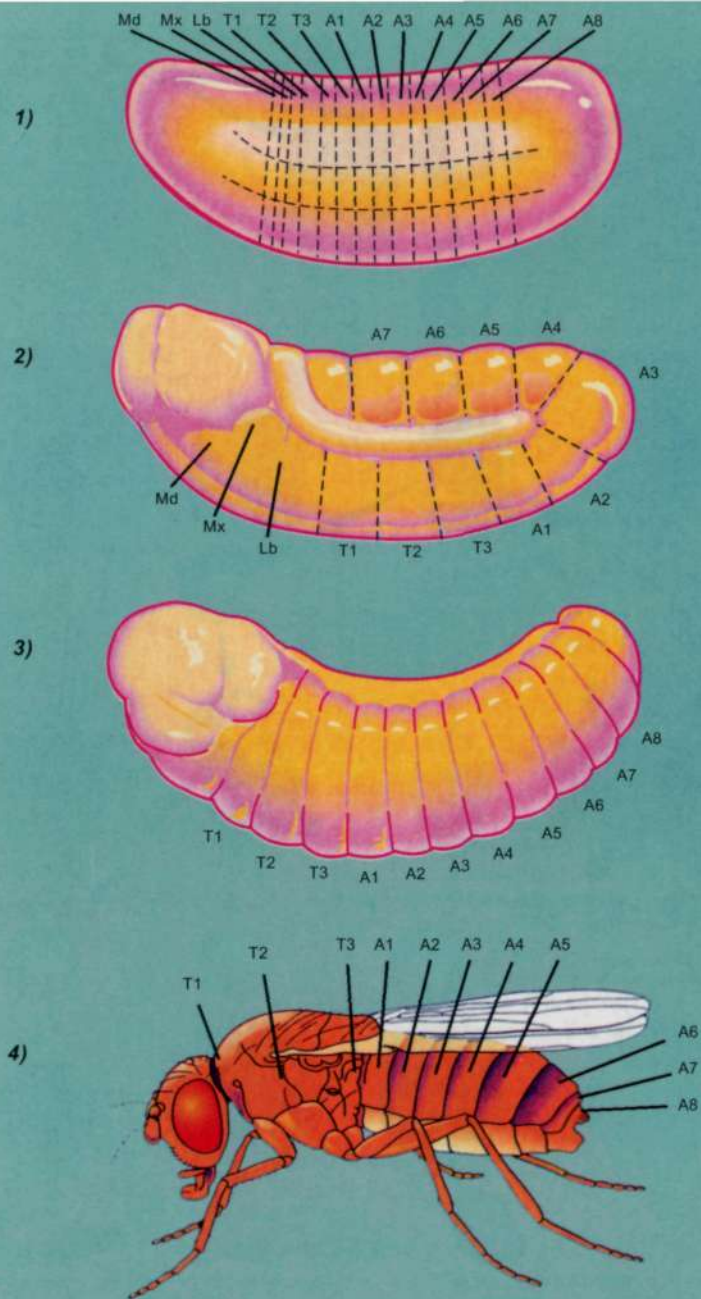


Схема мейозу в гіпотетичній генеративній

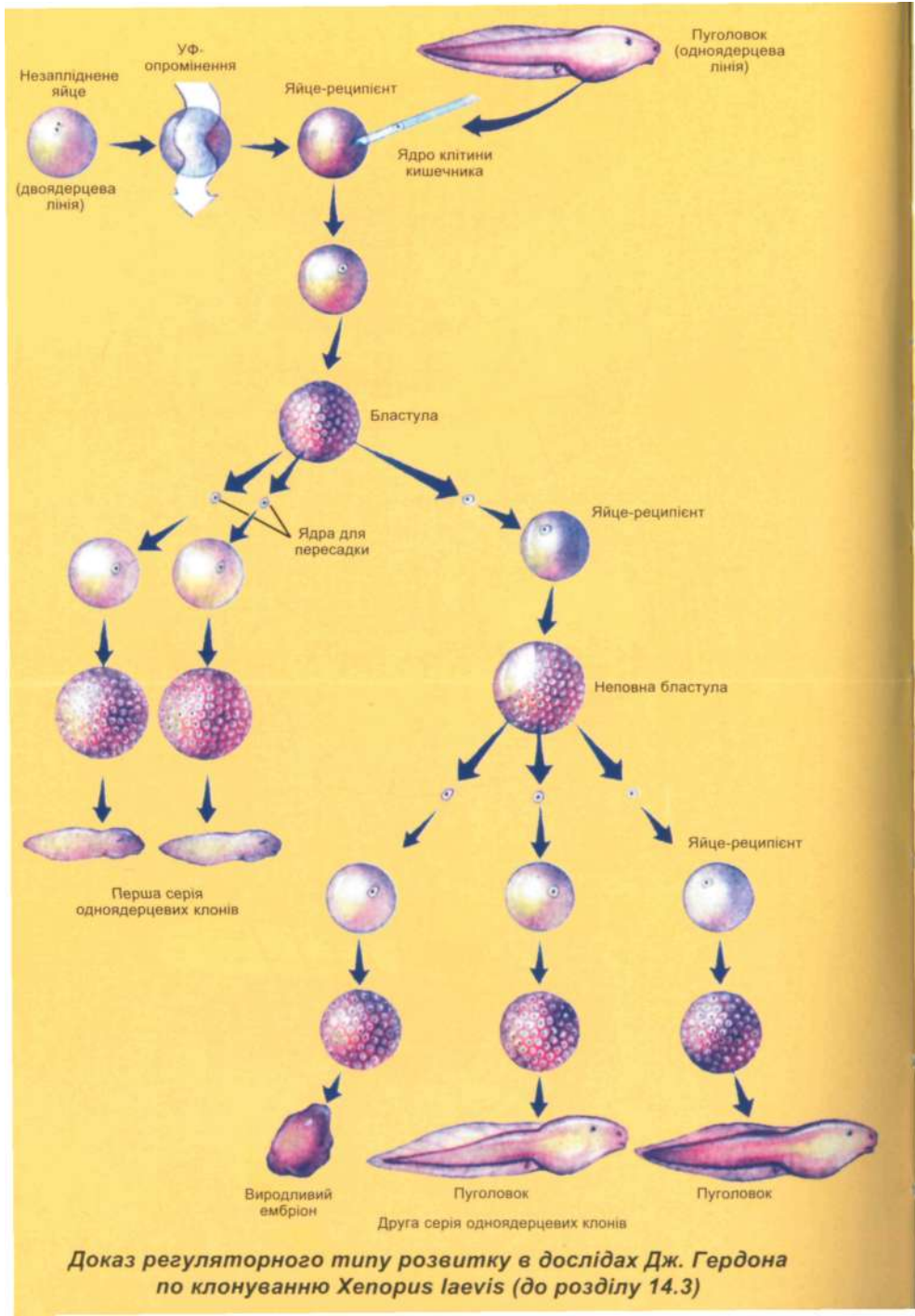
МЕЙОЗ II



клітині з двома парами хромосом (до розділу 2)

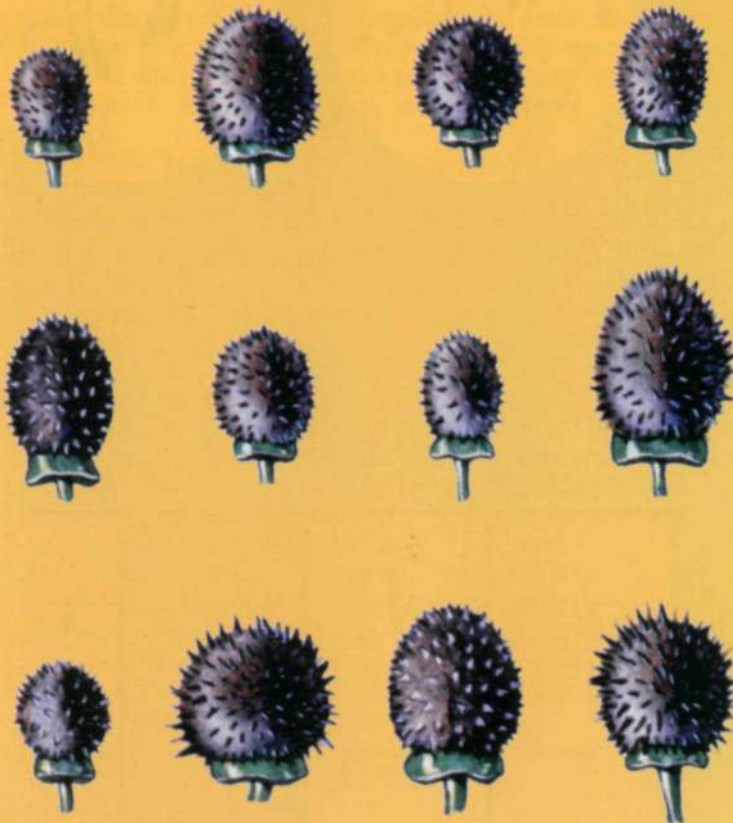


*Пізній ембріогенез у дрозофіли.
Сегментація тіла на різних (1-4) стадіях розвитку (до розділу 14.7)*

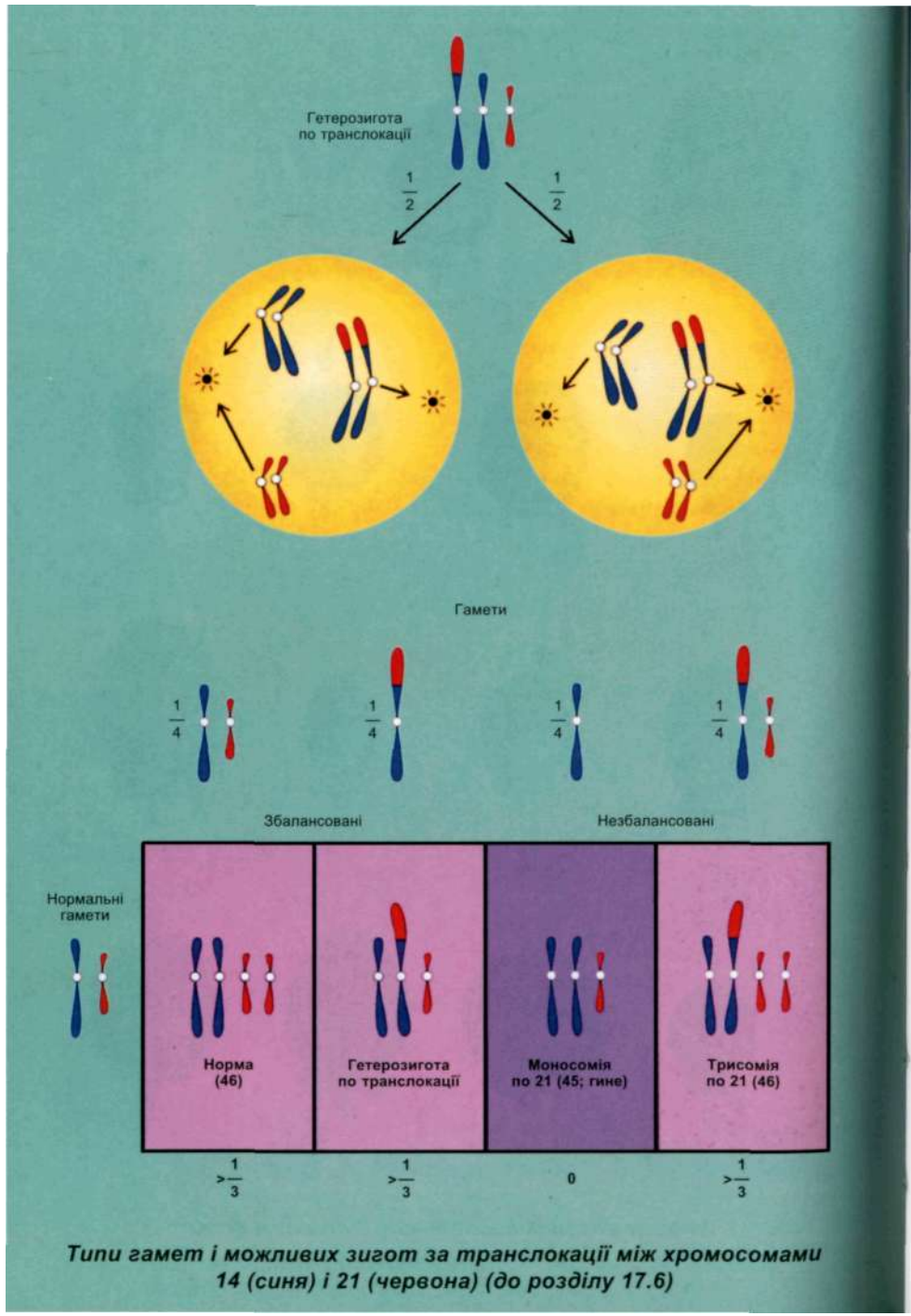




Норма

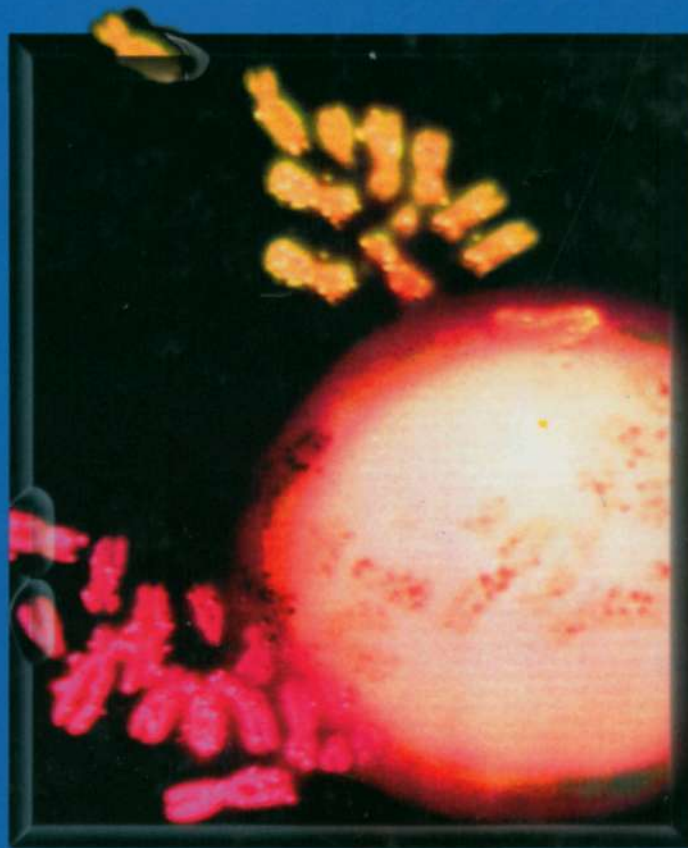


Форма насінної коробочки у дурману в нормі та в усіх 12 варіантах трисомії (до розділу 11.6)



В. М. ТОЦЬКИЙ

ГЕНЕТИКА



ВИДАННЯ
ДРУГЕ