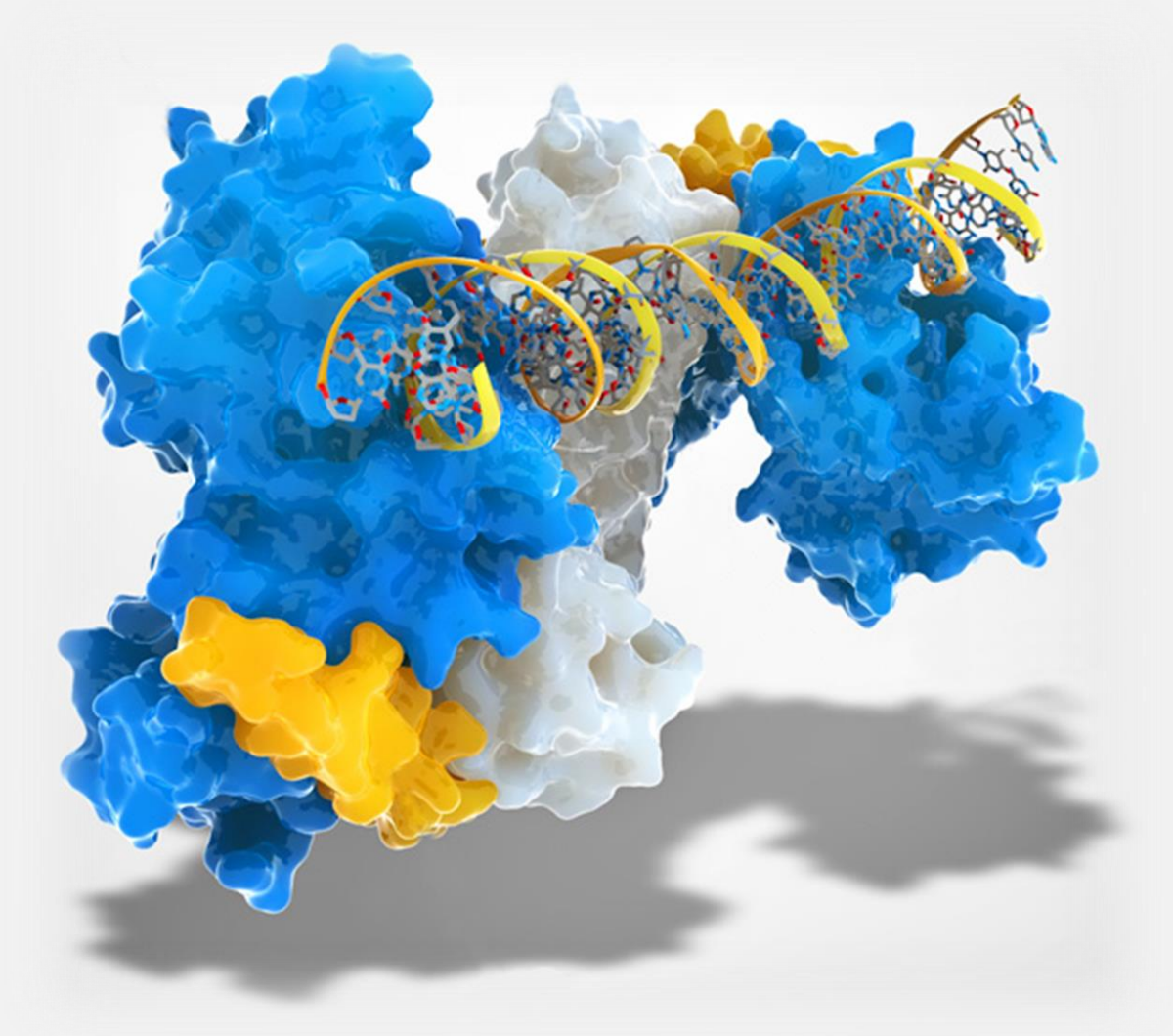
МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА ТА ТЕХНОЛОГІЇ ДОСЛІЖЕННЯ ГЕНОМА



МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА ТА ТЕХНОЛОГІЇ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМА

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Рекомендовано Міністерством освіти і науки України

Миколаїв
МНАУ
2014

УДК 577.21
ББК 28.04
М75

Авторський колектив: М. І. Гиль
О. Ю. Сметана
О. І. Юлевич
Є. В. Баркарь
І. Ю. Горбатенко
Т. І. Нежлукченко
Д. І. Барановський
М. Г. Повод

Рекомендовано Міністерством освіти і науки України як навчальний посібник для підготовки фахівців з напрямку 6.051401 – «Біотехнологія» (лист № __ від _____ р).

Друкується за рішенням вченої ради Миколаївського національного аграрного університету від 25.12.2013 р., протокол № 4.

Рецензенти:

В. І. Ніколайчук – д-р біол. наук, професор, Почесний академік АН Угорщини, Заслужений діяч науки і техніки України, Лауреат Державної премії в галузі науки і техніки, проректор Ужгородського національного університету;

О. М. Дуган – д-р біол. наук, професор, завідувач кафедри промислової біотехнології, декан факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут»;

С. І. Ковтун – д-р с.-г. наук, професор, член-кореспондент НААН, головний вчений секретар Національної академії аграрних наук України;

В. В. Дзіцюк – д-р с.-г. наук, професор, директор ННІ тваринництва та водних біоресурсів Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Молекулярна генетика та технології дослідження геному : навч. посіб. / [М. І. Гиль, О. Ю. Сметана, О. І. Юлевич та ін.] ; за ред. професора М. І. Гиль. – Миколаїв : МНАУ, 2014. – 280 с.

М75

ISBN

У навчальному посібнику подано теоретичні основи молекулярно-генетичних процесів, які мають розвиток і використання в народному господарстві країни та поширені у світі, а також є актуальними для біотехнологічної галузі, агропромислового виробництва.

Автори приділили увагу поясненню сутті основних генетичних процесів молекулярного рівня організації матерії, зокрема будови спадкового апарату й структурної організації геномів біоти, механізмів передачі спадкової інформації та її реалізації у вигляді пептидних сполук, регуляції активності генів, захисту і відновлення спадкового апарату, технологій рекомбінантної ДНК, генетичної інженерії, ДНК-технології дослідження генома.

Навчальний посібник містить детальну інформацію і розрахований на студентів напряму підготовки 6.051401 – «Біотехнологія».

УДК 577.21
ББК 28.04

© Миколаївський національний аграрний університет, 2014

ISBN

© Гиль М.І., Сметана О.Ю., Юлевич О.І. та ін., 2014

ЗМІСТ

		Стор.
Вступ		6
1.	Будова спадкового матеріалу	10
	1.1. Нуклеїнові кислоти – носії спадковості. Історичні аспекти	10
	1.2. Хімічний склад і будова нуклеїнових кислот	15
	1.3. Модель структури ДНК Watson-Crick та підтвердження її дієвості	17
	1.4. Варіанти конформацій подвійних спіралей нуклеїнових кислот	22
	Питання для контролю	26
2.	Структурна організація геномів біоти	27
	2.1. Особливості геномів вірусів та їх економічність	27
	2.2. Особливості структури геномів і генів прокаріот	35
	2.3. Структурна організація геному еукаріот	40
	Питання для контролю	54
3.	Відтворення генетичної інформації	56
	3.1. Загальні особливості реплікації ДНК	56
	3.2. Реплікація ДНК прокаріот	57
	3.3. Особливості реплікації еукаріотичної ДНК	61
	3.4. Особливості реплікативного комплексу архей	63
	3.5. Способи реплікації різних геномів	64
	Питання для контролю	68
4.	Транскрипція та її регуляція	70
	4.1. Реалізація генетичної інформації	70
	4.2. Загальні особливості транскрипції	72
	4.3. ДНК-залежні РНК-полімерази	75
	4.4. Етапи транскрипції	80
	4.5. Хроматин під час транскрипції	95
	4.6. Концепція транскриптосоми	98
	Питання для контролю	99
5.	Котранскрипційна і посттранскрипційна модифікація РНК	100
	5.1. Загальні особливості і типи РНК	100
	5.2. Процесинг попередників РНК у бактерій	110

5.3. Процесинг попередників мРНК еукаріот 113
5.4. Процесинг попередників рРНК і тРНК еукаріот 125
Питання для контролю 128
6. Біосинтез білку на рибосомах 129
6.1. Генетичний код і його властивості 129
6.2. Білоксинтезуюча система 136
6.3. Загальні відомості щодо механізму трансляції 139
6.4. Активація амінокислот 141
6.5. Ініціація біосинтезу білка 143
6.6. Елонгація поліпептидних ланцюгів 147
6.7. Термінація та реініціація синтезу білків 150
6.8. Полісоми 152
6.9. Біосинтез мітохондріальних білків 153
6.10. Біосинтез білків хлоропластів 156
6.11. Котрансляційні і посттрансляційні модифікації білків 157
Питання для контролю 163
7. Регуляція експресії генів 165
7.1. Загальні відомості про механізми регуляції експресії генів 165
7.2. Регуляція транскрипції генів у прокаріот 167
7.3. Модель регуляції експресії *Lac*-оперона *E.coli* за F.Jacob і J.Monod 168
7.4. Особливості регуляції експресії генів еукаріот 172
7.5. Структура хроматину як регулятор експресії генів 178
7.6. Метилування ДНК у регуляції експресії генів 180
7.7. Інгібітори біосинтезу білка 182
Питання для контролю 184
8. Захист і відновлення спадкового апарату 185
8.1. Загальні відомості 185
8.2. Основні мутагенні чинники 186
8.3. Особливості репарації ДНК від пошкоджень 190
8.4. Механізми прямої репарації ДНК 192
8.5. Механізми ексцизійної репарації ДНК 195
8.6. Механізми постреплікативної репарації ДНК 200
Питання для контролю 203

9. Генетична інженерія та геноміка 204
9.1. Значення генетичної інженерії 204
9.2. Ферменти генетичної інженерії 206
9.3. Методи отримання генів 210
9.4. Розподілення фрагментів ДНК і будова рестрикційних карт (фізичне картування) 211
9.5. Методи конструювання рекомбінантних ДНК 214
9.6. Види векторів 218
9.7. Геномна бібліотека (банк генів) 222
9.8. Перенесення генів до клітин організму-реципієнта 223
9.9. Ідентифікація клітин-реципієнтів, які отримали бажаний ген (гени) 226
9.10. Основи геноміки 227
Питання для контролю 236
10. ДНК-технології дослідження генома 238
10.1. Загальний опис методів 238
10.2. РНКазне розщеплення 239
10.3. Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез 240
10.4. Полімеразна ланцюгова реакція 246
10.5. Секвенування ДНК 264
Питання для контролю 269
Іменний покажчик 270
Термінологічний покажчик 271
Список використаної літератури 275

ВСТУП

Називаючи структуру хромосомних ниток «закодованим листом», ми маємо на увазі, що всеосяжний розум за цією структурою може передбачити, чи дане яйце в належних умовах перетвориться в чорного півня чи в строкату курку, в муху або в рослину кукурудзи, в жука, в мишу або в жінку… Але цей термін «закодований лист», звісно занадто вузький. Хромосомні структури слугують, окрім того, й інструментом, що здійснює розвиток, який вони визначають. Вони і кодекс законів, і виконавча сила, або (використовуючи іншу аналогію) вони і архітектурний проект, і будівельна бригада водночас.

Erwin Rudolf Josef Alexander Schrödinger

У зберіганні, передачі та перетворенні генетичної інформації центральне місце займають нуклеїнові кислоти. Вирішальним чинником при цьому є здатність нуклеїнових кислот до специфічного (комплементарного) поєднання. Ці процеси детальніше розглядаються в наступних розділах.

Передача генетичної інформації здійснюється за допомогою трьох механізмів: реплікації, транскрипції та трансляції.

Зберігання інформації. Генетична інформація закодована в послідовності нуклеотидів дезоксирибонуклеїнових кислот (ДНК; англ. DNA), організованої у функціональні ділянки, що названі *генами*. Рибонуклеїнові кислоти (РНК; англ. RNA), як носій генетичної інформації, використовується тільки деякими вірусами. Ділянки ДНК кодують структуру білків, тобто вони містять інформацію про їх амінокислотну послідовність. Кожен залишок певної амінокислоти представлений в ДНК своїм кодовим словом (*кодоном*), що складається з трьох послідовних один за одним нуклеотидів. Так, ДНК-кодон для фенілаланіну представлений тринуклеотидом ТТС. Ланцюг ДНК, що містить інформацію про первинну структуру білка називається матричним або кодуючим, а комплементарний до нього є некодуючим ланцюгом, послідовність нуклеотидів якого відповідає послідовності матричної або інформаційної РНК.

Реплікація. Під час поділу клітин генетична інформація повинна перейти в дочірні клітини в такій самій кількості, що й була в материнській. Для досягнення цього вся ДНК під час S-фази клітинного циклу самокопіюється внаслідок процесу реплікації (дослівно «подвоєння»). Це призводить до утворення тетраплоїдного

(4n) геному з диплоїдного (2n) у клітині, яка готується до поділу. При цьому кожен її ланцюг служить матрицею для синтезу послідовності дочірнього комплементу.

Реплікація – це багатоетапний, впорядкований процес самовідтворення ДНК, що починається на багатьох ділянках (реплікативних одиницях) і триває одночасно на обох ланцюгах лише у напрямі 5’ → 3’. У процесі реплікації бере участь близько 30 білків і ферментів, що утворюють реплікативний комплекс.

Реплікація відбувається напівконсервативним шляхом, тобто у кожної нової ДНК один з ланцюгів – початковий (материнський), а другий – комплементарний йому (дочірній).

Швидкість реплікації залежить від організації генома, скажімо у прокаріот вона становить 1000-2000 нуклеотидів за секунду, в еукаріот у 10 разів повільніше.

Експресія генів, або реалізація генетичної інформації, відбувається у декілька етапів: транскрипція, посттранскрипційні модифікації РНК, трансляція і посттрансляційні перетворення білка. У певних випадках експресія обмежується першими двома етапами (рис. 1).

Транскрипція. Для здійснення експресії гена, тобто синтезу закодованих в ньому білків, послідовність нуклеотидів кодуючого ланцюга ДНК має бути декодована в амінокислотну послідовність. Оскільки ДНК не бере безпосередньої участі в синтезі білку, інформація, що зберігається в ядрі, має бути перенесена на рибосоми, де власне і здійснюється біосинтез білків. Для цього відповідна ділянка кодуючого ланцюга ДНК прочитується (транскрибується) з уворенням гетерогенної ядерної РНК (гяРНК, англ. hnRNA), тобто послідовність цієї РНК комплементарна кодуючому ланцюгу ДНК.

Посттранскрипційні модифікації, або дозрівання РНК. В еукаріот гяРНК перш, ніж покинути ядро у вигляді зрілої матричної РНК (мРНК), зазнає істотних змін. Вона проходить стадії кепування, поліаденілювання, а також з молекули гяРНК вирізаються надлишкові ділянки інтрони (що не кодують), а кодуючи ділянки, тобто екзони, зшиваються між собою.

Трансляція. Зріла мРНК, потрапляючи до цитоплазми, зв’язується з рибосомами, які за участю транспортних РНК (тРНК) перетворюють отриману інформацію в амінокислотну послідовність відповідного білка. *Рибосоми* – це рибонуклеопротеїдні комплекси, що включають декілька десятків білків і декілька молекул рибосомної РНК (рРНК; англ. rRNA).

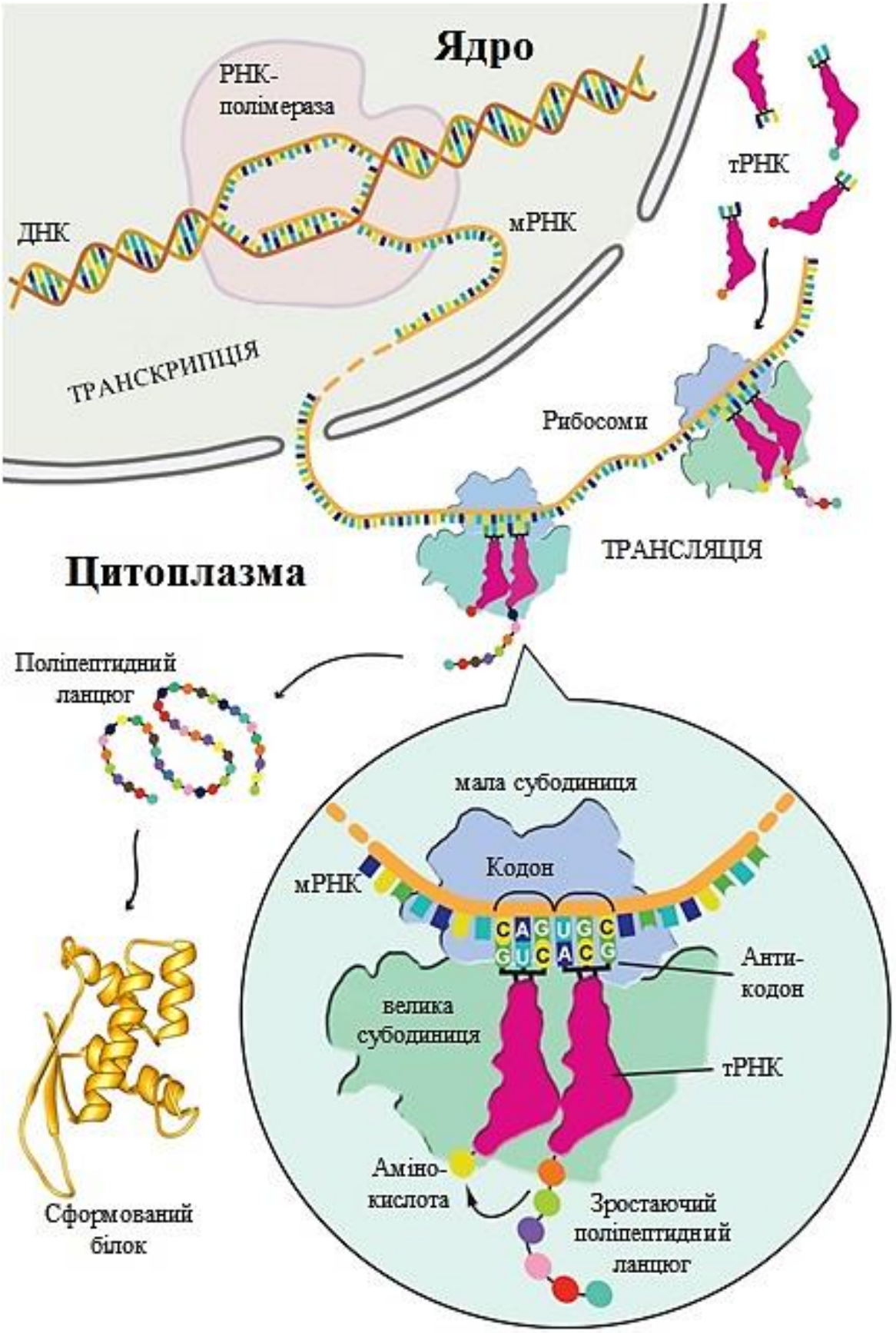


Рис. 1. **Експресія генів**

Механізм перетворення генетичної інформації заснований на взаємодії кодонів мРНК з комплементарними триплетами тРНК – *антикодонами*. Остання переносить на рибосому амінокислоти у суворій відповідності до інформації, закодованої в мРНК.

Посттрансляційні перетворення білка. Після завершення трансляції та вивільнення білка з рибосоми амінокислоти у складі поліпептидного ланцюжка піддаються різноманітним хімічним модифікаціям. Ці модифікації здатні значно розширити різноманітність можливих білків, надаючи їм нові властивості. Водночас один і той же білок може піддаватися численним модифікаціям.

1. Будова спадкового матеріалу

1.1. Нуклеїнові кислоти – носії спадковості. Історичні аспекти

Дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК) відкрив Johan Friedrich Miescher (1844-1895) у 1868 році. Спочатку нова речовина отримала назву нуклеїн, а пізніше, коли J.Miescher визначив, що вона володіє кислотними властивостями, речовина отримала назву нуклеїнова кислота. Біологічна функція нововідкритої речовини була неясна, і довгий час ДНК вважалася запасником фосфору в організмі. Більш того, навіть на початку XX століття багато біологів вважали, що ДНК не має ніякого відношення до передачі інформації, оскільки будова молекули, на їхню думку, була дуже одноманітною (тетрануклеотидні повтори) і не могла містити закодованої інформації.

Теорія тетрануклеотидної будови нуклеїнових кислот вважалась добре обґрунтованою і увійшла до всіх підручників того (довоєнного) часу, як велике досягнення структурної хімії. До того ж монотонність нуклеїнових кислот суперечила ідеям про їх спадкову функцію, що, хоча й опосередковано, сприяло зміцненню білкової гіпотези спадковості, яку в 1927 році висунув видатний російський біолог Николай Константинович Кольцов (1872-1940). Суть гіпотези полягає в тому, що «кожна білкова молекула виникає з білкової молекули шляхом кристалізації довкола неї амінокислот та білкових уламків, які містяться в розчині». Відповідно до гіпотези М.К. Кольцова, ген являв собою гігантську білкову молекулу, на якій як на матриці в типографії «друкується» інша білкова молекула. Ця гіпотеза стала відомою і популярною дуже швидко, оскільки традиційне уявлення про первинну роль білків в життєвому процесі не дозволяло і думати про те, що така важлива речовина, як речовина спадковості, могла бути чим-небудь, окрім білку. Проте поступово було доведено, що саме ДНК, а не білки, як вважалося раніше, є носієм генетичної інформації.

Вирішальним «цвяхом у домовину» гіпотези білкової спадковості став експеримент вірусологів Alfred Day Hershey (1908-1997) та Martha Cowles Chase (1927-2003), результати якого були оприлюднено в 1952 році. Їм вдалось довести, що спадковою речовиною фага Т2 є ДНК. Це відкриття генетики зустріли з великим піднесенням. Воно привернуло увагу до робіт, виконаних на пневмококах за декілька років до цього.

Бактеріофаг Т2 – один із найретельніше досліджених фагів *E.coli*. Він містить ДНК, упаковану в білкову оболонку. Білкова складова фага Т2 містить сірку (у складі амінокислот метіоніну і цистеїну), тим часом щонайменше 99% усього фосфору фагу Т2 входить до складу ДНК. Своїм експериментом A.Hershey і M.Chase з'ясували роль кожного з цих двох компонентів у формуванні нащадків фага.

Методика, що була використана в експерименті Hershey-Chase проста в описанні (рис. 2). Вони вирощували дві групи бактерій кишкової палички: одну в середовищі, що містить радіоактивний фосфор ^{32}P, а іншу – в середовищі з радіоактивною сіркою ^{35}S. Бактеріофаги Т2, які були додані в середовище з бактеріями, атакували їх і поглинали радіоактивні маркери. При цьому ДНК фага насичувалась лише маркерами ^{32}P, а білок – лише ^{35}S, оскільки до складу нуклеїнової кислоти не входить сірка, а білок не містить фосфору. Таким чином, пара радіоактивних маркерів дозволяла розмежувати ролі двох компонентів бактеріофага в його репродукції. Після цього до бактерій *E.coli* додавали дві групи фагів Т2 – з міченою ДНК та міченим білком.

Інфекційний процес починається з прикріплення фага до бактеріальної клітини. Цей етап можна спостерігати в електронний мікроскоп. Результати спостережень підтверджуються тим, що при центрифугуванні клітин на цій стадії інфекції фаги, що містять як ^{35}S, так і ^{32}P, осідають разом з бактеріями. A.Hershey і M.Chase виявили, що незабаром після інфікування велику частину білка міченого ізотопом ^{35}S можна відокремити від бактеріальних клітин, активно перемішуючи і струшуючи культуру на мішалці. Тим часом, велика частина ДНК міченої ^{32}P не відділяється при цьому від бактеріальних клітин, оскільки, ймовірно, опиняється вже усередині них. Усунення з культури порожніх білкових оболонок фага, так званих «тіней», не впливає на подальші події: бактерії лізуються, і з них виходять нащадки фага саме так, як і у тому випадку, коли «тіні» залишаються прикріпленими до клітин. З цього досліду A.Hershey і M.Chase зробили висновок, що для утворення копій фага в ураженій бактеріальній клітині достатньо лише ДНК батьківського фага, хоча самі копії містять як ДНК, так і білок. Таким чином, було висловлено припущення, що білковий компонент фага лише захищає ДНК від розщеплюючих ферментів і забезпечує попадання ДНК в бактеріальну клітину, проте як ДНК є власне речовиною спадковості.

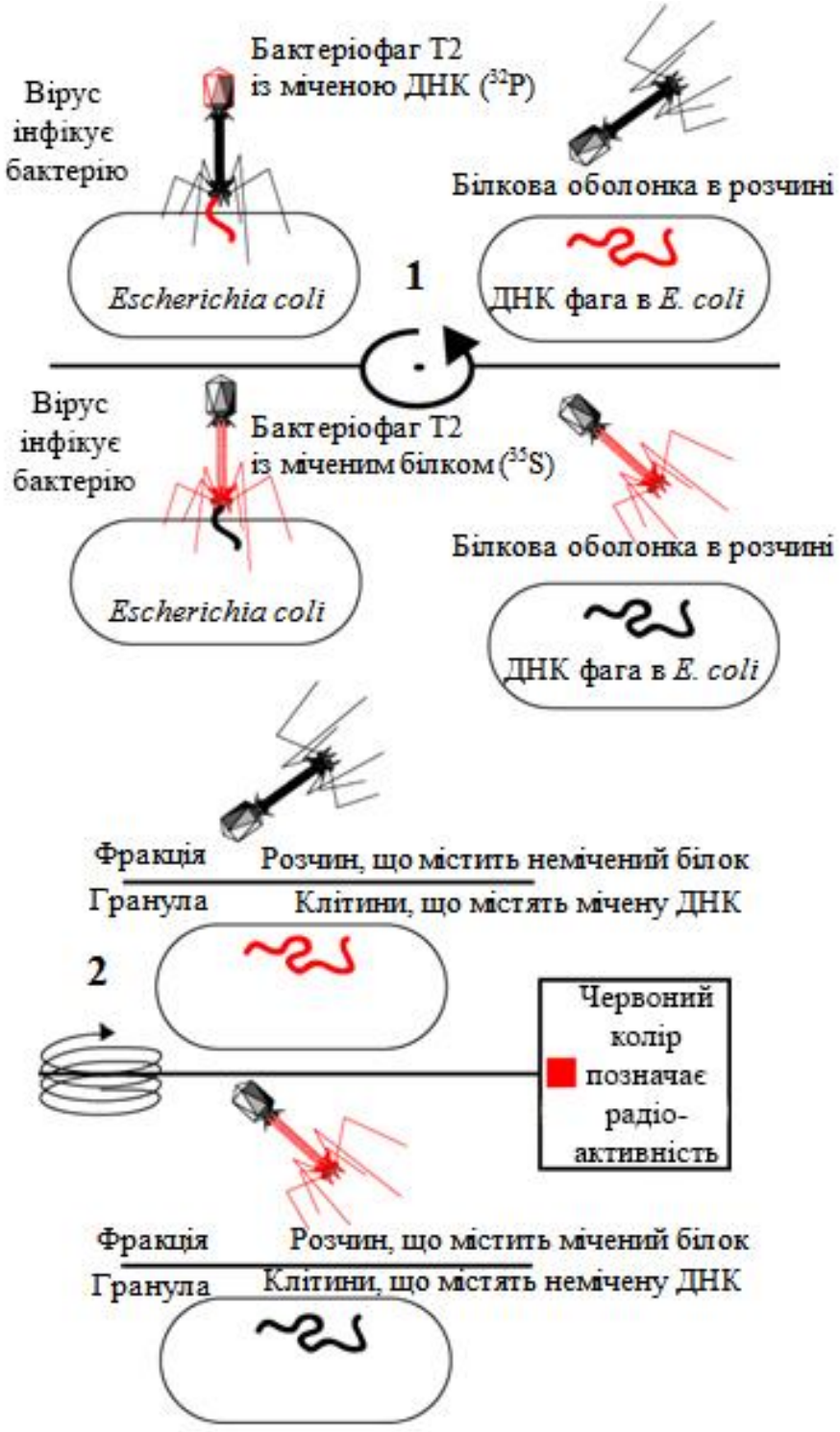


Рис. 2. **Схема експерименту Hershey-Chase**
(1-струшування в шейкері; 2-центрифугування)

Експеримент Hershey-Chase свідчив про виключну генетичну роль ДНК. Існують дві причини, за якими саме цей експеримент був відразу визнаний як вирішальний доказ генетичної ролі ДНК, в той час як експерименти Oswald Theodore Avery (1877-1955) з його співробітниками Colin Munro MacLeod (1909-1972) та Maclyn McCarty

(1911-2005) з трансформації пневмококів не привернули до себе такої уваги:

- по-перше, експеримент був поставлений на бактеріофагах, для яких було добре відомо, що характер успадкування ознак аналогічний вищим організмам. Зокрема, на фагах Т2 було продемонстроване існування мутацій і описана рекомбінація генів-мутантів, саме так як і у вищих організмів;
- по-друге, хімічні дослідження складу ДНК багатьох різних організмів, що проводилися між 1944 і 1952 роками спростували широко поширене раніше уявлення про ДНК як про простий полімер, в якому один тетрануклеотид багаторазово повторюється в усіх молекулах.

Ці дослідження виявили, що ДНК має достатню хімічну складність, щоб служити речовиною спадковості.

Досліди, проведені на вірусі тютюнової мозаїки (ВТМ), прямо показали, що білки вірусу не грають генетичної ролі при ураженні рослин. Це стало додатковим аргументом на користь того, що спадковою речовиною вірусів слугує нуклеїнова кислота, а не білкова складова. Подібно до більшості вірусів рослин, ВТМ складається з білка і рибонуклеїнової кислоти (РНК). РНК за хімічною структурою близька до ДНК. Кожна частка вірусу містить молекулу РНК, що складається приблизно з 6400 нуклеотидів, поміщену в білкову оболонку. Білкова оболонка складається з майже 2130 однакових субодиниць, кожна з яких є поліпептидним ланцюгом з 158 амінокислот, розташованих у певній послідовності.

Існують хімічні методи, що дозволяють розділити РНК і білок вірусу. Зазвичай очищений препарат РНК ВТМ зберігає не більше 0,1% інфікуючої активності інтактного (неушкодженого) вірусу. Проте за належних умов вірус можна в лабораторних умовах реконструювати з суміші очищеного білку. Субодиниці білку з’єднуються один з одним і з РНК, утворюючи інтактний вірус з нормальною здатністю до інфекції.

Відомо безліч різновидів ВТМ, що відрізняються за колом рослин-господарів і за вірулентністю на різних рослинах. Між ними існують помітні відмінності і в амінокислотному складі білків. Наприклад, у білковій оболонці ВТМ стандартного штаму відсутні гістидин і метіонін, проте як у вірусах штаму HR ці амінокислоти містяться. Було виконано експерименти з реконструкції гібридних вірусів з очищеного білку HR і очищеною РНК стандартного штаму. Такі віруси мали

нормальну інфекційність. Коли ж цими вірусами вражали рослини, то склад білкової оболонки нащадків гібридних вірусів співпадав із складом білків штаму, з якого була взята РНК. Склад білкової оболонки гібридного вірусу не наслідувався; нащадки таких вірусів мали білкові оболонки, склад яких визначався виключно РНК. Виявилось, що лише РНК має функції, необхідні для спадкової передачі цієї ознаки.

Неспростовним доказом того, що носієм спадкових властивостей вірусів виступають саме нуклеїнові кислоти, можна вважати демонстрацію інфекційних властивостей очищеної нуклеїнової кислоти. Як вже вказувалося, очищена РНК ВТМ має слабку інфекційність. Цей факт спочатку пояснювали тим, що у складі очищеного препарату РНК могла зберегтися деяка кількість інтактних вірусів. Проте подальші дослідження показали, що інфекційність препаратів РНК ВТМ руйнується в результаті обробки очищеним ферментом підшлункової залози ссавців, званим рибонуклеазою. Цей фермент гідролізує незахищену РНК, але не впливає на інфекційність інтактних часток ВТМ. Знижена здатність до інфекції препаратів РНК ВТМ на порівняння з інтактними вірусами пояснюється відсутністю білкової оболонки, що захищає РНК від гідролізу. Рибонуклеази рослини руйнують велику частину РНК до того, як вони проникають в клітину. Проте ретельні дослідження показали, що одна-єдина молекула РНК інтактного вірусу здатна уразити рослинну клітину і привести до утворення повноцінних часток ВТМ.

Згодом було показано, що очищена ДНК деяких фагів, з яких найбільш відомі *φX*174 і *λ*, може вражати бактерії і при відсутності білкової оболонки. Вільним молекулам ДНК нелегко проникнути через клітинну стінку. Проте, обробляючи бактерії *E.coli* певним ферментом, а саме лізоцимом яєчного білку, можна зробити їх клітинну стінку проникною. Бактеріальні клітини, стінки яких оброблені у такий спосіб, називаються *сферопластами* (через сферичну форму, яку набувають бактерії в результаті такої обробки). Сферопласти не здатні до нормального росту, проте вони можуть бути інфіковані молекулами ДНК, виділеної з фагів *φX*174 і *λ*, і виробляти повноцінні фагові частки. Такі експерименти показують, що саме ДНК, а не білок є спадковим матеріалом бактеріофагів.

Таким чином, уже в результаті перших досліджень стало зрозуміло, що саме нуклеїнові кислоти є носієм спадковості в усіх організмах. Два типи нуклеїнових кислот – ДНК і РНК – виконують

генетичні функції в усіх прокаріотичних і еукаріотичних клітинах. Проте віруси містять лише один з двох типів нуклеїнових кислот.

1.2. Хімічний склад і будова нуклеїнових кислот

Основна структурна одиниця (мономер) нуклеїнових кислот – *нуклеотид*. Нуклеотид складається з трьох хімічно різних частин, сполучених ковалентними зв'язками. Перша частина – це пентозний цукор, що містить, відповідно, п'ять атомів вуглецю: дезоксирибоза (у ДНК) і рибоза (у РНК). Друга частина – пуринова або піримідинова азотиста основа, ковалентно сполучена з першим атомом вуглецю цукру, формуючи структуру, звану *нуклеозидом*. ДНК містить *пуринові основи*: аденін (А) і гуанін (G; Г), а також *піримідинові основи* – цитозін (С; Ц) і тимін (Т); відповідні нуклеозиди називаються: дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезоксицитидин і дезокситимідин. Нуклеозид РНК містить ті ж пуринові основи, що і ДНК, а також піримідини: цитозин і замість тиміну – урацил (U); відповідні нуклеозиди називаються: аденозин, гуанозин, цитидин і уридин. Третю частину нуклеотиду складає фосфатна група, яка сполучає сусідні нуклеозиди в полімерний ланцюг за допомогою фосфодиефірних зв'язків між 5'-атомом вуглецю одного цукру і 3'-атомом вуглецю іншого. Таким чином, *нуклеотидами* називаються нуклеозиди з однією або декількома фосфатними групами, що приєднані ефірними зв'язками до 3'- або 5'- атому вуглецю цукру (рис. 3). Синтез нуклеотидів передує синтезу нуклеїнових кислот, і відповідно нуклеотиди є продуктами хімічного або ферментативного гідролізу нуклеїнових кислот.

Нуклеїнові кислоти – це дуже довгі полімерні ланцюги, які складаються з мононуклеотидів, сполучених 5'-3'-фосфодиефірними зв'язками. Інтактна молекула РНК містить від 100 до 100000 і більше нуклеотидів. Інтактна молекула ДНК вміщує залежно від виду організмів від декількох тисяч до багатьох мільйонів нуклеотидів.

У ті часи, коли вважалося, що структура молекул ДНК відносно проста і є певною тетрануклеотидною послідовністю, що багаторазово повторюється, утворюючи полімер виду (pApCpGpT)n, хімічні дослідження американського біохіміка з українським корінням Erwin Chargaff (1905-2002) щодо складу ДНК багатьох різних організмів переконали наукову громадськість у тому, що ДНК насправді має складність, необхідну для передачі спадкової інформації.

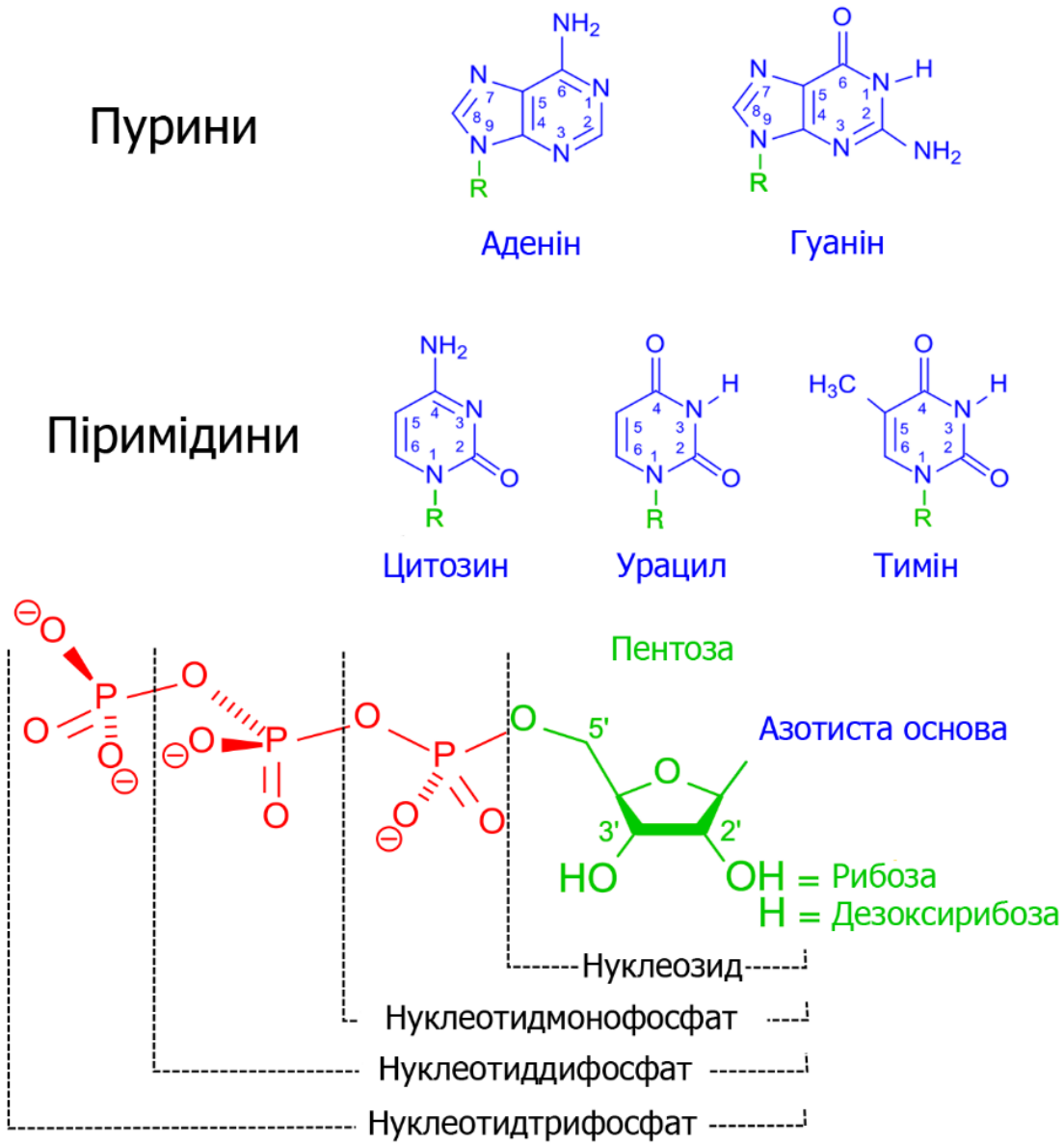


Рис. 3. **Хімічна будова нуклеотидів**

На початку 50-х років XX століття, розробивши методи, які дозволяють дати більш точну хімічну характеристику ДНК, E.Chargaff встановив, що вміст чотирьох азотистих основ в нуклеїновій кислоті зовсім не відповідає співвідношенню 1:1:1:1. Це співвідношення залежить від джерела ДНК. Так, наприклад, у людини ДНК містить близько 30% аденіну незалежно від того, отримана вона з печінки чи з будь-якої іншої тканини, а ось ДНК туберкульозної палички – всього лише 15%. Дані E.Chargaff вказували також на те, що в молекулі ДНК, очевидно, можлива будь-яка послідовність основ, а якщо це так, то вона могла містити і інформацію, необхідну для керування клітиною. Ця інформація могла б кодуватись як кодуються думки літерами алфавіту, або тире, крапками і паузами в абетці Морзе. Особливо

вразило E.Chargaff те, що незалежно від джерела досліджуваної ДНК кількість її аденіну завжди була рівною кількості тиміну, а вміст гуаніну дорівнював вмісту цитозину. Результати досліджень науковця були узагальнені та виражені в правилах, що сьогодні носять його прізвище. Їх зміст наступний:

1) кількість пуринових основ дорівнює кількості піримідинових (A+G=T+C);
2) кількість аденіну дорівнює кількості тиміну, а кількість гуаніну дорівнює кількості цитозину – правило комплементарності (A=T; G=C);
3) співвідношення комплементарних основ є величиною константною для певного виду – правило видоспецифічності ([A+T]/[G+C]=k).

Спостереження E.Chargaff показали, що молекула ДНК може бути влаштована складніше, ніж припускали до того, оскільки відповідно до отриманих ним даних молекули ДНК могли складатись з найрізноманітніших комбінацій основ. Незабаром після робіт E.Chargaff J.Watson і F.Crick фактично показали, що правила E.Chargaff не накладають ніяких обмежень на можливе число різних послідовностей основ, які можуть утворювати молекули ДНК.

1.3. Модель структури ДНК Watson-Crick та підтвердження її дієвості

У 1953 році James Dewey Watson (нар. 1928 р.) і Francis Harry Compton Crick (1916-2004) запропонували модель структури ДНК, яка відтоді багаторазово перевірялася і визнана правильною в цілому і в багатьох деталях. Їх модель грунтувалася на чотирьох групах даних:

1) ДНК є полімером, який складається з нуклеотидів, сполучених 3’-5’-фосфодиефірними зв’язками;
2) склад нуклеотидів в ДНК підкоряється правилам E.Chargaff;
3) рентгенограми волокон ДНК, уперше отримані Maurice Hugh Frederick Wilkins (1916-2004) і Rosalind Elsie Franklin (1920-1958), вказують на те, що молекули мають спіральну структуру і містять більше за один полінуклеотидний ланцюг;
4) кислотно-лужне титрування нативної (природної) ДНК показує, що її структура стабілізується водневими зв’язками. Титрування і нагрівання нативної ДНК викликають помітні зміни її фізичних

властивостей, зокрема в'язкість, переводячи її в «денатуровану» форму, причому ковалентні зв'язки не руйнуються.

Щоб пояснити ці спостереження, J.Watson і F.Crick припустили, що природна молекула ДНК складається з двох полімерних ланцюгів попарно сполучених нуклеотидів, закручених у формі подвійної спіралі. Зчеплення між ланцюгами забезпечується особливими водневими зв'язками між аденіном і тиміном та між гуаніном і цитозіном (рис. 4). Таке попарне зіставлення нуклеотидів, при якому A комплементарний T, а G комплементарний C, було виведено за допомогою побудови фізичних (просторових) молекулярних моделей, на яких точно витримувалися усі міжатомні відстані. Побудова молекулярної моделі гіпотетичної подвійної спіралі, також, вимагала антипаралельності нуклеотидних ланцюгів.

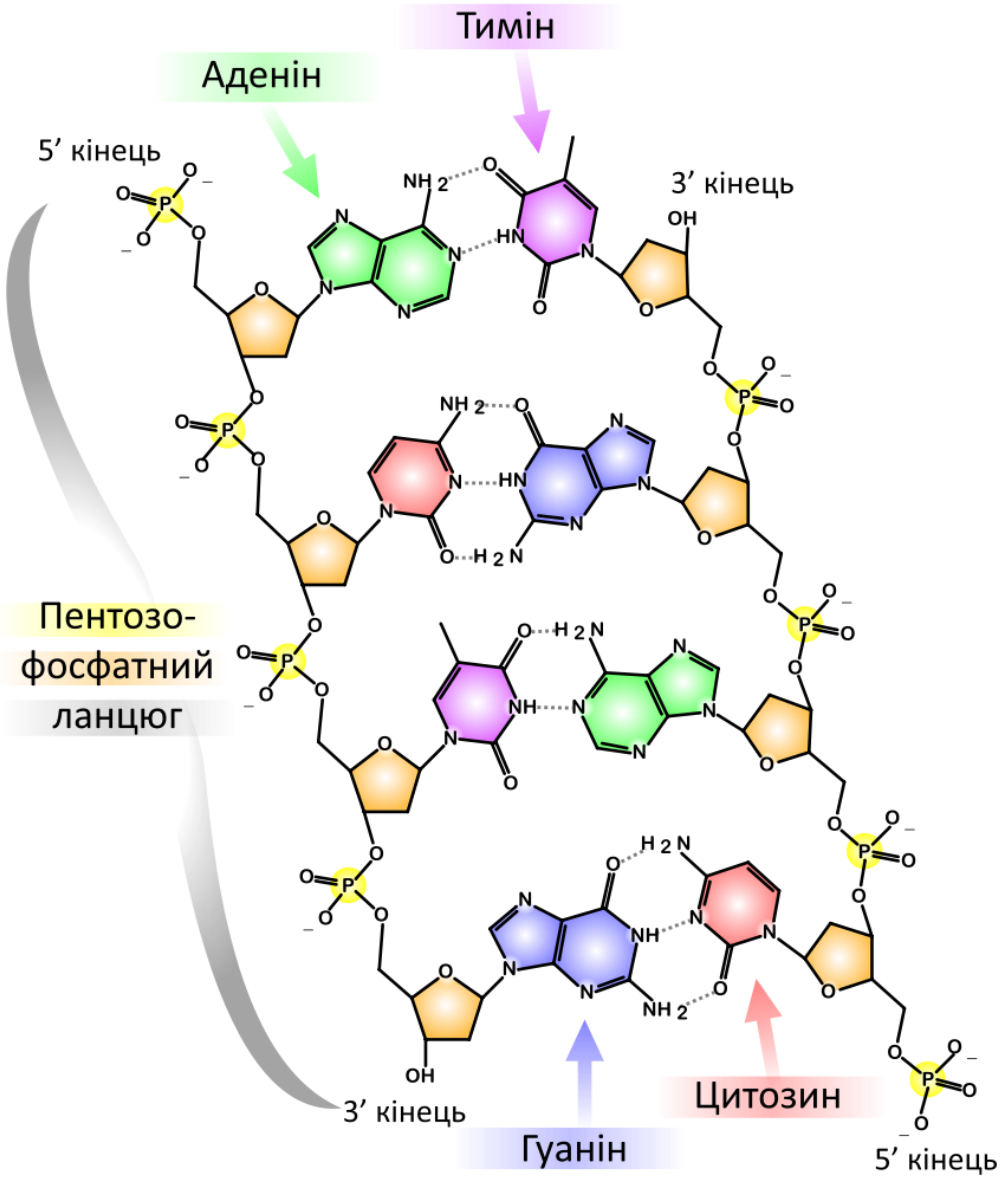


Рис. 4. **Фрагмент дволанцюгової молекули ДНК**

Припущена специфічність водневих зв’язків між аденіном і тиміном та між гуаніном і цитозіном пояснює постійність взаємин, що встановлена E.Chargaff (A=T і G=C), та відображає комплементарність ланцюгів подвійної спіралі. Більше того, для будь-якої послідовності основ можлива рівна їй за довжиною послідовність комплементу, що становить другий ланцюг подвійної спіралі. Конкретна послідовність пар A-T і G-C може бути видоспецифічною і не впливати на структуру молекули ДНК, що утворює подвійну спіраль. Можливе число різних послідовностей пар основ в молекулі ДНК теоретично нескінченне і здатне кодувати колосальну кількість інформації. Цей факт робить дуже привабливою гіпотезу про те, що ДНК може слугувати речовиною спадковості для усіх організмів. Із моделі також виходить, що фізична структура нативної ДНК здатна сильно змінюватися при нагріванні або титруванні, що не порушує ковалентних зв’язків, але що розриває водневі зв’язки, так що обидва ланцюги відділяються один від одного.

Модель Watson-Crick дозволяє уявити собі, як може подвоюватися нативна молекула ДНК, утворюючи дві однакові дочірні молекули. Оскільки два ланцюги ДНК комплементарні, то кожен з них при розплітанні подвійної спіралі може служити матрицею для синтезу нового ланцюга комплементу. Послідовність основ в ланцюзі, що знову синтезується, визначатиметься специфікою водневих зв’язків між основами ланцюга-шаблону і нового ланцюга. Таким чином, генетична інформація, що містилася в послідовності пар основ батьківської молекули, буде повністю відтворена в двох дочірніх молекулах. Більше того, якщо в процесі подвоєння ДНК сталася помилка і якийсь нуклеотид в новому ланцюзі випав або виявився некомплементом початковому, то це може змінити інформаційний зміст молекули, причому можна чекати, що ця помилка буде передана дочірнім молекулам ДНК у наступних поколіннях. Така заміна пари нуклеотидів може мати властивості генетичних мутацій.

Таким чином, модель структури ДНК J.Watson і F.Crick пояснює як здатність генів до самоподвоєння (*реплікації*), так і їх інформаційні властивості. Проте пройшло п’ять років, перш ніж було отримано перші переконливі експериментальні підтвердження моделі Watson-Crick в роботах Matthew Stanley Meselson (нар. 1930 р.) і Franklin William Stahl (нар. 1927 р.).

Після відкриття J.Watson і F.Crick подвійної спіралі ДНК було запропоновано декілька можливих механізмів її реплікації. Першу

гіпотезу *напівконсервативної* реплікації ДНК запропонували самі J.Watson і F.Crick: кожна дочірня молекула ДНК складається з одного інтактного (консервативного) ланцюга, отриманого від батьківської подвійної спіралі, і одного знову синтезованого ланцюга.

Гіпотеза *консервативної* реплікації ДНК припускає, що материнська подвійна спіраль як ціле виступає в якості матриці для синтезу дочірньої спіралі, що складається з двох нових ланцюгів. Ця гіпотеза передбачає велику роль гістонів в процесі реплікації.

Гіпотеза *дисперсної* реплікації виникла як спроба пояснити, яким чином клітина може вирішити проблему розкручування довгих дуплексів при копіюванні ДНК. Відповідно до цієї гіпотези, для подолання суперскручування ДНК при реплікації в неї через кожні 5 нуклеотидних залишків вносяться розриви, які «зашиваються» після того, як зайва напруга зніметься з молекули. В результаті дочірній ланцюг складається зі старих і нових ділянок, що чергуються, довжиною по 5 нуклеотидних залишків, так само як і материнський.

Таким чином, кожна з цих гіпотез припускає певний розподіл старої ДНК в молекулах, що утворюються після завершення реплікації (рис. 5).

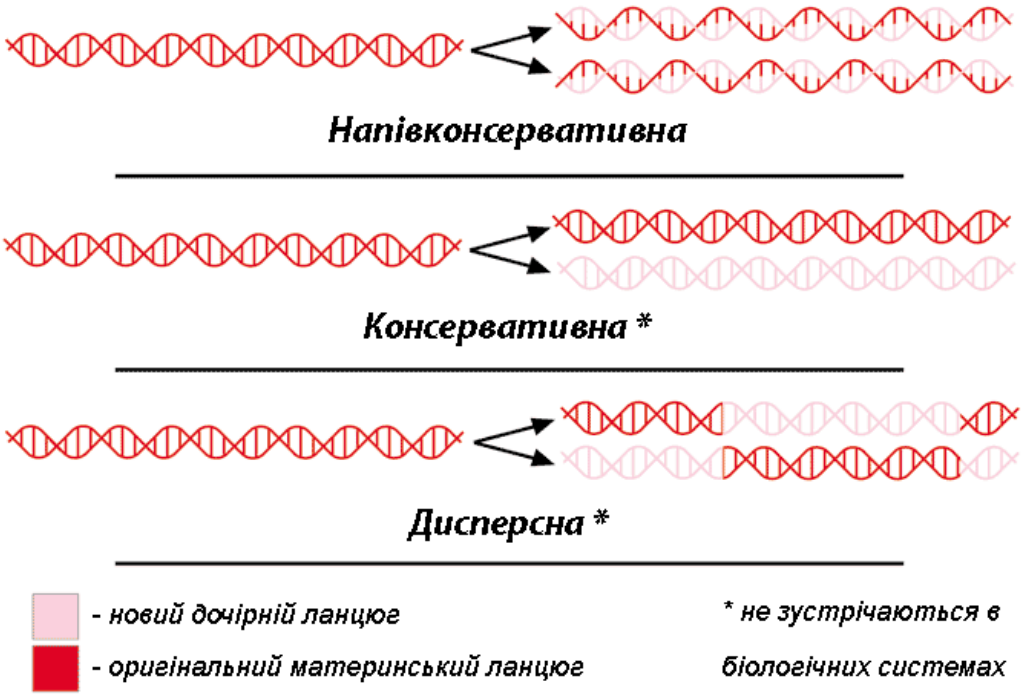


Рис. 5. **Гіпотетичні механізми реплікації ДНК**

Щоб визначити, яким з цих способів відбувається реплікація ДНК потрібно уміти відрізняти дочірні молекули від батьківських. M.Meselson і F.Stahl вирощували *E.coli* на середовищі, що містить як

джерело азоту ^{15}N. Важкий ізотоп азоту ^{15}N включався до складу ДНК і служив міткою. Для того, щоб помітити ізотопом ^{15}N практично усю бактеріальну ДНК, досить вести культивування на такому середовищі протягом дванадцяти поколінь. Молекули, що містять ^{15}N, можна відрізнити від молекул, що містять легший, звичайніший ізотоп, за щільністю, оскільки у ДНК з ^{15}N маса одного нуклеотиду більша, ніж у звичайної ДНК. Молекули ДНК із різною щільністю можуть бути розподілені центрифугуванням у градієнті щільності хлористого цезію. У процесі центрифугування молекули ДНК збираються в тому шарі, в якому щільність розчину дорівнює їх власній щільності. ДНК клітин *E.coli*, вирощених на середовищі, що містить ^{15}N, має щільність 1,724 г/см^3, проте як ДНК клітин, вирощених на звичайному середовищі з ізотопом ^{14}N, має щільність 1,710 г/см^3. Суміш цих двох типів ДНК легко розділяється при центрифугуванні за щільністю.

В експерименті M.Meselson і F.Stahl клітини, протягом багатьох поколінь культивовані на середовищі з ^{15}N, швидко переносили в середовище, що містила ^{14}N. Через певні проміжки часу відбирали проби зростаючої культури і в кожній з них визначали щільність ДНК. Після першого поділу на середовищі з ^{14}N щільність ДНК культури була проміжною між ^{15}N ДНК і ^{14}N ДНК. Після другого поділу на середовищі з ^{14}N половина клітин мала легку ДНК, а друга половина – ту ж, що і в попередньому поколінні (проміжну). Після третього ділення на середовищі з ^{14}N 3/4 ДНК мало щільність, рівну щільності ^{14}N ДНК і 1/4 зберігала проміжну щільність. Співвідношення між числом генерацій і розподілом щільності ДНК в точності відповідало напівконсервативному типу реплікації, що передбачається моделлю Watson-Crick (рис. 6).

У результаті модель передбачала, що ДНК з проміжною щільністю має бути гібридною подвійною спіраллю, один з ланцюгів якої містить тільки важкий ізотоп азоту (^{15}N), а інша – тільки легкий (^{14}N). M.Meselson і F.Stahl нагрівали ДНК проміжної щільності протягом 30 хв. при температурі 100°С, що, як вже було відомо, змінює фізичні властивості молекули, не розриваючи ковалентних зв’язків, і виявили, що вона перетворюється на дві рівні за об’ємом фракції ДНК з різною щільністю. Щільність однієї з фракцій, що утворилися в результаті нагрівання, співпадала з щільністю важкої ДНК, а іншої – з щільністю легкої ДНК.

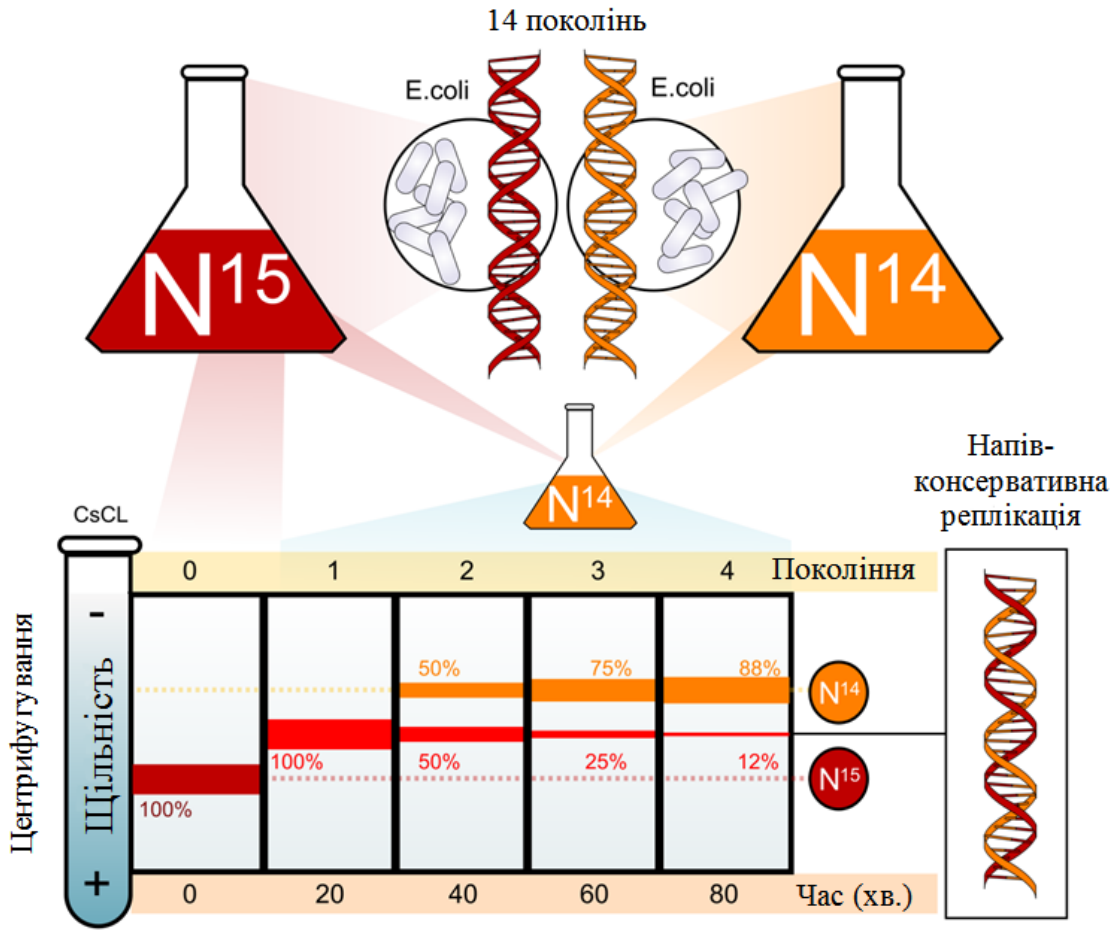


Рис. 6. **Принципова схема експерименту Meselson-Stahl**

З цього було зроблено висновок, що ДНК проміжної щільності, яка утворюється після першого поділу в середовищі з легким азотом, є гібридною молекулою, що складається з одного батьківського ланцюга, який містить тільки важкий ізотоп азоту, і інший, знову синтезованого дочірнього ланцюга, як це передбачає модель Watson-Crick. Аналогічні експерименти здійснювали безліч разів у різних прокаріотичних і еукаріотичних організмів, і кожного разу виявлялося, що ДНК реплікується напівконсервативно. Експерименти Meselson-Stahl були першим доказом справедливості моделі Watson-Crick. Нині можна з упевненістю сказати, що основні положення цієї моделі переконливо підтверджені і структура подвійної спіралі лягла в основу сучасної генетики.

1.4. Варіанти конформацій подвійних спіралей нуклеїнових кислот

Піонерська робота M.Wilkins і R.Franklin показала, що молекули ДНК можуть давати різну дифракційну картину в рентгенівських променях залежно від вмісту води і солей. Модель, запропонована

J.Watson і F.Crick, відповідала значенням параметрів структури, отриманим на основі рентгенограми так званої В-форми ДНК. Модель В-форми ДНК характеризується плоскопаралельним розташуванням пар нуклеотидних основ усередині подвійної спіралі. Площини основ майже перпендикулярні вісі спіралі і знаходяться один від одного на відстані 3,4 Å (1 Å = 0,1 нм). Цій одиниці, що повторюються, відповідають яскраві меридіальні дуги у верхній та нижній частинах рентгенограми. Діаметр спіралі дорівнює 23,7 Å, а кут спірального обернення становить 35,9°. У результаті на один виток спіралі припадає десять цілих пар основ. В-спіраль має правий напрям обертання. Рентгенограма ДНК, проте, не дає інформації, достатньої для того, щоб судити, є спіраль правою або лівою. При побудові своєї моделі J.Watson і F.Crick вибрали напрям обертання довільно.

Уся можлива різноманітність структур дволанцюгових молекул ДНК стала ясною відносно нещодавно (у 80-х роках минулого століття) в результаті експериментів з кристалізації гомогенних дволанцюгових олігомерів ДНК, що отримуються за допомогою хімічного синтезу. Дифракційні рентгенівські знімки, отримані на таких кристалах ДНК, більш чіткі, ніж отримані на природній ДНК, що дозволяє визначити з великою точністю положення окремих атомів. Ці дослідження виявили, що як право-, так і лівозакручена дволанцюгова спіраль ДНК може існувати в декількох модифікаціях, параметри яких характеризуються різними значеннями. Тип спіралі залежить від послідовності нуклеотидів ДНК, величини та напрямку суперскрученості, хімічних модифікації основ та концентрації хімічних речовин у розчині, перш за все концентрацій іонів металів і поліамінів. Зараз ідентифіковані та описані такі конформації: А-ДНК, В-ДНК, С-ДНК, D-ДНК, Е-ДНК, Н-ДНК, L-ДНК, Р-ДНК і Z-ДНК, які відрізняються своєю геомертією і розмірами (табл. 1).

З усіх конформацій, В-форма є найрозповсюдженішою за умов, характерних більшості клітин, хоча в них зустрічаються й А- і Z-конформації ДНК (рис. 7). А-форма нуклеїнових кислот має ширшу правосторонню спіраль, з дрібнішою і ширшою малою борозенкою та вужчою і глибшою великою борозенкою, ніж у В-конформації. А-форма зустрічається у нефізіологічних умовах у зневоднених зразках ДНК, крім того вона, ймовірно, зустрічається в живих клітинах у гібридних комплексах ланцюгів ДНК і РНК, та в комплексах ферментної ДНК.

Таблиця 1

Характеристика конформацій подвійних спіралей нуклеїнових кислот

Праметри подвійної спіралі	Тип подвійної спіралі				
	A	B	C	D	Z
Напрям обертання	вправо	вправо	вправо	вправо	вліво
Кут спірального обернення	+33,6°	+35,9°	+38,7°	+45,0°	-30,0°
Кут нахилу пари нуклеотидів до вісі спіралі	+19,0°	-1,2°	-8,0°	-16,4°	-9,0°
Кількість пар основ на виток	10,7	10,5	9,3	8,0	12,0
Відстань між парами основ, Å	2,40	3,38	3,32	3,03	3,71
Довжина ланцюга напіввитка, Å	24,6	33,2	-	-	45,6
Діаметр спіралі, Å	23,0	23,7	19,0	21,0	18,4

Сегменти ДНК із хімічно зміненими (метильованими) основами можуть проходити через більші конформаційні зміни і набувати так званої Z-форми. Така назва пов’язана із зигзагоподібним характером пентозофосфатного каркасу. При цьому, ланцюги закручуються в ліву подвійну спіраль. Ця структура може розпізнаватися специфічними Z-ДНК зв’язуючими білками.

Окрім того, самокомплементарний тетрамер ДНК типу CGCG (5’-кінець завжди пишеться ліворуч) утворює при кристалізації також лівозакручену дволанцюгову структуру. Тим часом, самокомплементарный додекамер CGCGAATTCGCG кристалізується у формі правозакрученной дволанцюжкової спіралі B-форми.

Дослідження структури полімеру (CG)n в розчині показали, що ця молекула може існувати в одній з двох альтернативних форм, а саме в правій B-формі або лівої Z-формі. Ці дві форми переходять одна в іншу при зміні іонної сили розчину або катіонів, нейтралізуючих негативний заряд на фосфодиефірному каркасі. Природні молекули ДНК в основному існують в правій B-формі, якщо вони не містять послідовностей типу (GC)n. Проте якщо такі послідовності входять до складу ДНК, то ці ділянки за відповідних умов можуть переходити в

Z-форму. Можливість такого переходу вказує на те, що два ланцюги подвійної спіралі ДНК знаходяться в динамічному стані й можуть розкручуватися один відносно одного, переходячи з правої форми в ліву і навпаки. Зрозуміло, що молекули ДНК для цього мають бути досить лабільні і допускати конформаційні перетворення. Біологічні наслідки такої лабільності структури ДНК доки цілком не з'ясовані. Специфічні до Z-ДНК антитіла реагують з певними ділянками гігантських хромосом клітин слинових залоз дрозофіли, що свідчить про те, що ДНК в хромосомах існує в обох формах.

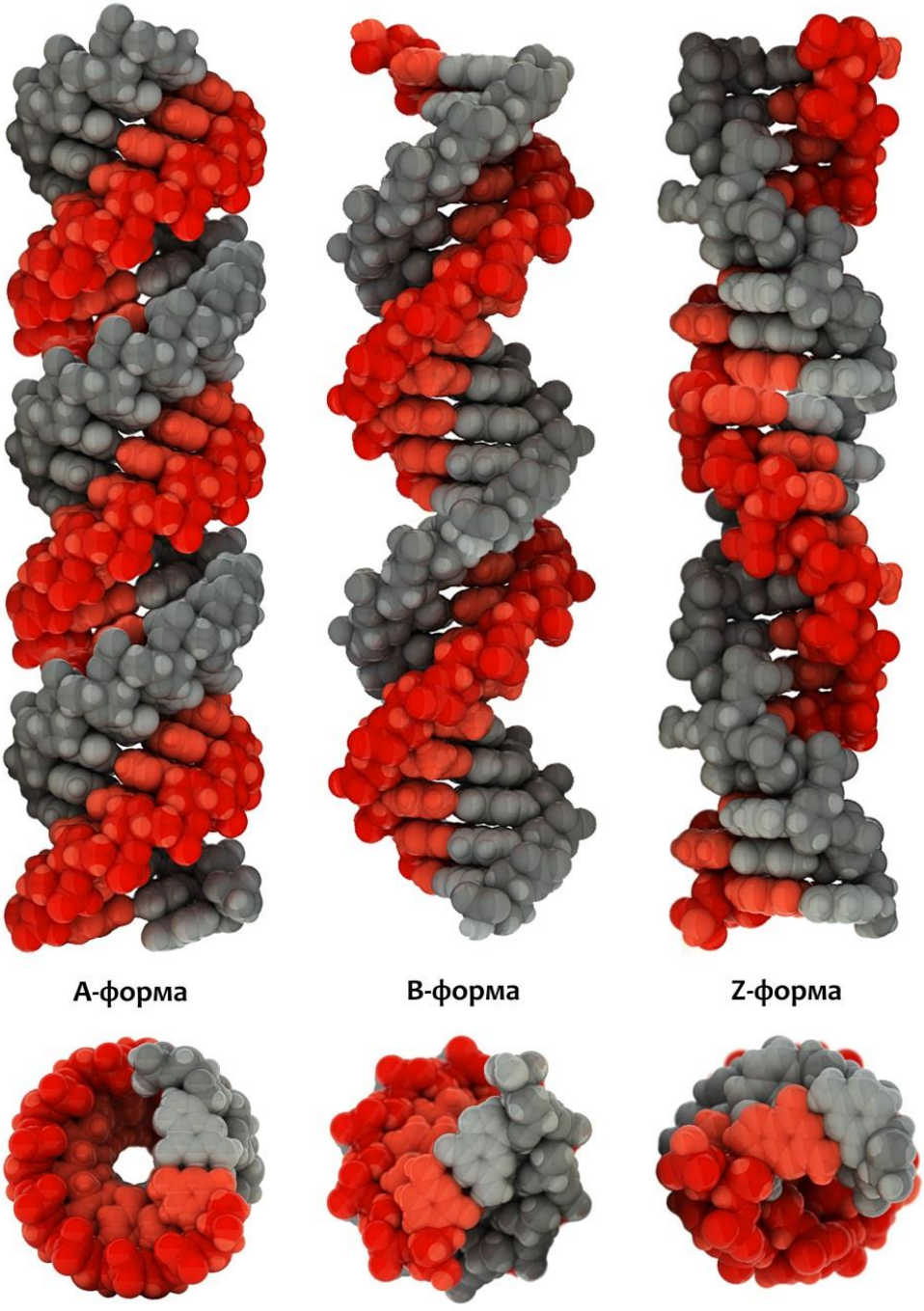


Рис. 7. **Варіанти конформацій ДНК**

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. Яке значення мав експеримент Hershey-Chase?
2. Вкажіть складові частини нуклеотиду.
3. У чому полягає різниця між нуклеозидом і нуклеотидом?
4. Які пуринові та піримідинові основи існують?
5. У чому полягає різниця між молекулами РНК і ДНК?
6. Про що свідчать правила E.Chargaff?
7. Які гіпотези реплікації ДНК були запропоновані?
8. У чому полягає гіпотеза напівконсервативної реплікації ДНК?
9. Яким чином експеримент Meselson-Stahl довів напівконсервативний механізм реплікації ДНК?
10. Які варіанти конформації подвійних спіралей ДНК існують? Чим вони відрізняються?
11. За яких умов відбувається перехід молекули ДНК з однієї форми до іншої?

2. Структурна організація геномів біоти

2.1. Особливості геномів вірусів та їх економічність

Загальна характеристика і значення вірусів. Віруси (від лат. *virus* – отрута) – це особлива форма життя, яка об'єднує організми з неклітинною будовою. У сучасній таксономії живої природи (Systema Naturae 2000) віруси виділяються до окремого таксону Vira, що утворює разом з доменами Бактерії (*Bacteria*), Археї (*Archaea*) і Еукаріоти (*Eukaryota*) кореневий таксон Життя (*Biota*). Протягом XX століття в систематиці висувалися пропозиції щодо створення виділеного таксона для неклітинних форм життя, проте такі пропозиції не кодифіковано.

У даний час відомо понад 800 видів вірусів (ймовірно, більшість видів ще не відкрита). Класифікація вірусів здійснюється на основі ряду критеріїв:

1) за носіями спадкової інформації (ДНК-містні та РНК-містні);
2) за структурою капсомерів (ізометричні (кубічні), спіральні, змішані);
3) за наявністю або відсутністю додаткової ліпопротеїнової оболонки або суперкапсиду (прості та складні);
4) за клітинами-господарями (віруси рослин, грибів, тварин і віруси прокаріот, або бактеріофаги).

Існує ряд теорій щодо походження вірусів. Згідно з однією із них, віруси – вкрай спрощені прокаріоти, що втратили цитоплазму. Альтернативні теорії розглядають віруси як частину генетичного матеріалу клітини, винесеного за її межі, тобто нуклеїнової кислоти, що набула спроможність реплікуватись незалежно від тієї клітини, із якої виникла, хоча при цьому передбачається, що така ДНК реплікується з використанням структур цієї або іншої клітин.

Віруси здатні існувати в двох формах: поза клітинами і всередині них. Поза клітиною існують вільні віруси – *віріони*. Вони не виявляють властивостей біологічних систем: у них відсутній обмін речовин, і вони нездатні до самовідтворення. Віріони складаються з нуклеїнових кислот (ДНК або РНК), укладених у білкову оболонку – *капсид*.

До складу капсиду входить суворо певна кількість повторюваних білкових субодиниць – *капсомерів*. Наприклад, у вірусу поліомієліту до складу капсиду входить 60 капсомерів, аденовірусу – 252, вірусу тютюнової мозаїки – 2000.

Розміри вірусів коливаються від 20 до 350 нм. За морфологією розрізняють такі форми вірусів: сферична, паличкоподібна, кубоідальна, сперматозоїдна. За характером симетрії капсиду розрізняють віруси зі спіральним, кубічним (ікосаедричним) і комбінованим типом симетрії.

Ступінь складності віріона може бути різною. У простих вірусів до складу віріона входить тільки нуклеїнова кислота та білки, які пов'язані в єдину нуклеопротеїнову структуру – *нуклеокапсид*. У складних вірусів є додаткова ліпопротеїнова оболонка – *суперкапсид* (рис. 8). Складні віріони можуть містити вуглеводи і деякі ферменти. Однак, віруси ніколи не містять метаболічних систем, які забезпечують обмін речовин.

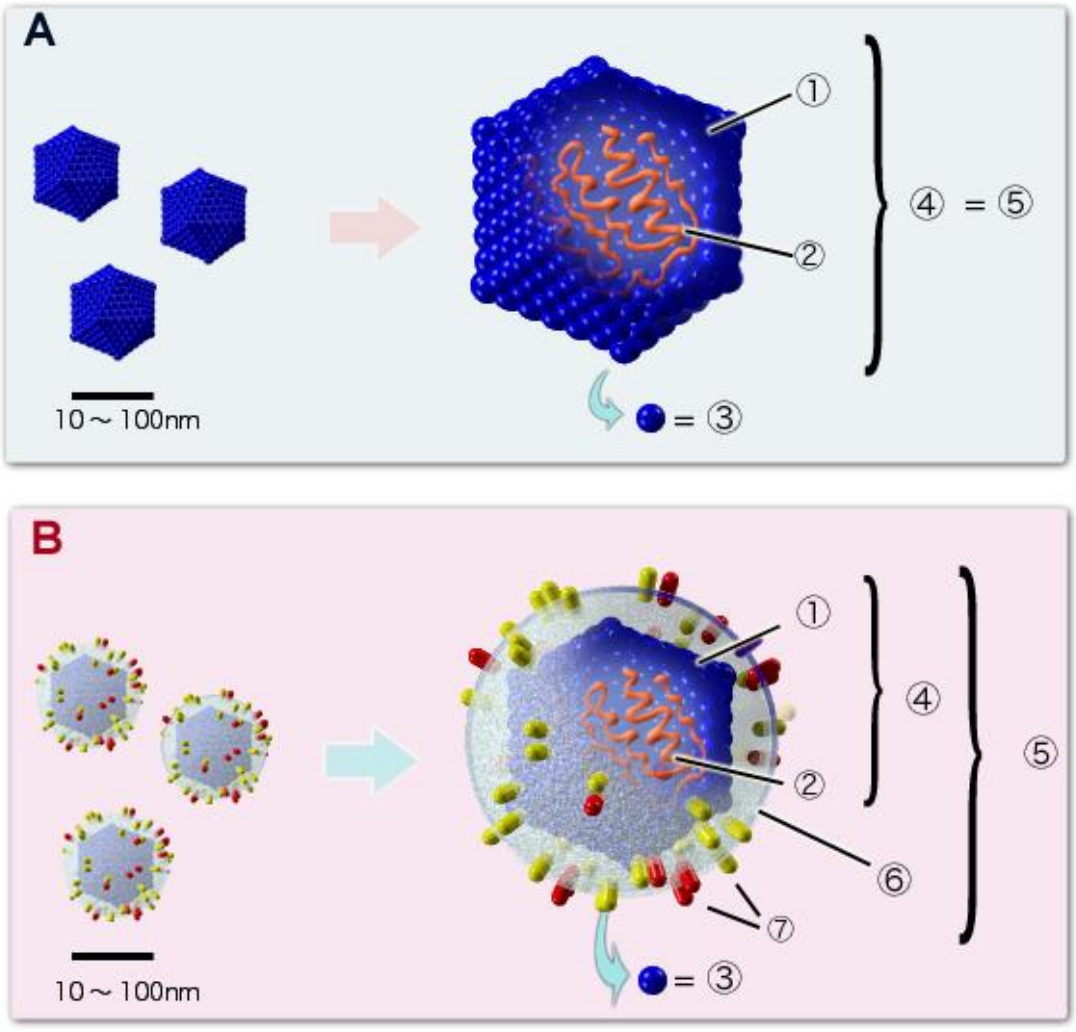


Рис. 8. **Приклади структур ікосаедричних віріонів**
A. Вірус, що не має ліпідної оболонки (наприклад, пікорнавірус).
B. Оболонковий вірус (наприклад герпесвірус).
Цифрами позначені: (1) капсид, (2) геномна нуклеїнова кислота, (3) капсомер, (4) нуклеокапсид, (5) віріон, (6) ліпідна оболонка, (7) мембранні білки оболонки.

Для власного відтворення віруси повинні проникнути в клітину. Поверхня капсиду включає хімічні речовини, що сприяють прикріпленню віріона до поверхні клітини і проникненню всього віріона або нуклеїнової кислоти до клітини. Спочатку відбувається адсорбція (фіксація) віріонів на поверхні клітини, а потім всередину клітини проникає або весь віріон, або тільки вірусна нуклеїнова кислота. У більшості випадків віруси проникають у клітину шляхом *віропексису* (цей механізм проникнення вірусів у клітину схожий з фагоцитозом).

Як і будь-яка чужорідна речовина, нуклеїнові кислоти вірусів, що проникли в клітину, повинні руйнуватися захисними системами клітини. Основу захисних систем складають *нуклеази* – ферменти, що розщеплюють нуклеїнові кислоти. Однак, існує безліч способів захисту вірусних нуклеїнових кислот від руйнування ферментними системами клітини. Наприклад, у великих ДНК-вмісних бактеріофагів до складу вірусної ДНК входять модифіковані основи: окислені та метильовані. Така модифікована ДНК не руйнується клітинними нуклеазами.

Після проникнення в клітину віруси вступають до вегетативно-репродуктивної фази, тобто набувають здатність до обміну речовин і відтворення, причому, метаболізм вірусів нерозривно пов’язаний з метаболізмом клітини-господаря. Таким чином, віруси є облігатними (обов’язковими) спеціалізованими внутрішньоклітинними паразитами на молекулярно-генетичному рівні.

Багато вірусів приступають до репродукції відразу ж після проникнення до цитоплазми клітини-господаря. Проте у ряді випадків нуклеїнові кислоти вірусів вбудовуються (інтегруються) до складу хромосом господаря. В інтегрованому стані вірус називається *провірус*. Провіруси не відрізняються від генетичного матеріалу господаря і відтворюються разом з ним. В інтегрованому (вірогенному) стані віруси можуть знаходитися тривалий час. Але в ряді випадків (при зміні фізіологічного стану клітини, наприклад, при опроміненні) починається репродукція вірусу. За допомогою ферментів і пластичних речовин клітини йде реплікація вірусних нуклеїнових кислот та синтез вірусних білків. Шляхом самозбирання з цих молекул формується безліч віріонів, які покидають клітину. При цьому клітина може загинути або зберегтися.

Віруси – збудники багатьох інфекційних захворювань рослин, тварин і людини. У той же час, віруси – збудники захворювань у

небажаних для людини організмів («вороги наших ворогів»). Відповідно їх біологічне значення в першу чергу пов'язується з їх патогенністю – здатністю викликати захворювання. Розрізняють гострі вірусні захворювання (наприклад, грип), хронічні та латентні (приховані).

Боротьба з вірусними захворюваннями людини і тварин ведеться з використанням неспецифічних препаратів (наприклад, інтерферону), специфічних сироваток і препаратів, що пригнічують репродукцію вірусів. Для профілактики вірусних захворювань застосовують різні вакцини. Антибактеріальні препарати (сульфаніламіди, антибіотики) на віруси не діють.

Деякі віруси (аденовіруси, ретровіруси) можуть перешкоджати нормальному функціонуванню генетичного апарату клітини господаря, що призводить до розвитку онкологічних захворювань.

Існують інфекційні агенти, які не є вірусами. До однієї з цих груп відносяться *віроїди* – дрібні одноланцюгові кільцеві молекули РНК довжиною до 300 нуклеотидів, що не кодують власних білків і не мають власного капсиду. Віроїди викликають багато хвороб рослин, наприклад, веретеноподібні бульби картоплі. До віроїдів близькі *вірусоіди*. Це молекули РНК, які здатні до самовідтворення в присутності вірусу-помічника. Вірусоіди також викликають захворювання рослин, наприклад, минущу смугастість люцерни.

Віруси широко використовуються як об'єкти молекулярно-генетичних досліджень. У генної інженерії віруси застосовуються для створення генетичних конструкцій і для перенесення генетичного матеріалу.

Геном вірусів. Геном вірусів характеризується наступними особливостями:

- Структурні гени, які кодують білки, займають приблизно 95% вірусної хромосоми. Білки вірусів можна розділити на кілька груп: структурні, ферменти, регулятори.
- Регуляторні послідовності, які не кодують білки:
  - промотори;
  - оператори;
  - термінатори.
- Інші некодуючі ділянки (сайти), у тому числі:
  - ділянка *attP*, що забезпечує інтеграцію вірусної хромосоми в хромосому клітини-господаря;

- ділянки *cos* – липкі кінцеві ділянки лінійних вірусних хромосом, що забезпечують замикання лінійної хромосоми в кільцеву форму.

Гени, які кодують рРНК і тРНК, в геномі вірусів зазвичай відсутні. Однак, в геномі великого фага Т4 є гени, що кодують декілька тРНК.

Геном вірусів відрізняється високою щільністю упаковки інформації. Наприклад, у фага *φX*174 у межах одного гена може розташовуватися ще один ген. Зокрема, ген В знаходиться в межах гена А, а ген Е – у межах гена D. У дрібного РНК-місткого фага f2 ген регуляторного білка, що блокує лізис (дозрівання віріонів і руйнація клітини), перекривається з двома іншими генами, віддаленими один від одного.

Як вже зазначалось вище основним критерієм для класифікації вірусів є вид нуклеїнової кислоти, що містить їх спадкову інформацію. Таким чином, виділяють дві основні групи вірусів: ДНК-вмісні та РНК-вмісні.

До *ДНК-вірусів* (генетична інформація закодована в ДНК) відносяться багато вірусів бактерій – бактеріофаги (або просто фаги). Деякі дрібні фаги (наприклад, фаг М13) при репродукції не руйнують клітину. Репродукція великих фагів (наприклад, фага Т-4) призводить до загибелі клітини. Фаг Т-4 – це один з найбільш складно організованих вірусів. Білковий капсид включає не менше 130 білків, які формують голівку, комірець, хвіст, базальну пластинку і хвостові нитки. Така будова капсиду дозволяє впорскувати ДНК у бактеріальну клітину через товсту оболонку, тому подібні віруси фігурально називають «живими шприцами». Т-фаги можуть існувати у вигляді профага тривалий час.

До ДНК-вірусів відносяться збудники багатьох захворювань людини і тварин: віруси віспи, герпесу, гепатиту В, аденовіруси ссавців і людини (викликають шлунково-кишкові захворювання, ГРВІ, кон'юнктивіти), віруси бородавок людини. До ДНК-вірусів відносяться і деякі віруси рослин (вірус золотистої мозаїки квасолі, вірус мозаїки кольорової капусти). Деякі віруси використовуються в генній інженерії для перенесення генів від одних організмів до інших, наприклад, мавпячий вірус SV 40.

Об'ємом ДНК визначається кількість білків у віріона: один поліпептид кодується відрізком ДНК довжиною приблизно 1 тисяча нуклеотидів (нуклеотидних пар). Після проникнення в клітину вірусна ДНК стає матрицею для синтезу ДНК і РНК.

Приклади організації геному ДНК-вірусів:

1. Кільцева дволанцюгова ДНК довжиною близько 5 т.п.н.
   - Мавпячий вірус SV 40. Дрібний еукаріотичний вірус. Віріони у вигляді ікосаедра. Капсид білковий. Використовується в генній інженерії як вектор перенесення генів. Кодує 5 білків.
   - Віруси бородавок людини.
2. Кільцева однотяжева ДНК довжиною близько 5 т.н.; може бути як кодуюча, так і антикодуюча.
   - Дрібні бактеріофаги типу М13. Не руйнують клітину. Капсид включає 8 білків.
   - Вірус золотистої мозаїки квасолі.
3. Лінійна дволанцюгова ДНК довжиною 30-150 т.п.н.
   - Бактеріофаги типу Т4. Віріони великі. Білковий капсид із 130 білків включає: голівку, хвостовий відділ і хвостові нитки. Ці віруси можуть існувати у вигляді профага тривалий час.
   - Аденовіруси ссавців і людини. Віріони середніх розмірів у вигляді ікосаедра. Капсиди білкові. Викликають ГРВІ, кон'юнктивіти, шлунково-кишкові захворювання, іноді мають онкогенні властивості.
   - Віруси віспи, герпесу та їм подібні. Віріони великі. Є липопротеїнова оболонка.
4. Лінійна одноланцюгова ДНК довжиною близько 5 т.н; ДНК може бути як кодуюча, так і антикодуюча. У людини відомі як супутники аденовірусів.
5. Дволанцюгова ДНК, замкнута в кільце із сегментів, що перекриваються. Довжина ДНК – 3-8 т.п.н.
   - Вірус гепатиту В. Віріон сферичний, середніх розмірів. Є додаткова оболонка з вірусних і клітинних білків. Кодує 5 білків.
   - Вірус мозаїки кольорової капусти (CaMV). Промотор 35S-RNA (CaMV35S) цього вірусу широко використовується в традиційній генній інженерії для створення генетичних конструкцій.

До *РНК-вірусів* (генетична інформація закодована в РНК) відносяться багато вірусів рослин, збудники захворювань людини і тварин: вірус поліомієліту, віруси грипу А, В і С, віруси паротиту (свинки), кору, чуми м'ясоїдних тварин (чумки), сказу, вірус імунодефіциту людини (ВІЛ). В окрему групу виділяються арбовіруси, які переносяться членистоногими (кліщами, москітами), наприклад, віруси кліщового енцефаліту, жовтої лихоманки. Багато РНК-вірусів викликають ГРВІ (гостра респіраторна вірусна інфекція) (наприклад,

коронавіруси), шлунково-кишкові захворювання (реовіруси птахів, ссавців і людини). Деякі РНК-віруси використовуються в біотехнології, наприклад, віруси поліедроза комах.

Віріони РНК-вірусів містять РНК. Після проникнення в клітину вірусна РНК стає матрицею для синтезу ДНК і РНК.

Приклади організації геному РНК-вмісних вірусів:

1. Лінійна одноланцюгова матрична РНК (плюс-ланцюг, який кодує білок) завдовжки близько 4 т.н.; у вигляді єдиної молекули або у вигляді декількох різних молекул. Плюс-ланцюг одразу ж може використовуватися для трансляції. Вегетативно-репродуктивна фаза цих вірусів протікає в цитоплазмі. У плюс-ланцюгу закодована РНК-репліказа (РНК-залежна РНК-полімераза). Представники:
   - Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) – сегментована РНК. Віріон ниткоподібний (18×300 нм).
   - Вірус поліомієліту – несегментована РНК. Віріони дрібні, у вигляді ікосаедра. Капсид білковий.
   - Вірус сказу. Ниткоподібний віріон. Є додаткова липопротеїнова оболонка.
   - Арбовіруси (переносяться членистоногими: кліщами, москітами) – віруси кліщового енцефаліту, жовтої лихоманки. Морфологія і розміри віріонів різноманітні, наприклад, вірус енцефаліту містить 9 білків. Є додаткова липопротеїнова оболонка.
   - Дрібні бактеріофаги (з несегментованою РНК).
2. Лінійна одноланцюговая комплементарна РНК (мінус-ланцюг, порядок нуклеотидів комплементарний по відношенню до мРНК). Мінус-ланцюг не може використовуватися для трансляції та бути матрицею для синтезу плюс-ланцюга. Вегетативно-репродуктивна фаза цих вірусів також протікає в цитоплазмі.
   - Віруси грипу А, В, С. Вірус грипу А містить мінус-ланцюг РНК, що складається з 8 фрагментів. Фрагменти РНК пов’язані з вірусними білками і утворюють спіральний нуклеокапсид. Поверх нуклеокапсиду розташовується гліколіпопротеїновий суперкапсид. У складі віріона 10 білків. До складу суперкапсиду входить два білка, що визначають антигенні властивості вірусу: гемаглютинін і нейрамінідазу. Крім того, до складу віріона входить вже готова РНК-репліказа, що забезпечує синтез плюс-ланцюга на матриці мінус-ланцюга.

- Віруси паротиту (свинки), кору, чуми м’ясоїдних тварин (чумки). Сферичний віріон середніх розмірів. Є додаткова липопротеїнова оболонка.

3. Лінійна дволанцюгова РНК
   - Дрібні бактеріофаги. Віріони дрібні, сферичні або у вигляді ікосаедра. Капсид білковий. Віруси поліедроза комах. Використовуються в біотехнології (для синтезу інтерферону).
   - Реовіруси птахів, ссавців і людини. Віріони дрібні, сферичні або у вигляді ікосаедра. Капсид білковий. Викликають ГРВІ, шлунково-кишкові захворювання. РНК фрагментована (10...11 фрагментів), кодує 11 білків.
4. Дві лінійні одноланцюгові однакові молекули мРНК довжиною близько 10 т.н. Ретровіруси. Здатні інтегруватися в ДНК. До складу віріонів входить фермент зворотна транскриптаза (ревертаза). Є додаткова ліпопротеїнова оболонка. Багато ретровірусів викликають онкологічні захворювання: лейкози, саркоми, пухлини молочних залоз. До ретровірусів відноситься і вірус імунодефіциту людини, що викликає СНІД. Він містить одну плюс-ланцюгову РНК, яка кодує 13 білків. Сферичний віріон. Є додаткова липопротеїнова оболонка, що включає фрагменти мембран людини. Вибірково вражає Т-лімфоцити.

Разом з тим, у вірусів еукаріотів виявлено наступні особливості:

1. Інтрон-екзонна структура генів: чергування кодуючих і некодуючих ділянок.
2. Модифікація білків після синтезу поліпротеїнів: весь геном транскрибується у вигляді однієї молекули мРНК, яка служить матрицею для синтезу поліпротеїну – одного гігантського інертного білка, і лише потім відбувається розщеплення поліпротеїну на білки, що виконують певні функції.
3. Перекривання генів: одна послідовність може належати до декількох окремих генів.

Таким чином, віруси є особливими біологічними структурами. Перш за все виникає питання, чи можна їх вважати живими? Істина залежить від прийнятого визначення життя. Зазвичай віруси вважаються живими за «функціональним» визначенням життя, проте не за «структурним».

Функціональне визначення життя ґрунтується на переліку аксіом, які не залежать від його структури. Їм повинен відповідати кожен

організм, щоб його можна було визнати живим. До них належать такі вимоги:

- здатність до розмноження;
- можливість змінювати спадковість, що впливає на еволюційну потенцію.

Наприклад, кристали, пріони чи комп'ютерні віруси, хоча й здатні розмножуватися, не володіють жодними істотними спадковими рисами, отже не є живими. Біологічні віруси згідно з цими аксіомами, є живими.

2.2. Особливості структури геномів і генів прокаріот

Прокаріоти (від старогрец. *προ* «перед» і *κάρυον* «ядро»), або до ядерні – це організми, в клітинах яких відсутнє оформлене ядро. Його функції виконує *нуклеоїд* (тобто «подібний ядру»); на відміну від ядра, нуклеоїд не має власної оболонки.

Тіло прокаріотів, як правило, складається з однієї клітини. Однак, при неповному діленні клітин виникають нитчасті, колоніальні та полінуклеоїдні форми (бактероїди).

У прокаріотичних клітинах відсутні постійні двомембранні та одномембранні органоїди: пластиди і мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі та їх похідні. Їх функції виконує *мезосома* – складки плазматичної мембрани. У цитоплазмі фотоавтотрофних прокаріотів є різноманітні мембранні структури, на яких протікають реакції фотосинтезу. Іноді їх називають бактеріальними хроматофорами.

Специфічною речовиною клітинної стінки прокаріотів є *муреїн*, проте у деяких прокаріотів муреїн відсутній. Поверх клітинної стінки часто є слизова капсула. Простір між мембраною і клітинною стінкою служить резервуаром протонів при фотосинтезі та аеробному диханні.

Розміри клітин прокаріотів змінюються від 0,1-0,15 мкм (мікоплазми) до 30 мкм і більше. Більшість бактерій має розміри 0,2-10 мкм. У рухливих бактерій є джгутики, основою яких служить білки *флагелліни* (рис. 9).

Більшість прокаріотів – бактерії, і ці два терміни раніше розглядалися як синоніми. Проте, американський вчений Carl Richard Woese (1928-2012) запропонував поділ прокаріотів на бактерій та археїв (*Bacteria* та *Archaea*, спочатку *Eubacteria* і *Archaebacteria*) через істотні генетичні відмінності між цими групами. Система поділу на

еукаріотів, бактерій та археїв зараз вважається визнаною та називається «Системою трьох доменів».

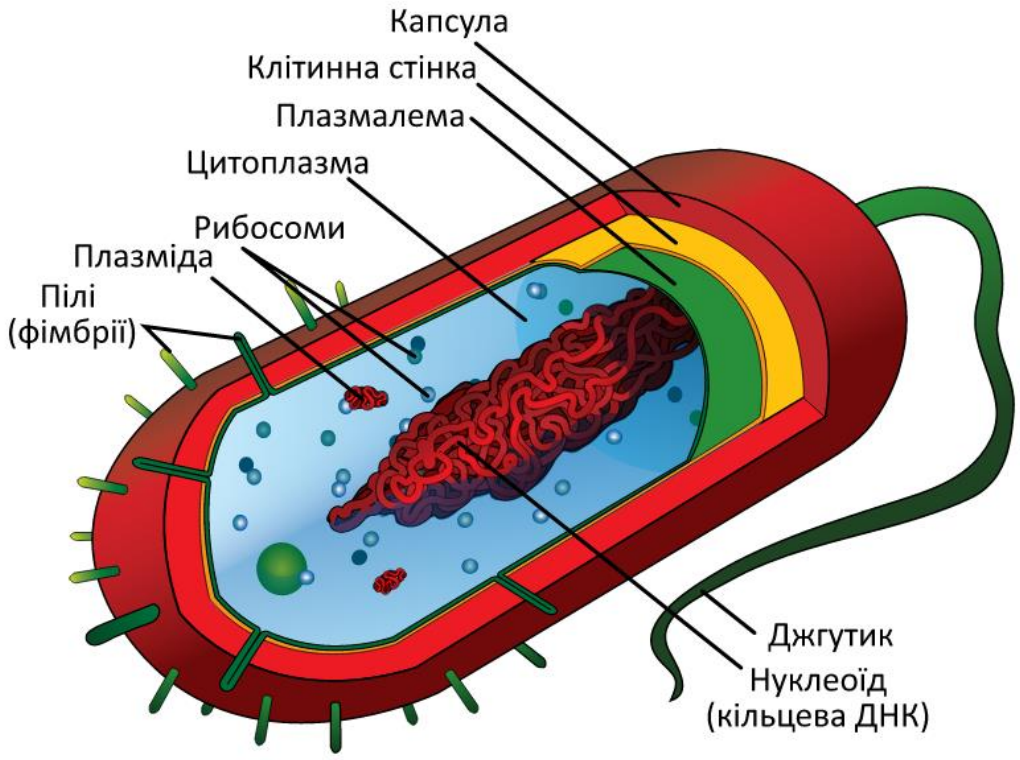


Рис. 9. **Загальна схема будови прокаріотичної клітини**

Структура геному бактерій. Дослідження бактеріальних клітин за допомогою електронної мікроскопії в м'яких умовах без попередньої хімічної фіксації показало, що нуклеоїди представлені у вигляді дифузно забарвлених ділянок, вільних від рибосом. Витягнуті ділянки ДНК на зовнішній частині нуклеоїдів спрямовані в навколишню цитоплазму і утворюють так звані «петлі», які зазвичай інтерпретують як сегменти бактеріальної хромосоми, залучені до транскрипції. Вважають, що ці ділянки складаються з петель ДНК бактеріальної хромосоми, які залежно від фізіологічного стану клітини знаходяться в транскрипційно-активному стані або втягуються всередину нуклеоїдів при послабленні чи згасанні транскрипції. Модель функціонально-активного нуклеоїда можна розглядати в якості аналогії зі структурою хромосом типу лампових щіток у тварин (рис. 10).

Таким чином, нуклеоїд бактеріальних клітин не є статичним внутрішньоклітинним утворенням або компартментом, який можна чітко визначати морфологічно, навпаки, під час різних фаз росту бактеріальних клітин нуклеоїд безперервно змінює форму, що, мабуть, пов'язане з транскрипційною активністю певних бактеріальних генів.

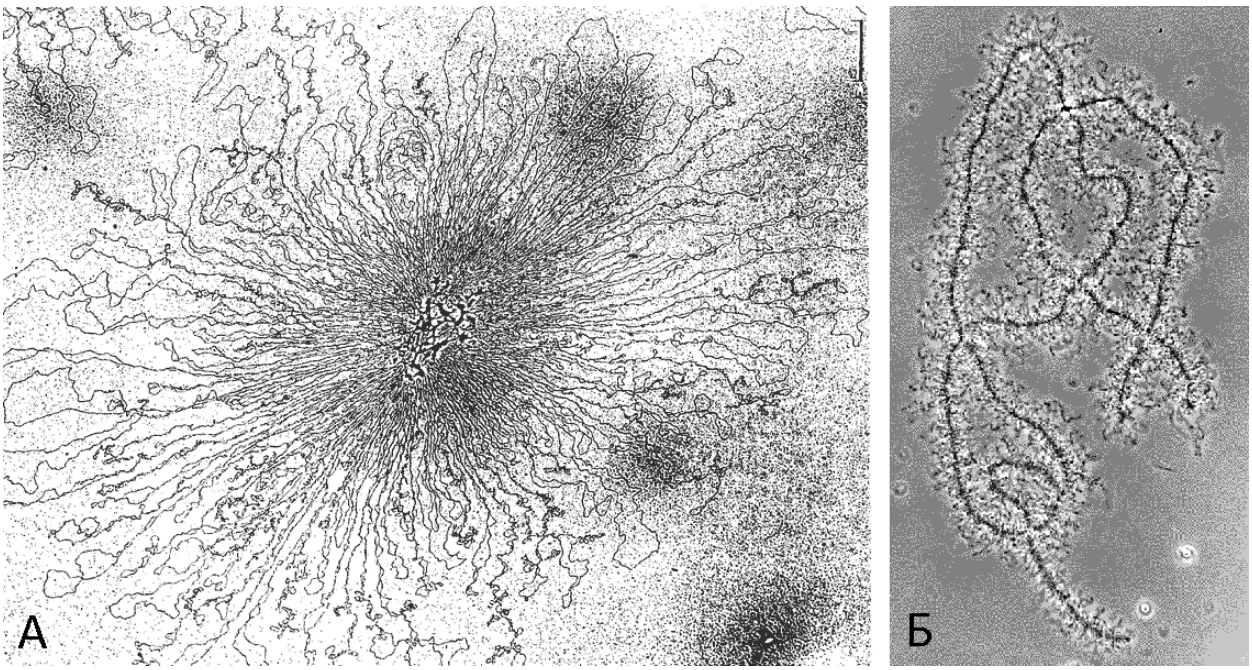


Рис. 10. **Нуклеоїд *E.coli* (А) і хромосома типу лампових щіток (Б)**

За допомогою специфічних антитіл встановлено, що ДНК нуклеоїда асоційована з молекулами РНК-полімерази, ДНК-топоізомерази І та багатьма ДНК-зв'язуючими білками, зокрема гістоноподобними білками HU, H-NS і IHF. Топоізомерази при цьому впливають на функціонування бактеріальних хромосом та їх внутрішньоклітинну компактизацію. Однак детальні молекулярні механізми конденсації бактеріальної ДНК з утворенням лабільних «компактосом» поки невідомі. Останнім часом зростає інтерес до бактеріального, так званого, LP-хроматину (від англ. *Low Protein chromatin*), для якого характерний відносно низький вміст білкового компонента. Аналогічний LP-хроматин виявлено у вірусів, у мітохондріях, пластидах і у джгутиконосців. Отже, цей тип структурної організації генетичного матеріалу претендує на універсальність і асоційований з певними формами регуляції експресії генів, властивими прокаріотам.

Крім бактеріальної хромосоми до складу генетичного апарату прокаріот входять безліч дрібних репліконів – *плазмід* – кільцевих молекул ДНК довжиною декілька т.п.н. Плазміди такого розміру містять кілька десятків генів. Зазвичай це «гени достатку», які забезпечують стійкість до антибіотиків, важких металів, температур, що кодують специфічні токсини, а також гени кон'югації та обміну генетичним матеріалом з іншими особинами. Відомі, також, дрібні плазміди довжиною 2-3 т.п.н., які кодують не більше 2 білків. У багатьох бактерій відкрито мегаплазміди довжиною близько м.п.н.,

тобто трохи менше бактеріальної хромосоми. Плазміди можуть бути: прикріплені до мезосоми, перебувати в автономному та в інтегрованому стані. В останньому випадку плазміда включається до складу бактеріальної хромосоми в певних сайтах *attB*. Таким чином, одна і та ж плазміда може включатися до складу хромосоми і може вирізатися з неї. Існують плазміди, що представлені однією копією – вони реплікуються синхронно з ДНК бактеріальної хромосоми. Інші плазміди можуть бути представлені багатьма копіями, і їх реплікація відбувається незалежно від реплікації бактеріальної хромосоми. Реплікація вільних плазмід часто протікає за принципом «котиться кільце» – з однієї кільцевої матриці ДНК зчитується «нескінченна» копія.

Оскільки реплікація плазмід може бути синхронізована з реплікацією бактеріальної хромосоми, але може бути і незалежною, розподіл плазмід у дочірні клітини може бути однаковою або нерівномірною.

Археї. Домен археї є своєрідною і найменш вивченою таксономічною групою прокаріот. Хоча за своєю морфологією археї схожі на звичайні бактерії (рис. 11), на молекулярному рівні вони зближені з еукаріотами. Ці мікроорганізми часто розглядають як прокаріотичні еволюційні попередники еукаріот, у зв’язку з чим є доцільним розгляд будови геному археїв більш детально.

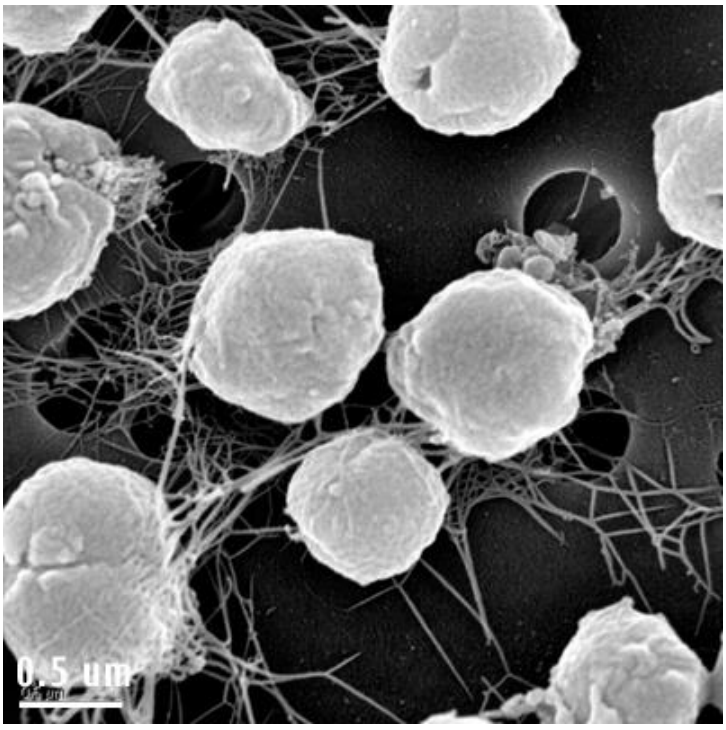


Рис. 11. **Зовнішній вигляд термофільного архею *Methanococcus Jannaschii***

Археї подібні до інших прокаріот у більшості аспектів структури клітини та метаболізму. Зокрема, археї мають одиничну кільцеву хромосому (нуклеоїд), розмір якої коливається від 5,75 до 0,49 м.п.н. Найменший геном серед археїв (*Nanoarchaeum equitans*) містить лише 537 генів, які кодують білки. Також у археїв виявлено більш дрібні незалежні молекули ДНК – плазміди.

Для археїв, як і для бактерій, характерна організація генів у вигляді оперонів. Однак, у першому випадку оперони зустрічаються рідко і майже завжди об'єднують гени субодиниць білкових комплексів, наприклад РНК-полімерази, рибосом або метил-коензим М-редуктази. Тим часом, оперони, які містять гени здійснення послідовних метаболічних реакцій, досить рідкісні.

Більшість ДНК-локусів археїв несхожі з вже відомими послідовностями. Зокрема, до 15 % білків, що кодуються різними археями, є унікальними для цього домену. Функції багатьох цих білків й досі невідомі. Тим не менш білки, функція яких встановлена, задіяні в метаногенезі. У свою чергу білки, спільні для археїв, бактерій та еукаріот, беруть участь в основних клітинних функціях і задіяні, як правило, в транскрипції, трансляції та метаболізмі нуклеотидів.

Детальніший аналіз структури геному археїв показав, що гени, які організують системи обробки генетичної інформації – транскрипції, трансляції та реплікації ДНК, більшою мірою нагадують гени еукаріот, ніж бактерій.

При порівняльному аналізі генів системи транскрипції виявилося, що субодиниці, які формують мінімальний фермент РНК-полімерази археїв і бактерій, є гомологічними. Однак, археї володіють малими додатковими субодиницями, які не характерні бактеріям, а їх гомологи є у РНК-полімерази еукаріот. Зокрема два з основних фактора транскрипції археїв гомологічні відповідним факторам еукаріот. Разом з тим, один або два чинники розглядаються, як «рудиментарні» форми відповідних еукаріотичних факторів. Таким чином, система транскрипції археїв сьогодні представляється як більш проста і, можливо, більш примітивна версія відповідної еукаріотичної системи.

Дозрівання РНК у археїв більш спрощене, ніж у еукаріот, оскільки більшість генів не містить інтронів. Хоча в генах транспортних і рибосомальних РНК їх достатньо багато. Також інтрони у невеликій кількості присутні в генах, що кодують деякі білки.

Гени системи трансляції археїв виявились більш подібними з аналогічними генами еукаріот. Рибосомні РНК і білки, як правило,

гомологічні відповідним структурам еукаріот. Більшість розпізнаних факторів трансляції у археїв також виявились еукаріотичного типу. Те ж, хоча і в меншій мірі, відноситься до аміноацил-тРНК-синтетаз.

Також у геномі археїв знайдено лише один ген, який кодує ДНК-полімеразу. Остання більш подібна до еукаріотичної ДНК-полімерази ε.

Високу гомологію з білками еукаріот виявляють й інші білки археїв: гістони, білки, контролюючі поділ клітини, протеасоми та білки систем репарації та транспорту.

Отже, незважаючи на те що археї, відносячись до окремого домену, за рядом своїх генетичних властивостей наближаються до еукаріот, проте розмір їх геному і набір основних генів залишається подібним з бактеріями.

З рештою, геном всіх прокаріот побудований дуже компактно. Кількість некодуючих послідовностей нуклеотидів мінімальна, інтрони рідкісні. Більше того, у прокаріот для кодування білків часто використовуються дві або всі три рамки зчитування одного і того ж гену. Це підвищує кодуючий потенціал геному без збільшення його розміру. Більшість механізмів регуляції експресії генів, що використовується еукаріотами, ніколи не зустрічаються у прокаріот. Таким чином, простота будови геному прокаріот пояснюється, перш за все, їх спрощеним життєвим циклом, протягом якого прокаріотичні клітини, як правило, не зазнають складних диференціювань, пов'язаних з глобальним перемиканням експресії одних груп генів на інші, або тонкою зміною рівнів їх експресії, що має місце в онтогенетичному розвитку еукаріот.

2.3. Структурна організація геному еукаріот

Еукаріоти. На відміну від прокаріот основна частина геному еукаріот знаходиться в спеціальній клітинній органелі (компартменті), який називається *ядро*, а значно менша частина – в мітохондріях, пластидах і центріолях (рис. 12, 13). Так само, як і у прокаріот, інформаційною макромолекулою геному еукаріот є ДНК, яка нерівномірно розподілена в декількох хромосомах у вигляді комплексів з численними білками. Ці ДНК-білкові комплекси еукаріот отримали назву *хроматину*.

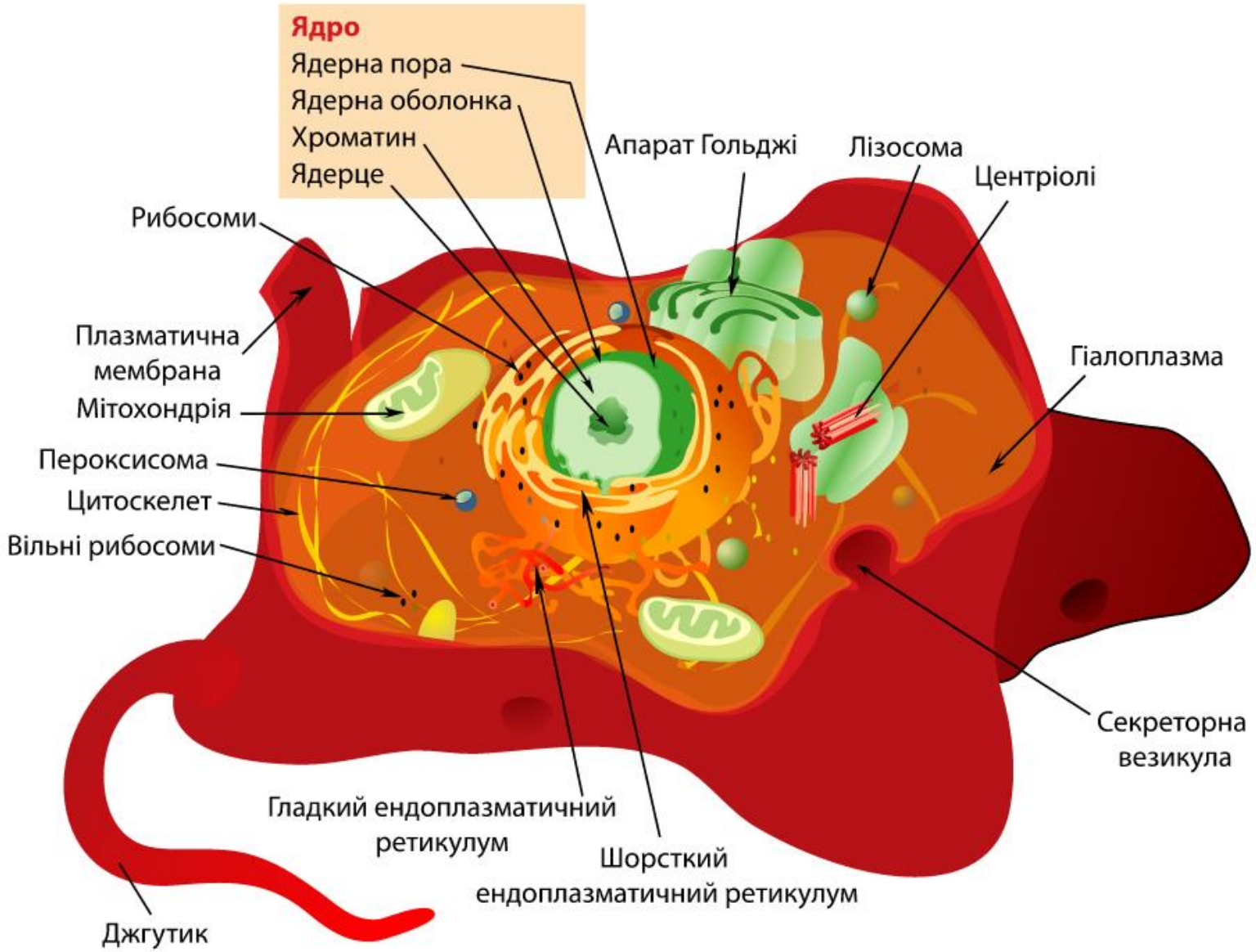


Рис. 12. **Будова тваринної клітини**

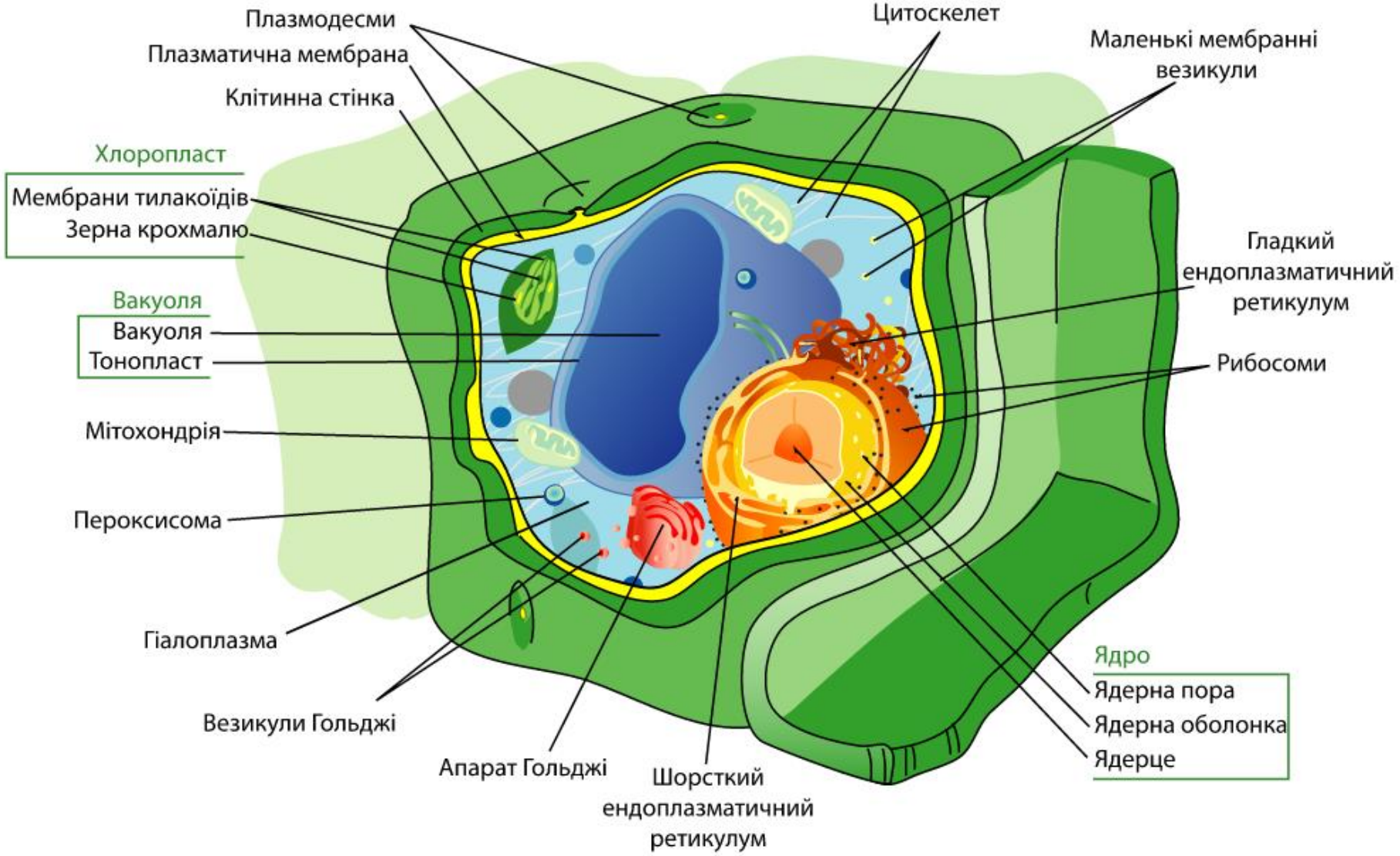


Рис. 13. **Будова рослинної клітини**

Упродовж клітинного циклу хроматин зазнає високовпорядкованих структурних перетворень у вигляді послідовних конденсацій-деконденсацій. У соматичних клітинах при максимальній конденсації в метафазі мітозу ці перетворення супроводжуються формуванням видимих у мікроскопі метафазних хромосом. Як морфологія метафазних хромосом, так і їх число є унікальними характеристиками виду. Сукупність зовнішніх ознак хромосомного набору еукаріот отримала назву *каріотипу*.

Кількісні особливості геному еукаріот. Геном еукаріот істотно відрізняється від геному прокаріот за низкою ознак, серед яких необхідно відзначити його надлишковість. Цей факт легко виявляється при визначенні співвідношення числа генів до кількості ДНК в геномі бактерій та еукаріот. Якщо середній розмір гена бактерій 1500 п.н., а довжина кільцевої молекули ДНК хромосоми *E.coli* та *B.subtilis* становить понад 1 мм, то в такій хромосомі можуть розміститися близько 3 тисячі генів. Приблизно таке число генів і було експериментально визначено для цих бактерій за числом типів іРНК. Якщо їх кількість помножити на середній розмір гена, то вийде, що близько 95% генома бактерій складається з кодуючих послідовностей. Решта 5%, очевидно, зайняті регуляторними елементами. Інша картина спостерігається в еукаріотичних організмах. Наприклад, у людини нараховують приблизно 50 тисяч генів (мається на увазі тільки сумарна довжина кодуючих ділянок ДНК – екзонів). У той же час розмір генома людини 3×10^9 (три мільярди) п.н. Відповідно його кодуюча частина складає всього 15-20% від тотальної ДНК. Підвищений вміст ДНК в геномі еукаріот не можна пояснити одним лише збільшенням потреби цих організмів у додатковій генетичній інформації у зв’язку з ускладненням організації, оскільки більша частина їх геномної ДНК, як правило, представлена некодуючими послідовностями нуклеотидів. Розмір геному організмів, що знаходяться на нижчих щаблях еволюційного розвитку, часто перевищує розміри геномів більш високоорганізованих тварин і рослин. На сьогодні відомо, що велика частина ДНК геному еукаріот не кодує РНК і білки, і її генетичні функції не зовсім зрозумілі.

У зв’язку з вищезазначеним необхідно підкреслити неоднозначність термінів генотип і геном. Під *генотипом* слід розуміти сукупність усіх генів, що містяться в заплідненій яйцеклітині і є матеріальною основою спадковості, тим часом як поняття *геному* означає сукупність всієї генетичної інформації гаплоїдного набору

хромосом (як генів, так і некодуючих послідовностей ДНК) та кожного з позахромосомних генетичних елементів окремої клітини певного організму.

Послідовності нуклеотидів еукаріотичних геномів. Геном еукаріот складають *унікальні нуклеотидні послідовності* (гени), а також *послідовності різного ступеня повторюваності*. Ця фундаментальна особливість молекулярної структури геному еукаріот була виявлена наприкінці 60-х років XX ст. в дослідженнях американських вчених Roy John Britten (1919-2012), Eric H. Davidson (нар. 1937) та інших. Дане відкриття було зроблене за допомогою молекулярно-біологічного методу вивчення кінетики реасоціації денатурованої ДНК. Пізніше було встановлено, що вміст унікальних послідовностей в геномі варіює у різних організмів у діапазоні 15-98%. Незважаючи на те, що до фракції унікальних послідовностей, як правило, потрапляють деякі структурні гени, велика їх частина є некодуючою і зазвичай не містить в собі генетичної інформації в загальноприйнятому значенні цього терміна. Добре відомим прикладом таких унікальних послідовностей є *інтрони* – фрагменти структурних генів, які не містять спадкової інформації. Загальний розмір інтронів, як правило, на порядок перевищує сумарний розмір *екзонів* – фрагментів структурних генів, які кодують окремі домени функціонально важливих білків або РНК.

Еволюційне виникнення мозаїчної (інтрон-екзонної) структури генів еукаріот, а також консервативний характер успадкування розмірів цих фрагментів і взаємного їх розташування в генах, не має вичерпного пояснення через відсутність тиску природного відбору на послідовності нуклеотидів, які не здійснюють чітких біологічних функцій. Нині існує дві основні концепції їх виникнення:

- «*Гіпотеза пізнього виникнення інтронів*» – поява інтронів, яка, мабуть, співпала з еволюційним виникненням багатоклітинних організмів, забезпечила можливість обміну екзонами між неспорідненими генами;
- «*Гіпотеза еволюційних реліктів*» – сучасні інтрони раніше були частиною гігантських генів.

Не менш загадковим з еволюційної точки зору залишається феномен виникнення в геномі багатоклітинних організмів великої кількості некодуючих послідовностей, що повторюються. Такі повтори представлені в геномі еукаріот множинними копіями. Сучасна їх класифікація виділяє дві групи залежно від кількості повторів:

- послідовності, що часто повторюються (10^5 на геном і частіше);
- послідовності, що помірно повторюються (10^4 на геном і рідше).

Добре вивченим представником перших є *сателітна ДНК*, яка складається з коротких тандемних повторів довжиною, як правило, 1-100 п.н., організованих у довгі блоки від 100 т.п.н. до понад 1 м.п.н. Свою назву вони отримали на підставі того, що при аналізі сумарної еукаріотичної ДНК центрифугуванням в градієнті щільності хлористого цезію вони супроводжували основний пік оптичної щільності у вигляді плеча (супутника, сателіта). Для сателітів характерний ряд властивостей, серед яких найбільш важливі:

а) швидка і точна реасоціації (відновлення зв'язків) в процесі ренатурації ДНК;
б) безліч копій;
в) гомогенний склад у вигляді протяжних кластерів (сукупності блоків нуклеотидів, які характеризуються подібним складом);
г) пурин-піримідинова асиметрія у розподілі нуклеотидів в ланцюгах ДНК;
д) концентрування в прицентромірному гетерохроматині;
е) обмежена реплікація (недореплікація) при політенізації хромосом (багаторазове подвоєння хромосом без їх розходження та поділу клітини, що супроводжується утворенням гігантських багатониткових (політенних) хромосом);
ж) знаходження в складі хромосом у вигляді тандемно (один за одним) розташованих кластерів.

Вміст сателітної ДНК в геномі еукаріот може коливатись в межах 5-50% від сумарної кількості ДНК. У людини добре відома альфоїдна ДНК, яка розташована в центромерах всіх хромосом. Довжина одного повтору становить 171 п.н., а вісь повторюваний регіон становить 3-5 % довжини ДНК кожної хромосоми.

Класифікують сателіти на дві групи:

1) *Мікросателіти*, також відомі як короткі тандемні повтори (англ. short tandem repeats, STR) – тип тандемних повторів, ділянки ДНК, які складаються з коротких серій нуклеотидів довжиною 1-6 п.н., при повному розмірі ділянки не більше 150 п.н.;
2) *Мінісателіти* – тип тандемних повторів, ділянки ДНК, які складаються з коротких серій нуклеотидів довжиною 7-100 п.н., а повний розмір ділянки зазвичай не перевищує 1-20 т.н.п. До цієї групи відносяться регіони ДНК, розташовані на кінцях лінійних хромосом – *теломери*. Кожний поділ клітин супроводжується

вкороченням цих послідовностей на 50-100 п.н., оскільки ДНК-полімераза неспроможна реплікувати кінцеві ділянки ДНК. Якби не теломери, це швидко приводило б до втрати важливої генетичної інформації, яка потрібна для нормального функціювання клітини. Таке скорочення теломер, як вважається, грає певну роль у процесі старіння.

Мікро- та мінісателітна ДНК характеризується високою варіабельністю за кількістю копій в геномах організмів навіть одного виду і в ряді випадків володіє генетичною нестабільністю як в нормі, так і при деяких патологічних станах організмів. Завдяки цій властивості міні- та мікросателіти часто називають тандемними повторами зі змінним числом копій *VNTR* (від англ. *Variable Number of Tandem Repeats*). Ця особливість – основа методу *генетичного фінґерпринтингу*, тобто порівняння людей на основі порівняння числа повторів варіабельних сателітів.

Інший тип повторів – *диперговані повторювані послідовності ДНК*, які не організовані у великі блоки, а розсіяні по геному. Повтори цього типу, інакше називаються помірно повторюваними послідовностями (від англ. *Medium Reiterated Frequency repeats – MERs*). Їх поділяють на два великих класи: *SINE* (від англ. *Short INterspersed Elements*) – короткі і *LINE* (від англ. *Long INterspersed Elements*) – довгі дисперговані елементи. Довжина *SINE*-елементів становить 90-400 п.о., разом з тим довжина *LINE*-послідовностей може досягати 7 т.п.о.

Добре вивченими повторами класу *SINE* в геномі людини і деяких приматів є так звані *Alu*-повтори, довжина повторюваної одиниці яких становить ~ 300 п.н. У людини ці повтори містять сайт, що розрізається ферментом рестрикції *Alu I*. *Alu*-повтори представлені в геномі людини ~ 10^6 копіями і в середньому зустрічаються через кожні 4 т.п.н., складаючи ~ 5% від сумарної кількості ДНК. Аналогічні в структурному відношенні повтори, названі *B1*, виявлені в геномі мишей та під іншими назвами описані у багатьох ссавців.

Хоча *LINE*-послідовності містять у собі гени зворотної транскриптази, що є ознакою *ретротранспозонів* (мобільних генетичних елементів тварин, які володіють структурною схожістю з геномом ретровірусів), для них характерна відсутність послідовностей довгих кінцевих повторів (англ. *Long Terminal Repeats – LTR*), типових для ретротранспозонів.

SINE- і *LINE*-повтори характеризуються генетичною нестабільністю. Їх загальними рисами є транскрибованість і здатність до транспозиції (зміни положення в геномі). Послідовності РНК, транскрибовані з помірних повторів, виявлені серед гетерогенних ядерних РНК, де їх частка сягає 20-30%. Є експериментальні свідчення того, що нові копії повторюваних елементів обох типів виникають у геномі в результаті функціонування механізму – ретротранспозиції. За участю подібного механізму під дією зворотної транскриптази спочатку утворюється кДНК на матриці РНК-транскрипту відповідного повтору, яка далі інтегрується в новий локус геному, як це відбувається у ретровірусів. Такий механізм дає можливість локально змінювати кількість копій певних послідовностей нуклеотидів в еукаріотичному геномі. Тим не менш, велика частина *LINE*-послідовностей нездатна до транспозиції, і їх, мабуть, можна віднести до *псевдогенів* – послідовностей, гомологічних послідовностям істинних генів, але які не експресуються.

Окрім того, до помірних повторів відносяться гени рРНК (у людини 200 на гаплоїдний набір, у миші – 100, у кішки – 1000, у риб і квіткових рослин – тисячі), тРНК, гени рибосомних білків і білків-гістонів.

Важливою особливістю еухроматинової частини геномів еукаріот є своєрідний принцип чергування унікальних і повторюваних послідовностей – *інтерсперсія*. Умовно виділяють два основних типи інтерсперсії, що отримали назви від тих видів, у яких вони вперше були описані: інтерсперсія типу «ксенопус» (виявлена у шпорцевої жаби *Xenopus laevis*) і типу «дрозофіла» (вперше описана у плодової мушки *Drosophila melanogaster*). Приблизно 50% генома *Xenopus laevis* займають унікальні послідовності довжиною 800...1200 п.н., які чергуються з повторюваними фрагментами, середній розмір яких становить 300 п.н. У решті частини геномів типу «ксенопус» відстані між сусідніми повторами значно перевищують 1...2 т.п.н. Структура геному типу «ксенопус» широко поширена, особливо серед тварин. Ссавці і людина також відносяться до цього типу організації геному. Зокрема у людини та інших приматів інтерсперсними повторами виступають *Alu*-подібні повтори.

У *D.melanogaster* параметри інтерсперсії різко відрізняються від видів з типом генома «ксенопус». Повторювані послідовності довжиною 5600 п.н. чергуються з унікальними, довжина яких не менше 13000 п.н. Варто відзначити, що у домашньої мухи геном

влаштований за типом «ксенопус». Цей факт прямо вказує на те, що в ході еволюції можливі дуже швидкі перетворення характеру чергування послідовностей і в еухроматичній частині геному. Птахи за параметрами інтерсперсії займають проміжне положення між типом «ксенопус» і типом «дрозофіла». Як показують результати досліджень останніх років, багато видів тварин і рослин за організацією генома не можна чітко й однозначно віднести ні до того, ні до іншого типу. Так, в геномах ссавців зустрічаються довгі повтори – в кілька тисяч пар нуклеотидів, в геномах лілійних до 90% ДНК може бути представлено повторюваними послідовностями. Наприклад, геном гороху не містить унікальних послідовностей, що перевищують за довжиною 300 п.н., тощо.

Інша особливість повторюваних послідовностей в геномах еукаріотів – інвертовані повтори, або *паліндроми* (відносно короткі взаємно комплементарні ділянки, які мають «дзеркальні» послідовності нуклеотидів). В умовах ренатурації вони практично миттєво формують дуплексні структури. По суті, паліндроми являють собою частину проміжних повторів. Однак, деякі високочастотні повтори в еухроматиновій частині геному, наприклад, члени *Alu*-сімейств, можуть зустрічатися як в прямому, так і в інвертованому стані. Іноді між інвертованими повторами містяться інші послідовності.

Окрім всього вказаного, в еукаріот описані деякі особливості структури ДНК, зумовлені специфікою нуклеотидного складу окремих послідовностей. Так, зустрічаються розташовані в одному ланцюзі блоки нуклеотидів, що складаються з декількох десятків пуринів. Тоді комплементарна частина в іншому ланцюзі ДНК буде представлена піримідином. Подібні послідовності названі поліпуриновими (поліпіримідиновими) блоками.

Інший вид гетерогенності пов’язаний з нерівномірністю змісту вздовж ДНК пар аденін-тимін (АТ-пари) і гуанін-цитозин (GC-пари). Так, в геномі дрозофіли періодично зустрічаються послідовності довжиною приблизно в 100 п.н., що на 85% складаються з АТ-пар. Оскільки аденін пов’язаний з тиміном двома водневими зв’язками, а гуанін з цитозіном – трьома, дестабілізуючі ДНК-впливи будуть легше ініціювати розплітання дуплексів ДНК з утворенням ділянок часткової денатурації в АТ-багатих областях. Тому останні розглядаються в якості сайтів ініціації елементарних генетичних процесів: реплікації, транскрипції та рекомбінації.

На закінчення відзначимо, що перераховані вище особливості молекулярної структури ДНК еукаріот не були передбачені ні класичною генетикою (за винятком, мабуть, властивостей гетерохроматину), ні моделлю подвійної спіралі Watson-Crick. Вони були розкриті при дослідженні структури геномів різних еукаріотичних організмів фізико-хімічними методами. Функції більшості повторюваних та унікальних послідовностей поки не визначені. Проте цілком імовірно, що сама по собі молекулярна структура ДНК еукаріот служить дзеркалом генетичної регуляції та еволюції вищих тварин і рослин.

Хроматин і компактизація ДНК. *Хроматином* називають складну суміш речовин, з яких побудовані хромосоми еукаріотів. Основними компонентами хроматину є ДНК, гістони та негістонові білки, що утворюють високовпорядковані у просторі структури. Співвідношення ДНК і білка в хроматині складає ~ 1:1, а основна маса білка хроматину представлена гістонами. Гістони утворюють родину висококонсервативних лужних білків, які поділяються на п’ять великих класів: H1, H2A, H2B, H3 і H4. Розмір поліпептидних ланцюгів гістонів коливаться в межах ~ 220 (H1) і 102 (H4) амінокислотних залишків. Гістон H1 збагачений залишками лізину, для гістонів H2A і H2B характерний помірний вміст лізину, поліпептидні ланцюги гістонів H3 і H4 багаті на аргінін. За рахунок позитивних зарядів цих амінокислотних залишків гістони нейтралізують негативно заряджені фосфатні групи ДНК, що робить можливою її щільну упаковку в ядрі.

Варто відмітити, що послідовність амінокислот гістонів, тобто їх первинна структура, мало змінилася в процесі еволюції. Це стало очевидним при порівнянні амінокислотної послідовності гістонів тварин, рослин і грибів. Скажімо, гістон H4 людини і пшениці відрізняються лише декількома амінокислотами. До того ж розмір молекули білку та її полярність досить постійні. З цього можна зробити висновок, що гістони були оптимізовані ще в епоху спільного предка тварин, рослин і грибів (більше 700 млн років тому). Хоча відтоді в гістонових генах відбувалися незліченні точкові мутації, усі вони, очевидно, призводили до вимирання організмів-мутантів. Таким чином, гістони розглядаються як найбільш еволюційно консервативні білки. Тим не менш у середині кожного класу гістонів (за винятком H4) на підставі амінокислотних послідовностей розрізняють декілька їх субтипів. Така поліморфність особливо характерна для гістонів

класу H1 ссавців. У цьому випадку розрізняють сім субтипів, названих H1.1-H1.5, H1º і H1t.

Важливим результатом взаємодії ДНК з білками у складі хроматину є її компактизація. Сумарна довжина ДНК, укладеної в ядрі клітин людини, наближається до 1 м, тим часом як середній діаметр ядра становить 10 мкм. Довжина молекули ДНК, укладеної в одній хромосомі людини, в середньому дорівнює ~ 4 см. Тим часом, довжина метафазної хромосоми складає ~ 4 мкм. Отже, ДНК метафазних хромосом людини компактизована за довжиною, принаймні, в ~ 10^4 разів. Ступінь компактизації ДНК в інтерфазних ядрах значно нижчий і нерівномірний в окремих генетичних локусах. З функціональної точки зору розрізняють *еухроматин* і *гетерохроматин*. Еухроматин характеризується меншою порівняно з гетерохроматином компактизацією ДНК і в ньому головним чином локалізуються гени, які активно експресуються.

Наразі досить поширена думка про генетичну інертність гетерохроматину. З рештою, відповідно до цієї точки зору в еукаріот розрізняють три рівні структурної організації хроматину (рис. 14):

1) нуклеосомна фібрила;
2) соленоїд, або нуклеомерна фібрила;
3) петельно-доменна структура, яка включає хромомери.

Першим рівнем компактизації ДНК є нуклеосомна фібрила. Вона складається з трьох компонентів. Першим є *нуклеосома*, яка складається з гістонів чотирьох типів: H2A, H2B, H3 і H4. В одну нуклеосому входять по два білки кожного типу (всього вісім гістонів), утворюючи октамер обвитий сегментом ДНК завдовжки 146 п.н. (другий елемент фібрили), формуючи при цьому 1,8 витка спіралі. Структура, яка складається з гістонового октамера (нуклеосоми) і намотаної на нього ДНК, отримала назву нуклеосомної корової одиниці (рис. 15), діаметр якої становить ~ 11 нм, а товщина ~ 5,5 нм. Останні розташовуються досить регулярно з кроком 10-20 нм. Корові одиниці відокремлені одна від одної сегментами лінкерної ДНК, що є третім компонентом фібрили. Структура, яка утворюється, нагадує намисто. Загальна довжина ділянки ДНК, включеної до одного сегменту нуклеосомної фібрили становить 200±15 п.н., а її діаметр приблизно дорівнює 10 нм.

Другим рівнем компактизації ДНК є формування соленоїдної структури. Соленоїд представляє собою спіраль наступного рівня, один виток якої (*нуклеомер*) складається з шести нуклеосом.

Конденсуючу роль при формуванні соленоїду відіграє гістон Н1, зв'язування молекул якого з лінкерною ДНК, за межами корових одиниць, забезпечує утворення компактних фібрил діаметром 30 нм. Гистон Н1 вельми варіабельний, і навіть в тканинах одного організму зустрічається 3-6 варіантів цього білка. З рештою, вважається, що така структура хроматину (на цьому рівні конденсації) переважає *in vivo*.

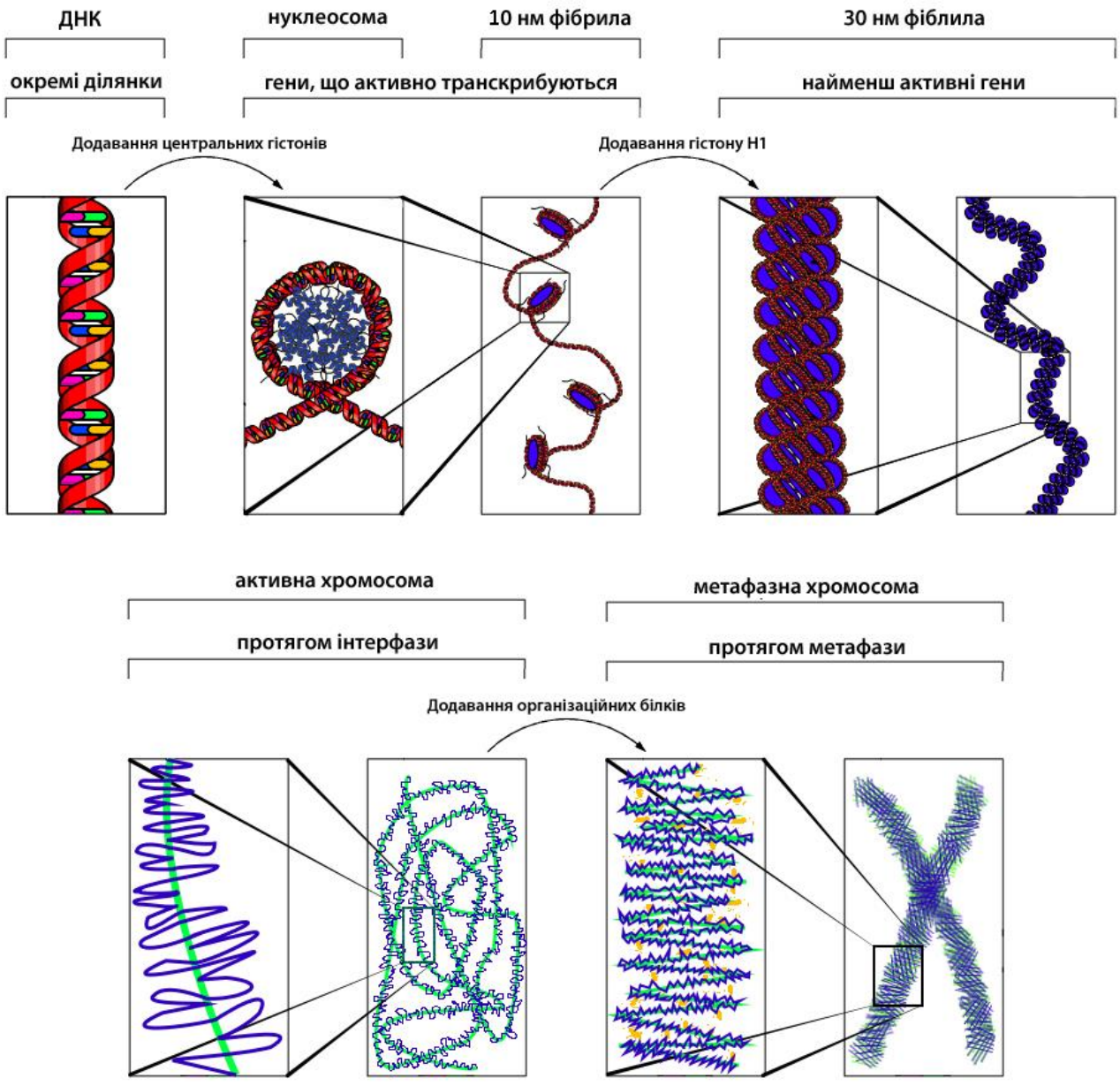


Рис. 14. **Рівні організації ДНК**

В інтерфазних ядрах еукаріот нитки хроматину, в яких ДНК упакована у формі соленоїда, організовані у вигляді топологічно незалежних петель, довжина яких у середньому складає 50-100 т.п.н. Такий спосіб просторової укладки ниток хроматину розглядається як

наступний рівень конденсації хроматину (і ДНК) – *петельно-доменний*, а самі петлі отримали назву *хромомери*.

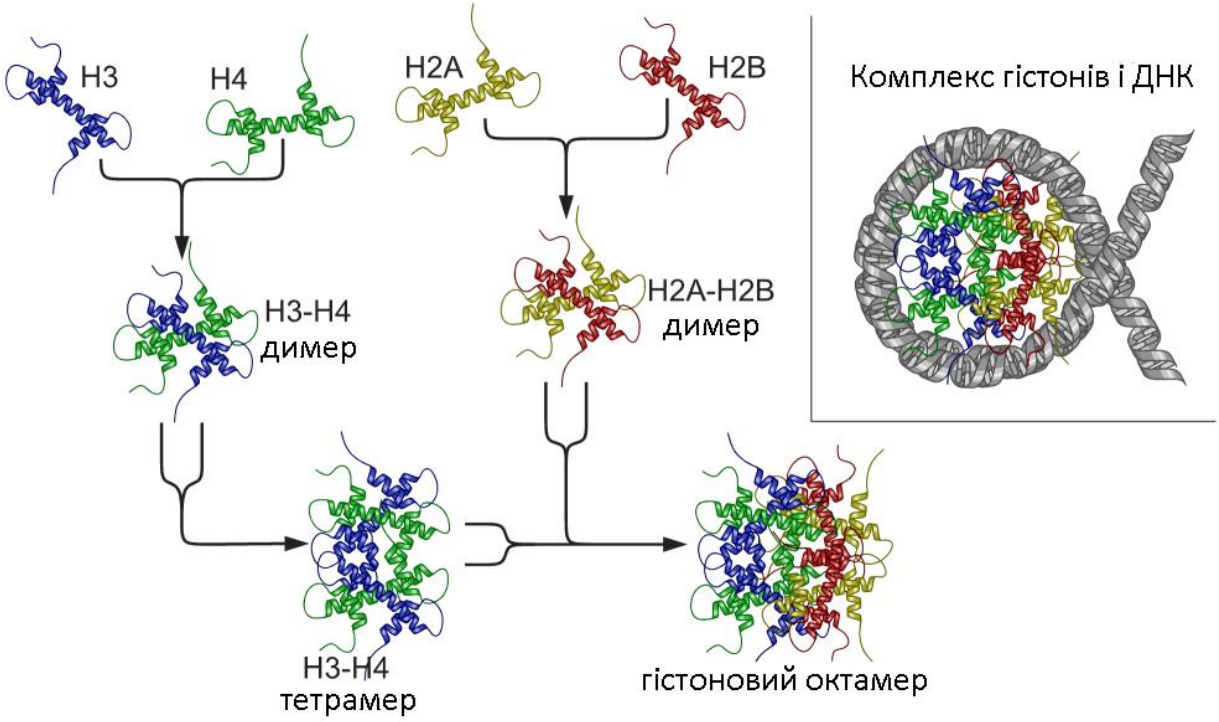


Рис. 15. **Механізм утворення корової одиниці**

За допомогою електронного мікроскопу встановлено, що нитки хроматину в хромомерах мають додаткову специфічну укладку у вигляді розеток, зібраних біля основи, від якого відходять малі петлі довжиною ~ 5 т.п.о. (рис. 16). Утворення хромомерів стає можливим завдяки наявності в їх основах певних послідовностей нуклеотидів, які специфічно взаємодіють з ядерним матриксом, або скефолдом (скелетом). Ядерний скелет всередині інтерфазних ядер має сітчастоподібну структур, яка утворена білками та РНК. Ділянки хромосомної ДНК, що взаємодіють з ядерним матриксом, в літературі відомі під скороченими назвами MAR (*Matrix Associated Region*) або SAR (*Scaffold Associated Region*) і часто позначаються як MAR/SAR-послідовності. Для них характерні наступні особливості:

- як правило, MAR/SAR-послідовності фланкують (межують) гени, однак у ряді випадків їх виявляють і всередині генів, але в складі інтронів;
- довжина MAR/SAR-послідовностей складає 300-1000 п.н.;
- відстань між сусідніми MAR/SAR-послідовностями становить 3-112 т.п.н.;

- всі вони збагачені АТ-парами, в яких зустрічаються ділянки полі(dA), полі(dT);
- ці послідовності можуть бути потенційними сайтами ініціації реплікації та містити в своєму складі велику кількість сайтів для різних факторів транскрипції.

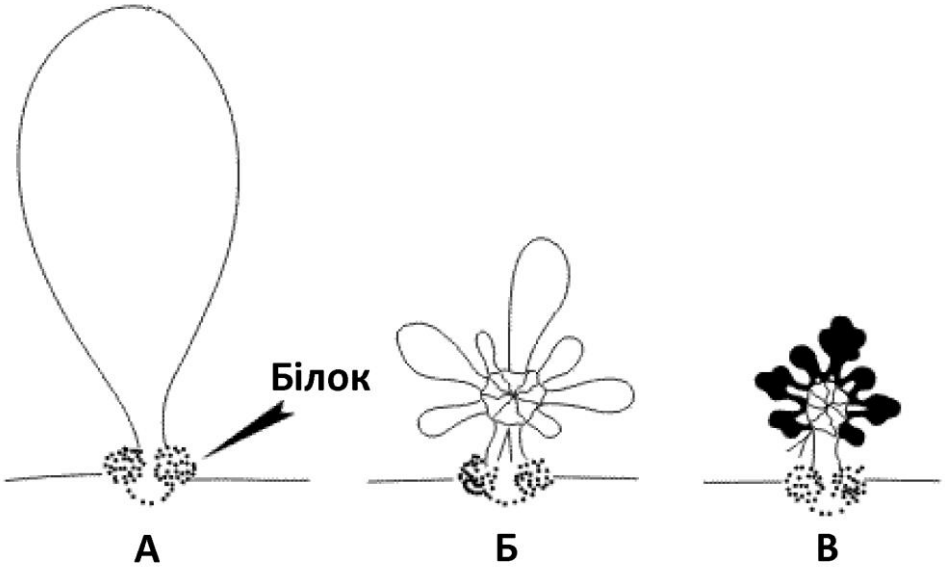


Рис. 16. **Схематичне зображення петельно-доменного типу компактизації ДНК**

А – фіксація петлі хромомера, Б – «розетки» утворені петлями хромомер, В – конденсація петель «розеток».

Сучасна модель структури метафазної хромосоми Craig M. Hart і Ulrich K. Laemmli (1998) підкреслює, що SAR-послідовності, просторово примикаючи один до одного, утворюють вісь хроматиди, від якої в різні боки відходять петлі хроматину, що і формує тіло метафазної хромосоми.

Великий вплив на структуру хроматину і функціонування еукаріотичних генів здійснюють різні негістонові білки. В ядрах у найбільшій кількості виявлено негістонові білки, які відносять до так званої *групи білків з високою рухливістю* (від англ. *High Mobility Group – HMG*). Ця назва відображає їх високу рухливість при електрофорезі. Сумарний вміст *HMG*-білків в ядрах клітин приблизно в 10 разів менше, ніж гістонів. Ці білки поділяють на три основних підкласи: 14/17, 1/2 і I/Y.

Крім *HMG*-білків до негістонових білків хроматину відносяться численні внутрішньоядерні ферменти і білкові фактори, необхідні для роботи генетичного апарату клітини. Серед них особливе місце займають ДНК-топоізомерази, які контролюють в клітинах рівень

суперскрученості ДНК, що може змінюватися в процесі її реплікації, транскрипції, гомологичної рекомбінації, а також під час перебудов хроматину. Всі ці ферменти релаксують суперскрученість молекули ДНК, знімаючи її внутрішнє напруження шляхом внесення одно- або дволанцюгових розривів з подальшим їх відновленням (лігуванням).

Таким чином, на кожному рівні компактизації еукаріотичної ДНК відбувається її вкорочення. Нуклеосомна фібрила стає коротшою в сім разів, соленоїдна структура дає зменшення довжини ще в шість разів. Завдяки цьому і петельно-доменному рівню компактизації 46 молекул ДНК диплоїдного геному людини загальною довжиною близько 2 м, що містять в сумі $6\text{-}10^9$ п.н., можуть поміститися в клітинному ядрі діаметром всього 10 мкм.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. За якими критеріями здійснюється класифікація вірусів?
2. У яких формах здатні існувати віруси?
3. У чому полягає різниця між простими і складними вірусами?
4. З чого починається процес відтворення вірусів?
5. Яким чином можуть поводитися віруси після проникнення в клітину?
6. Чим віроїди і вірусоїди відрізняються від вірусів?
7. Вкажіть основні складові геному вірусів.
8. Які дві групи вірусів розрізняють? В чому їх відмінність?
9. Яким чином може бути організований геном ДНК-вмісних вірусів?
10. Яким чином може бути організований геном РНК-вмісних вірусів?
11. Що таке нуклеоїд? У чому його відмінність від ядра?
12. На які дві групи розподіляють прокаріоти і чому?
13. Що таке «плазміда»? Які властивості вона може надавати клітинам прокаріот?
14. За якими ознаками археї подібні до прокаріот?
15. Які генетичні особливості археї подібні до еукаріотичних?
16. У чому полягають кількісні особливості геному еукаріот?
17. У чому полягає різниця між генотипом і геномом окремої клітини певного організму?
18. Вкажіть різницю між інтронами і екзонами в геномі еукаріот.
19. Які гіпотези пояснюють виникнення інтронів?

20. Що таке «сателітна ДНК»? Якими властивостями вона характеризується?
21. Яка властивість міні- і мікросателітної ДНК використовується для порівняння людей?
22. Які типи диспергованих повторюваних послідовностей ДНК існують?
23. З яких компонентів складається хроматин?
24. Що таке «гістон»? На які класи вони поділяються? У чому полягає їх відмінність?
25. Що розуміють під поняттям «компактизація ДНК»? Від чого залежить її ступінь?
26. Вкажіть рівні структурної організації хроматину в еукаріот.
27. Вкажіть компоненти, з яких складається нуклеосомна фібрила.
28. Яким чином відбувається компактизація ДНК на другому рівні при формуванні соленоїдної структури?
29. У чому полягає особливість укладання ниток хроматину на третьому рівні конденсації хроматину і ДНК?
30. Вкажіть особливості ділянок хромосомної ДНК, що взаємодіють із ядерним матриксом.
31. Вкажіть, які негістонові білки входять до складу хроматину. У чому полягають їх функції?

3. Відтворення генетичної інформації

3.1. Загальні особливості реплікації ДНК

Для того щоб дочірні клітини за своєю структурою і функціями були точною копією батьківських клітин-попередників, вони повинні отримати від батьківських клітин повний набір генетичної інформації у вигляді геномної ДНК, яка організована в хромосомах, і позахромосомних генетичних елементах (плазмідах, мітохондріальній і пластидній ДНК, тощо). У зв'язку з цим перед батьківськими клітинами постає завдання створення точної копії геному та її правильної передачі дочірнім клітинам. Створення такої копії геномної ДНК в батьківських клітинах стає можливим завдяки наявності в них спеціальних ферментних систем, що здійснюють подвоєння молекул ДНК. У результаті реалізації послідовності ферментативних реакцій на матриці батьківських ДНК відбувається біосинтез дочірніх молекул, які є точною копією вихідних молекул. Цей процес подвоєння батьківських молекул геномної ДНК під час відтворення клітин живого організму отримав назву *реплікації*, або *реплікативного синтезу ДНК*.

Реплікація відбувається тільки в певний період життя клітини, а саме під час *S-фази* клітинного циклу (*синтетичний період інтерфази*). S-фаза відділяється від митозу G_1- і G_2-перервами, тобто пре- і постсинтетичними періодами. Усі еукаріотичні клітини мають особливі білки, які контролюють перехід однієї фази клітинного циклу в іншу. До таких білків-регуляторів відносяться *цикліни*. Ці білки активують циклін-залежні протеїнкінази – ферменти, які фосфорилюють субстрати, необхідні для клітинного циклу. Розрізняють Д-цикліни, які сприяють переходу клітини з G_1 в S-фазу; Е- і А-цикліни, які ініціюють реплікацію в ранній S-фазі; В-цикліни сприяють переходженню G_2 в мітоз. Багато онковірусів і онкогенів здатні порушувати перехід клітини з G_1 в S-фазу. Це супроводжується неконтрольованим діленням клітини.

Реплікація ДНК здійснюється за напівконсервативним механізмом. Це означає, що один з ланцюгів дочірніх молекул ДНК є батьківським, а інший є наново синтезованим. Полімеризація нуклеотидів у процесі реплікації відбувається тільки в одному напрямку: від 5'- до 3'-кінця споруджуваного ланцюга, йдучи вздовж

ДНК-матриці у напрямку 3’→5’. У підсумку новий синтезований ланцюг ДНК є антипаралельним по відношенню до ДНК-матриці.

Реплікацію ДНК здійснює складний ферментний (реплікативний) комплекс, що складається з 15-20 різних білків і називається *реплісомою* (англ. *replisome*). Головним ферментом при цьому виступає ДНК-залежні ДНК-полімерази. Вони здійснюють полімеризацію низькомолекулярних попередників ДНК – дезоксирибонуклеозид-трифосфатів (дНТФ, dNTP): дАТФ (dATP), дГТФ (dGTP), дЦТФ (dCTP) і дТТФ (dTTP). За правилами комплементарності положення кожного наступного нуклеотиду споруджуваного ланцюга ДНК однозначно визначається положенням відповідного нуклеотиду матриці.

У відповідності з моделлю F.Jacob і співавторів (1963) *репліконом* називають цілу молекулу ДНК, або її частину, здатну до автономної реплікації. Реплікон містить всі необхідні гени і регуляторні послідовності, які забезпечують регульоване подвоєння його ДНК. Ділянка реплікону, з якої починається реплікація, отримала назву *реплікатора* або *Ori-сайту* (англ. *replication origin*). У більшості прокаріотичних хромосом репліконом є ціла хромосома, яка містить один реплікатор. Винятком є деякі бактерії і археї. У кожній еукаріотичній хромосомі є безліч репліконів.

Як і у випадку біосинтезу інших макромолекул клітини, процес реплікації умовно поділяють на три основних етапи:

1) ініціація – початок синтезу комплементарного ланцюга ДНК;
2) елонгація – ріст комплементарного ланцюга ДНК;
3) термінація – закінчення синтезу комплементарного ланцюга ДНК

3.2. Реплікація ДНК прокаріот

Під час реплікації ДНК її дочірні ланцюги розходяться в місці реплікації, утворюючи Y-подібну структуру, яка називається *реплікативними вилами*. Саме в ділянках біля цього місця розгалуження локалізований функціонуючий реплікативний комплекс. Сучасні уявлення про будову і пересування реплікативних вил прокаріот на прикладі *E. coli* схематично зображено на рис. 17. Відповідно до цієї моделі, ДНК-хеліказа просуваючись вздовж ДНК попереду реплікативного комплексу, розплітає ланцюги батьківської ДНК, при цьому SSB-білки зв’язуються з утвореними одноланцюговими ділянками, полегшуючи процес розплітання.

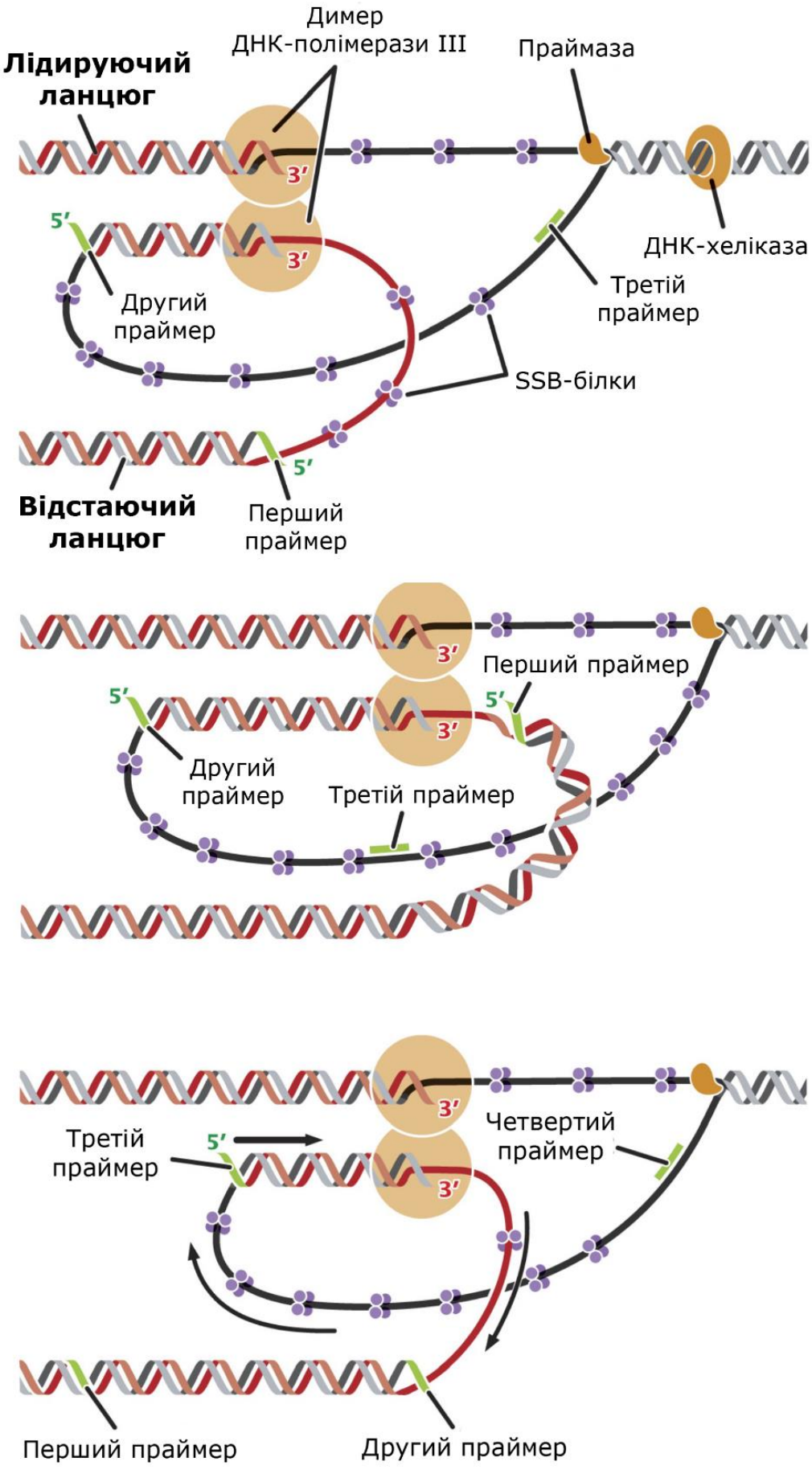


Рис. 17. **Схема реплікативних вил *E. coli***

Враховуючи, що комплементарні ланцюги ДНК протилежно спрямовані (антипаралельні), ДНК-полімераза, яка здатна синтезувати ДНК тільки в одному напрямі – 5’→3’, не може реплікувати молекулу ДНК, просто просуваючись від одного кінця матричного дуплексу до іншого. Для вирішення цього протиріччя реплікативний комплекс використовує витончений механізм. На одному ланцюзі ДНК синтез нового комплементу відбувається безперервно, і ланцюг, що утворюється називається *лідируючим.* Тим часом, синтез іншого ланцюга здійснюється переривчасто у вигляді коротких фрагментів, які отримали назву *фрагментів Оказакі* на честь вченого, який вперше їх відкрив. У такому випадку новий ланцюг ДНК називається *відстаючим*.

Щоб молекули ДНК-полімерази могли почати синтез ДНК, їм потрібні *затравки* (*праймери*) – короткі олігодезоксирибонуклеотиди (ДНК-затравки) або олігорибонуклеотиди (РНК-затравки), які комплементарні відповідним ділянкам ДНК-матриці і у яких на кінці є вільні 3’-ОН-групи. За синтез праймерів лідируючого і відстаючого ланцюгів відповідає фермент *Dna G*.

Основним ферментом, що здійснює полімеризацію нуклеотидів лідируючого і відстаючого ланцюгів є ДНК-залежна ДНК-полімераза ІІІ. У прокаріот цей фермент представлений у вигляді димеру, що з’єднаний τ-білком. У такому димері один ДНК-полімеразний комплекс здійснює безперервний синтез лідируючого ланцюга ДНК, а інший – фрагментів Оказакі відстаючого.

До складу холоферменту (цілісний біологічно активний фермент) ДНК-полімерази ІІІ входять мінімальний фермент (субодиниці α, θ і ε), β-білок і білки γ-комплексу. Роль γ-комплексу полягає в розпізнаванні РНК-затравок на матричній ДНК. γ-комплекс зв’язується з єдиним праймером лідируючого ланцюга ДНК або з кожним з праймерів фрагментів Оказакі – відстаючого. Потім β-білки приєднуються до ДНК позаду білків γ-комплексу, залишаючи 3’-кінець праймера доступним для ДНК-полімерази. Димер β-білка утворює кільце навколо молекули ДНК і стимулює АТРазну активність білків γ-комплексу.

β-Білки і білки γ-комплексу, будучи пов’язаними з дуплексом праймер-матриця, забезпечують приєднання до цього комплексу мінімального ферменту ДНК-полімерази. Потім ДНК-полімераза при наявності доступних чотирьох дНТФ, використовуючи праймер, з високою ефективністю синтезує ланцюг ДНК, комплементарний ДНК-

матриці. Ті ж самі білки беруть участь і в синтезі відстаючого ланцюга ДНК. У цьому випадку переривчастий синтез ДНК багаторазово ініціюється на великій кількості праймерів і новий ланцюг синтезується у вигляді фрагментів Оказакі довжиною ~ 1000 нуклеотидів.

ДНК-полімераза під час ініціації реплікації приєднує перший дНТФ до 3'-кінцевого нуклеотиду РНК-затравки. У процесі елонгації беруть участь β-білок і білки γ-комплексу, які просуваються вздовж молекули ДНК разом з каталітичною субодиницею ДНК-полімерази.

Таким чином, один і той же білковий комплекс здійснює як безперервну полімеризацію лідируючого ланцюга ДНК, так і переривчастий синтез фрагментів Оказакі відстаючого ланцюга. У другому випадку білковий комплекс періодично відокремлюється від матриці для ініціації синтезу наступного фрагменту Оказакі з кожного нового праймера. У результаті одна і та ж молекула ДНК-полімерази III у складі реплікативного комплексу здатна проводити синтез усіх фрагментів Оказакі відстаючого ланцюга, послідовно здійснюючи ініціацію, елонгацію, термінацію і реініціацію синтезу кожного з них.

Після чергової термінації синтезу фрагмента Оказакі, його 3'-кінець виявляється впритул наближеним до 5'-кінця праймера наступного фрагмента Оказакі. Для з'єднання двох фрагментів за допомогою ДНК-лігази необхідне попереднє видалення РНК-праймера і добудова ланцюга ДНК в проломах, які утворюються. РНК-затравка видаляється за допомогою РНКази Н, яка специфічно розщеплює РНК в ДНК-РНК-гібридах, і (або) за участю 5'→3'-екзонуклеази ДНК-полімерази I. У другому випадку одночасно з видаленням праймера відбувається забудова пролому тією ж ДНК-полімеразою I. У результаті два сусідніх фрагменти Оказакі впритул наближаються один до одного і виявляються відокремленими лише одноланцюговим розривом, який зшивається ДНК-лігазою.

Варто відмітити, що при синтезі лідируючого ланцюга реплікативний комплекс функціонує досить ефективно з високою *процесивністю* (середня кількість нуклеотидів, які приєднуються ферментом ДНК-полімеразою за один цикл зв'язування / дисоціації з матрицею). Встановлено, що холофермент ДНК-полімерази III синтезує лідируючий ланцюг ДНК довжиною в 50000 нуклеотидів зі швидкістю > 500 нуклеотидів за секунду в одному циклі, жодного разу не дисоціюючи від ДНК-матриці. Точність реплікації ДНК холоферментом ДНК-полімерази III дуже висока. Частота помилкових

включень нуклеотидів не перевищує 10^{-9}-10^{-10} за один раунд реплікації.

3.3. Особливості реплікації еукаріотичної ДНК

Механізми реплікації ДНК у вищих еукаріот менш вивчені через їх більшу складність. Як вище зазначалось, еукаріотичні хромосоми містять багато сайтів початку реплікації і в одній клітині їх може нараховуватись до 100000. ДНК мітохондрій містить два сайти початку реплікації.

Окрім того, ДНК-хеліказа еукаріот представлена складним CMG-комплексом. До нього входять шість білків *Mcm*2-7, які формують гексамерні кільця навколо кожного розплетеного ланцюга ДНК. Утворення цих білків відбувається лише на стадії G1 клітинного циклу, після чого під час S-періоду до них приєднуються *Cdc*45-білки і *GINS* комплекс, в наслідок чого формується активний *Cdc*45-*MCM*-*GINS*-комплекс, або *CMG*-геліказа.

Також, встановлено, що в ядерних клітинах синтез лідируючого і відстаючого ланцюгів здійснюють різні ДНК-полімерази. У цілому в еукаріот виявлено чимало ДНК-полімераз. П’ять з них безпосередньо беруть участь у реплікації, а саме ДНК- полімерази α (альфа), δ (дельта), ε (епсілон), γ (гама) і теломераза.

ДНК-полімераза α, яка складається з двох α-субодиниць, утворює достатньо стійкий і постійний комплекс з субодиницями *PriS* і *PriL*. Останні діють як праймаза, синтезуюючи короткі РНК-праймери на обох ланцюгах ДНК. Потім ДНК-полімераза α ініціює реплікацію, подовжуючи праймери приблизно на 20 дНМФ. Далі комплекс від’єднується, а естафету приймають ДНК-полімерази δ і ε.

ДНК-полімераза δ – високопроцесивний фермент, який володіє 3’→5’ екзонуклеазною активністю і здійснює синтез відстаючого ланцюга. Мінімальний фермент складається з чотирьох субодиниць: delta 1 (каталітична субодиниця), *delta* 2, *delta* 3 і *delta* 4 (p12). Полімераза δ розпізнає 3’-кінець подовжених полімеразою α праймерів, приєднується до них і здійснює циклічні реініціації та синтез фрагментів Оказакі. Дозрівання фрагментів Оказакі в еукаріот вимагає видалення РНК-затравок за допомогою білкового фактора *FEN*-1 та РНКази Н1, а також ковалентного з’єднання фрагментів один з одним під дією ДНК-лігази І.

ДНК-полімераза *ε* – високопроцесивний фермент, який володіє 3’→5’ екзонуклеазною активністю і здійснює синтез лідируючого ланцюга. Мінімальний фермент складається з субодиниць epsilon (каталітична субодиниця А), *epsilon* 2 і *epsilon* 3. Також припускається, що ДНК-полімераза *ε* бере участь у регуляції клітинного циклу, а саме при переході метафази в анафазу.

Для формування холоферментів ДНК-полімераз *δ* і *ε* необхідні ще два компоненти: білок *PCNA* і фактор реплікації С (*RFC*). Вони є функціональними аналогами прокаріотичних *β*-білка і білків *γ*-комплексу.

ДНК-полімераза *γ*, яка кодується ядерними генами, є єдиною еукаріотичною ДНК-полімеразою, що бере участь у реплікації мітохондріальної ДНК (мтДНК). Очищена велика субодиниця полімерази γ володіє не тільки ДНК-полімеразною, а й корегувальною екзонуклеазною активністю у напрямі 3’→5’. Остання функція є вкрай важливою оскільки мтДНК постійно міститься в окислювальному середовищі матриксу мітохондрій. Через це швидкість нуклеотидних замін у мтДНК в 10 разів вища, ніж в ядерній. Підтримка цілісності мтДНК залежить від ефективності всіх систем репарації (відновлення), обов’язковим учасником яких є ДНК-полімераза *γ*.

Решта ДНК-полімераз еукаріот, як правило, залучені до репарації ДНК.

Особливої уваги заслуговує фермент *теломераза*. Це рибонуклеопротеїн, який додає особливі послідовності ДНК (TTAGGG у хребетних і TTGGGG у безхребетних) на 3’-кінці лінійної хромосоми еукаріот, оскільки жодна ДНК-полімераза не здатна їх реплікувати. Такі послідовності називаються *теломерами* (рис. 18).

Теломераза є зворотною транскриптазою (фермент, що здійснює синтез ланцюга ДНК на РНК-матриці), до її складу входить особлива молекула РНК, яка використовується в якості матриці для зворотної транскрипції під час подовження теломер. Як тільки теломераза своєю внутрішньою РНК приєдналась до 3’-кінця одноланцюгового фрагменту хромосоми, який слугує затравкою, починається подовження останнього до кінця матриці РНК. Потім відбувається транслокація (переміщення) ферменту на один теломерний повтор вперед вздовж матриці ДНК. Після чого теломераза здійснює черговий цикл подовження вже нової 3’-кінцевої послідовності хромосоми, по завершенню дії теломерази другий ланцюг ДНК добудовується звичайним способом.

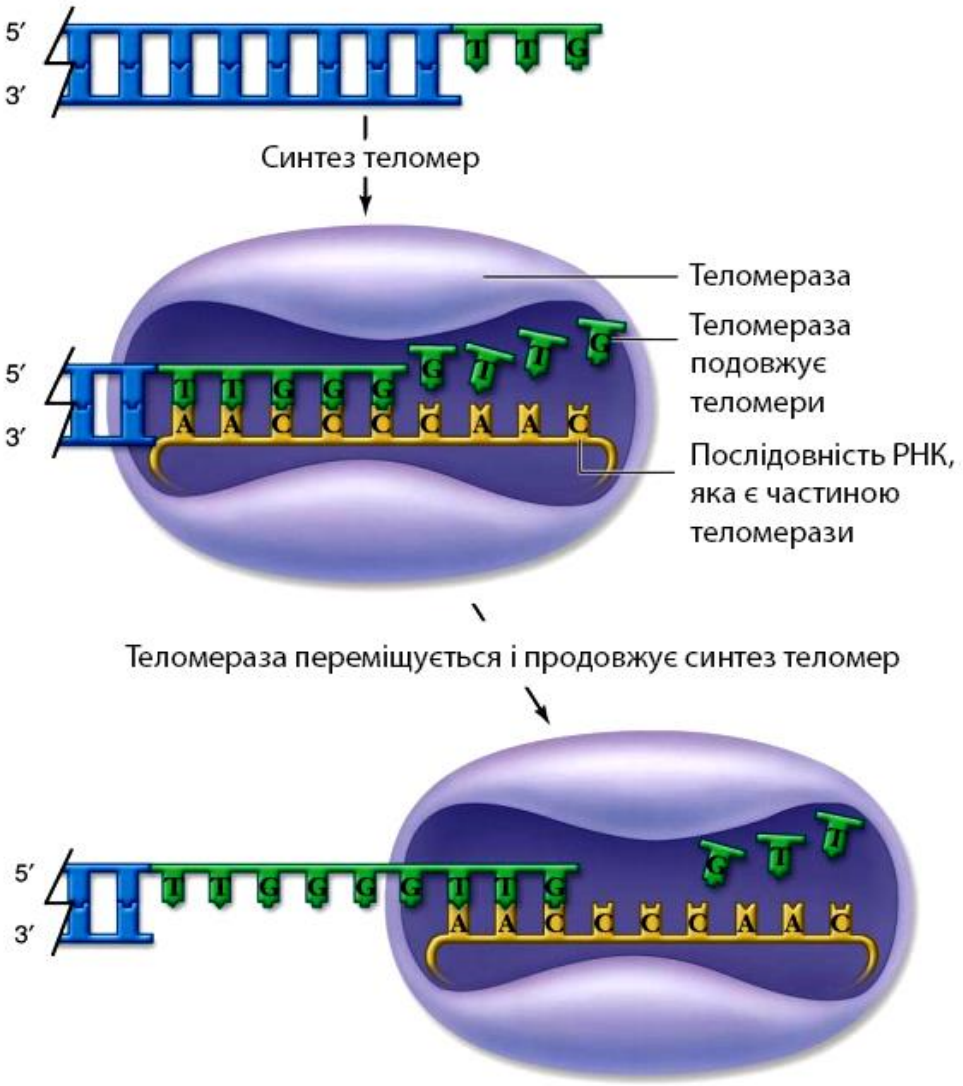


Рис. 18. **Принцип функціонування теломерази**

3.4. Особливості реплікативного комплексу архей

Реплікативний апарат архей більш схожий з аналогічним апаратом еукаріот. Зокрема, ДНК-полімерази нагадують еукаріотичні ферменти α, γ і ε та володіють 3’→5’ екзонуклеазною активністю. У домені археї виділяють декілька типів, зокрема: кренархеї (*Crenarchaeota*) і еуріархеї (*Euryarchaeota*).

Представники типу кренархеї мають щонайменше дві різні ДНК-полімерази *PolBI* і *PolBII*. Тип еуріархеї для реплікації використовує також дві ДНК-полімерази: *PolB*, яка довгий час вважалася їх єдиною ДНК-полімеразою, і *PolD*, яка високогомологічна у різних еуріархеїв, але не має гомологів серед інших організмів і виділена в окреме сімейство. Особливістю полімерази *PolD* є те, що вона містить

гомологічні ділянки і з ДНК-полімеразою *δ* еукаріот, і з ДНК-полімеразою III прокаріот.

Усі ДНК-полімерази археїв для високої процесивності потребують наявності сковзаючого зажиму, який схожий на еукаріотичний білок *PCNA*. Приєднання цього білка здійснює комплекс *RFC*, аналогічний еукаріотичному, але він складається не з п'яти, а з двох різних субодиниць.

3.5. Способи реплікації різних геномів

Враховуючи те, що ДНК може бути як лінійною, так і замкненою (кільцевою), а також може містити один, два та безліч *Ori*-сайтів розглядають чотири основних способи реплікації:

1) за типом вічка або *θ*-тип реплікації;
2) за типом кільця, що котиться, або *σ*-тип реплікації;
3) за типом утворення *D*-петлі;
4) за типом множинних вічок.

Перші три способи реплікації притаманні кільцевим молекулам ДНК (нуклеоїдам, плазмідам), а четвертий – лінійним хромосомам. *σ*-, і *θ*-типи характеризуються одним сайтом ініціації реплікації, реплікація з утворенням *D*-петлі – двома, а за типом множинних вічок – багатьма реплікаторами.

У разі *θ-типу реплікації* кільцевої молекули ДНК спочатку утворюється «здуття» на єдиному реплікаторі, яке розширюється в двох напрямках вздовж реплікону. Реплікація в цьому випадку відбувається у двох напрямках, тобто існують двоє реплікаційних вил. Після завершення реплікації з'являються дві дволанцюгові молекули, які спочатку пов'язані одна з одною як кільця одного ланцюга. При їх роз'єднанні одне з двох кілець тимчасово розривається (рис. 19).

Оскільки кільцеві молекули ДНК закручені самі на себе (суперспіралізовані), при розкручуванні подвійної спіралі в процесі реплікації вони повинні безперервно обертатися навколо власної осі. При цьому виникає торсійна напруга, яка усувається шляхом розриву одного з ланцюгів. Потім обидва кінці відразу ж з'єднуються один з одним. Цю функцію виконують ДНК-топоізомерази.

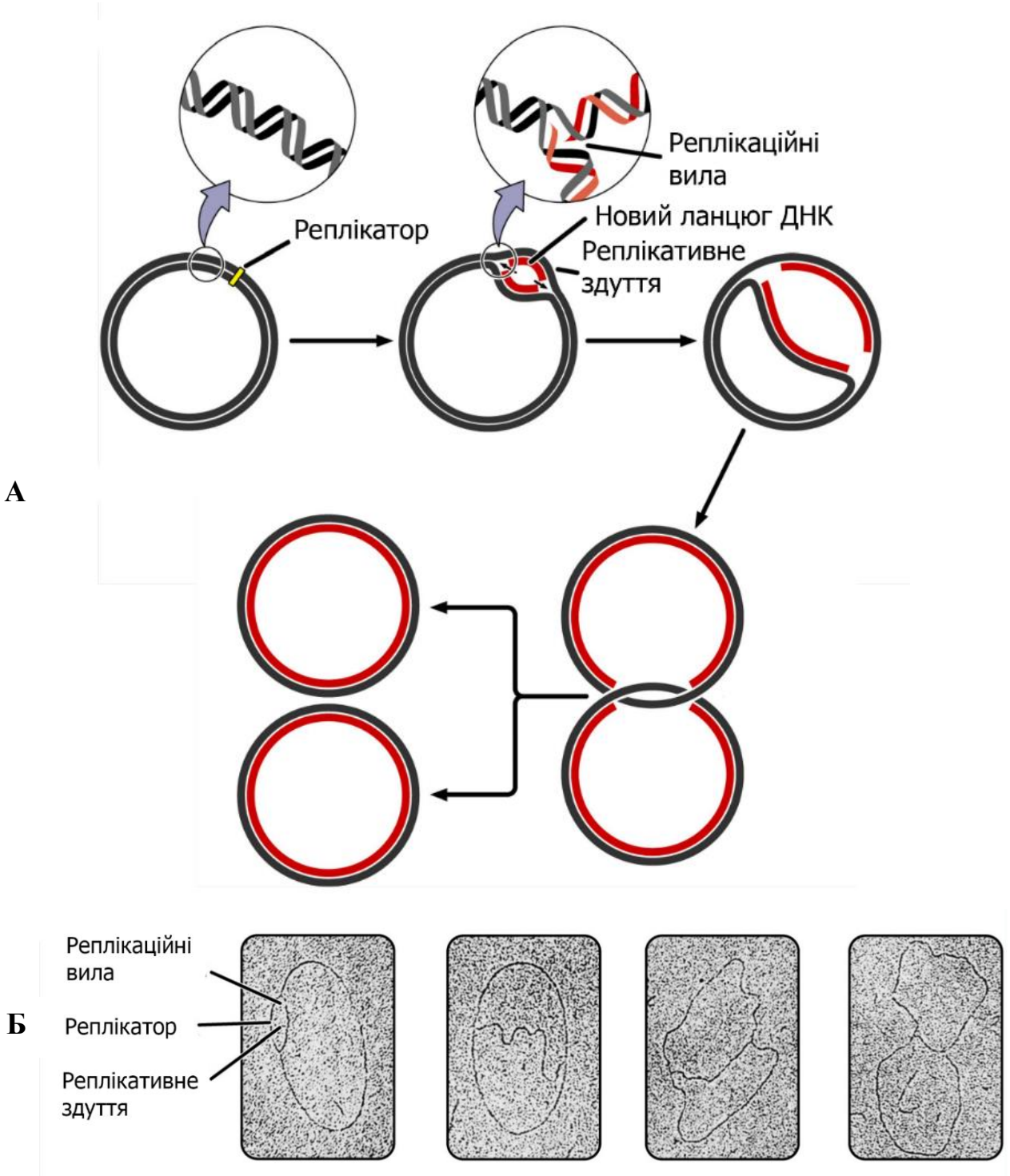


Рис. 19. **Принципова схема (А) і фотознімки (Б) перебігу *θ*-типу реплікації**

Альтернативний варіант реплікації кільцевого реплікону (*σ-тип реплікації*) передбачає розрив в одному з ланцюгів двоспіральної молекули ДНК. При цьому вільний 3’-кінець, що утворився, ковалентно нарощується, залишаючись пов’язаним з матрицею (другим цілим ланцюгом), а 5’-кінець поступово витісняється новим полінуклеотидним ланцюгом (рис. 20). Таким чином, один ланцюг

розмотується і безперервно подовжується, а реплікаційні вила ковзають навколо кільцевого матричного ланцюга (механізм «кільця, що котиться»). По мірі зростання нового ланцюга його витіснений 5’-кінець стає лінійною матрицею для синтезу нового комплементарного ланцюга. Цей синтез на лінійній матриці продовжується до тих пір, поки не утвориться дочірній ланцюг ДНК, комплементарний одному обороту кільцевої матриці, тобто цілому реплікоу. Таким чином, з кільцевої матриці може формуватись велика кількість комплементарних копій. Такий механізм виявлений у деяких вірусів, при статевій гібридизації бактерій, а також у деяких клітин еукаріот.

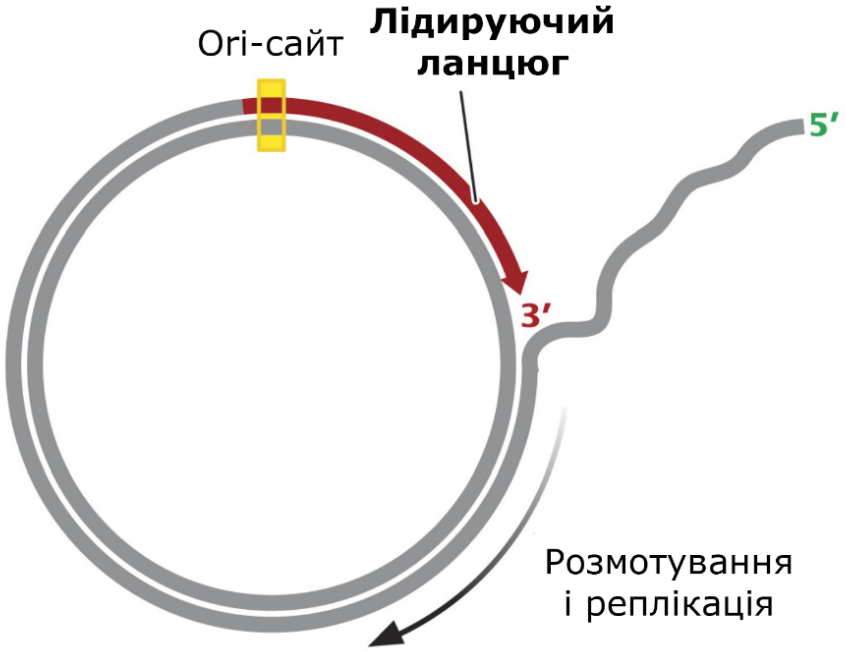


Рис. 20. **Принципова схема *σ*-типу реплікації**

Ще одна схема реплікації передбачає формування структури, яку називають *D-петлею*. Відповідно до цього механізму, спочатку реплікується тільки один з ланцюгів кільцевого реплікону, тим часом другий, залишаючись інтактним, витісняється, утворюючи петлю. Реплікація ж другого ланцюга починається з іншої стартової точки і тільки після того, як реплікується частина першого ланцюга (рис. 21). Такий механізм реплікації виявлений, наприклад, у мітохондріальних і пластидних ДНК.

Хромосоми деяких вірусів і усіх еукаріотичних організмів містять лінійні молекули ДНК. Реплікація лінійних молекул починається в певних точках (реплікаторах) з утворення реплікаційного вічка (здуття).

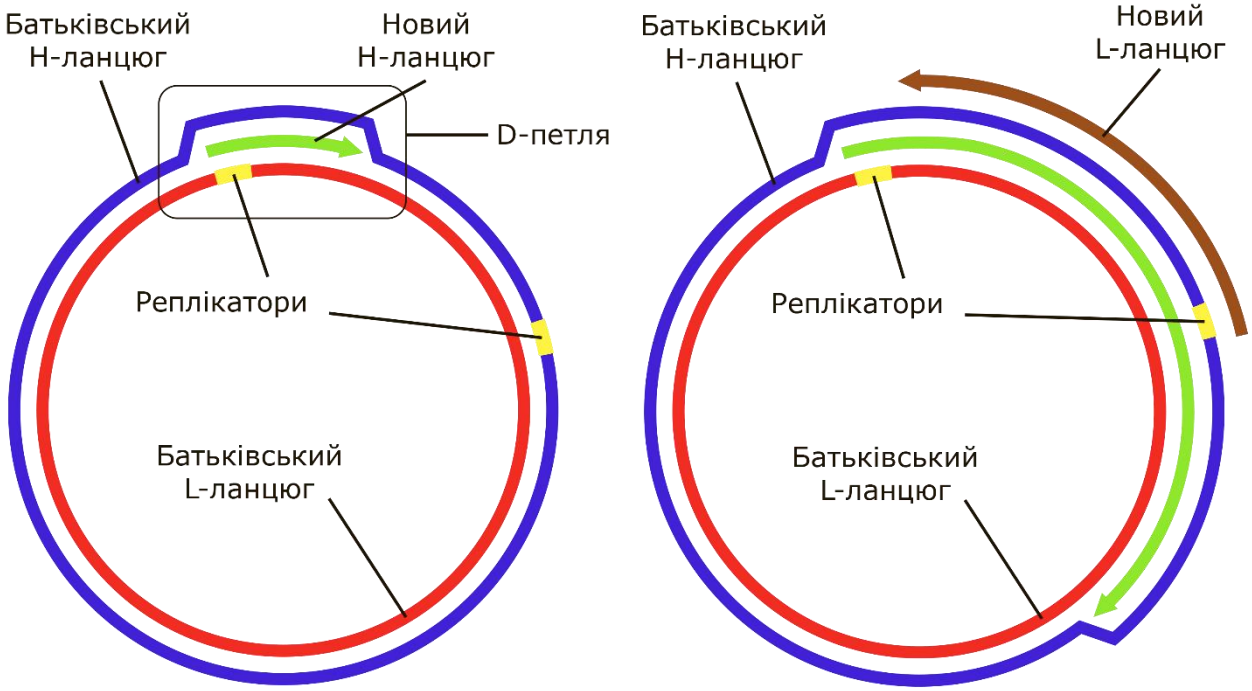


Рис. 21. **Схема реплікації з утворенням *D*-петлі**

У невеликих молекулах ДНК вірусів реплікація може починатися з однієї точки. У великих молекулах ДНК, які утворюють хромосоми еукаріот, іноді налічуються сотні точок ініціації реплікації (рис. 22).Після утворення здуття воно починає збільшуватися по мірі просування процесу реплікації ДНК в обох напрямах від точки ініціації. Під час цього процесу сусідні здуття можуть зливатися, а коли здуття досягає кінця молекули, утворюється характерна проміжна *Y-подібна конфігурація*. Коли реплікація закінчується, з однієї лінійної батьківської молекули утворюються дві лінійні дочірні, кожна з яких, так само як і батьківська, є подвійною спіраллю.

У підсумку відбувається респіралізація полінуклеотидних ланцюгів і ДНК компактизується. Таким чином, відбувається утворення дочірніх молекул ДНК. Потім ділиться ядро, розподіляється цитоплазма з іншими клітинними структурами. Закінчується процес утворенням двох дочірніх клітин, ядра яких отримали абсолютно ідентичну ДНК. Тобто уся генетична інформація, що зберігається в ДНК материнських клітин, передається до ДНК дочірніх клітин. У цьому і полягає передача і збереження спадкових ознак.

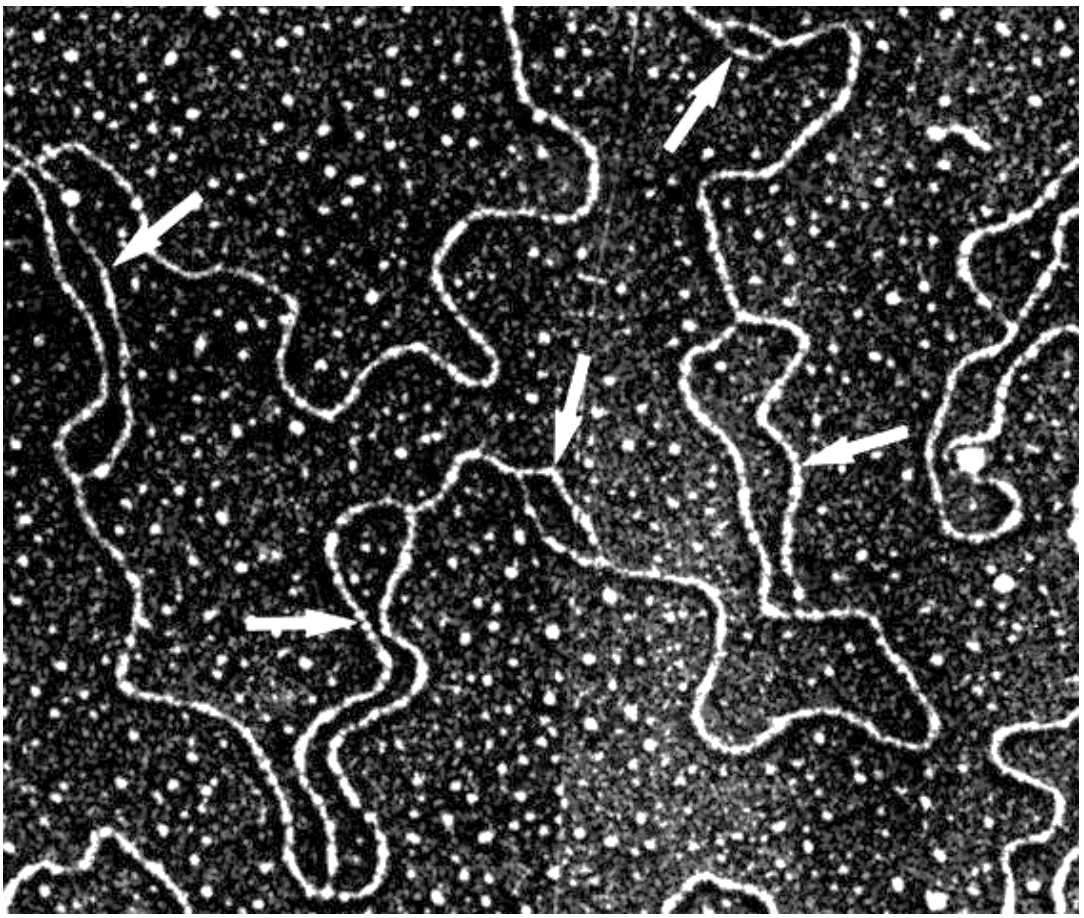


Рис. 22. **Численні реплікативні здуття на еукаріотичній хромосомі**

Таким чином, процес реплікації ДНК грає ключову роль у передачі спадкової інформації, записаної у послідовності пар основ від батьківської молекули ДНК – дочірнім молекулам ДНК, від батьківських соматичних клітин – дочірнім соматичним клітинам і, нарешті, від батьківських організмів – нащадкам.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. У чому полягає процес реплікації ДНК?
2. Вкажіть білки, які беруть участь у процесах реплікації.
3. У чому суть напівконсервативного механізму реплікації ДНК?
4. Що таке «реплікон»?
5. З яких етапів складається процес реплікації?
6. Яку роль у процесі реплікації грає реплікативні вила?
7. Які функції виконують праймери в процесі реплікації?
8. У чому полягає різниця між лідируючим і відстаючим ланцюгами?
9. З’ясуйте роль ДНК-полімерази ІІІ у процесі реплікації.

10. Вкажіть за яким механізмом та за допомогою яких ферментів відбувається формування відстаючого ланцюга ДНК з фрагментів Оказакі.
11. Вкажіть які ДНК-полімерази беруть участь у реплікації еукаріотичної ДНК.
12. У чому полягає роль ферменту теломераза?
13. У чому полягають особливості реплікації архей?
14. У чому полягають особливості *σ*-типу реплікації?
15. У чому полягають особливості *θ*-типу реплікації?
16. У чому полягають особливості реплікації за типом утворення *D*-петлі?
17. У чому полягають особливості реплікації за типом множинних вічок?

4. Транскрипція та її регуляція

4.1. Реалізація генетичної інформації

Вся генетична інформація живого організму закодована у послідовності нуклеотидів нуклеїнових кислот. Як і будь-яка інша інформація, вона містить у собі певний сенс, зміст якого в даному випадку здатні сприйняти конкретні молекулярні об'єкти. Сама можливість сприйняття генетичної інформації визначається тим, що повідомлення організовані за допомогою системи правил (генетичного коду), зрозумілі тим об'єктам, для яких ці повідомлення призначені. Отримавши генетичне повідомлення, молекулярний об'єкт його декодує відповідно до правил, що лежать в основі функціонування його складових частин. Навіть часткове невиконання цих правил може призводити до тяжких порушень життєдіяльності організму.

Під час передачі генетичної інформації від генів до молекулярних об'єктів, яким вона адресована по існуючих каналах зв'язку, має місце її багаторазове декодування і перекодування аж до остаточного втілення у фенотипових ознаках. Тобто відбувається *експресія генів*. Спрощуючи наведене визначення можна тлумачити експресію генів як процес реалізації генетичної інформації. Для повноти розуміння цього явища необхідно знати що таке ген. Отже, *ген* – це найменша структурно-функціональна одиниця спадкового матеріалу, яка відповідає за формування певної елементарної ознаки.

Кінцевим результатом експресії генів має бути утворення повноцінних у функціональному відношенні макромолекул білків або нуклеїнових кислот, які формуватимуть певний фенотип організму. Природу інформаційного зв'язку між ДНК і білками вдалося зрозуміти, проводячи генетичні та біохімічні дослідження мутацій в генах і зіставляючи їх зі специфічними змінами в амінокислотній послідовності відповідного білка. Завдяки цим дослідженням було встановлено також колінеарність послідовностей нуклеотидів в ДНК і амінокислот в білках.

У відповідності з *головною догмою молекулярної біології* генетична інформація в процесі її реалізації передається однонаправлено від нуклеїнових кислот до білків. При цьому реалізується узагальнена схема, яка наведена на рис. 23.

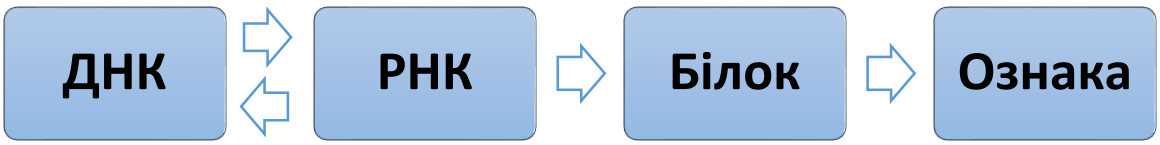


Рис. 23. **Головна догма молекулярної біології**

Ця схема підкреслює, що в ряді спеціальних випадків можлива передача генетичної інформації від РНК до ДНК з використанням механізму зворотної транскрипції. До цього часу не виявлена передача інформації від білків до нуклеїнових кислот.

Розглянемо головну догму у загальних рисах. На першому етапі експресії генів відбувається переписування генетичної інформації, закодованої в генах, на матричні (інформаційні) РНК (м(і)РНК), які є місцем проміжного зберігання цієї інформації при її реалізації. У деяких випадках вже самі РНК є кінцевим результатом експресії генів, і після низки ферментативних модифікацій вони безпосередньо використовуються в клітинних процесах. Це стосується, перш за все, рибосомних і транспортних РНК (рРНК і тРНК), які разом складають основну частину сумарної РНК клітини. Окрім того, до таких РНК належать і малі ядерні РНК (мяРНК), які приймають участь у процесингу попередників мРНК еукаріот, а також РНК, які входять до складу ферментів, і природні антисенсові РНК. В цілому синтез РНК відбувається в результаті складної послідовності біохімічних реакцій, яка називається *транскрипція*. На другому етапі реалізації генетичної інформації – *трансляції* – послідовність нуклеотидів мРНК відповідно до генетичного коду однозначно визначає послідовність амінокислотних залишків синтезованих білків.

Таким чином, експресію генів визначають два глобальних молекулярно-генетичних механізми: транскрипція генів і трансляція мРНК, яка завершується утворенням поліпептидних ланцюгів, закодованих генами. Однак процес експресії генів не обмежується їх транскрипцією і трансляцією. Істотними моментами є посттранскрипційна і посттрансляційна модифікації відповідно мРНК і білків. Посттранскрипційні модифікації попередників мРНК забезпечують її підготовку до ефективної трансляції рибосомами і визначають тривалість її існування в цитоплазмі. Посттрансляційні модифікації білків також необхідні для їх повноцінного функціонування.

У нормі експресія генів забезпечує існування організму як цілого від початкових до завершальних стадій індивідуального розвитку – від перших поділів стимульованої яйцеклітини до природної смерті організму. Однак більш широкий підхід до проблеми експресії генів повинен враховувати не тільки біохімічні наслідки їх роботи на молекулярному, надмолекулярному і організмовому рівні, а й генетично детерміновані поведінкові реакції груп особин у популяції, а отже, і механізми генетичного контролю розвитку самих популяцій, включаючи цивілізацію.

4.2. Загальні особливості транскрипції

У процесі транскрипції генів відбувається біосинтез молекул РНК, комплементарних одному з ланцюгів матричної ДНК, супроводжуваний полімеризацією чотирьох рибонуклеозид-трифосфатів (ATP, GTP, CTP і UTP) з утворенням 3’-5’-фосфодиефірних зв’язків та звільненням неорганічного пірофосфату. Основними ферментами, які здійснюють транскрипцію, є *ДНК-залежні РНК-полімерази*, які функціонують за участю численних *факторів транскрипції* – регуляторних білків, що здійснюють високоспецифічні білок-білкові і білково-нуклеїнові взаємодії. Такі взаємодії необхідні для правильного розпізнавання транскрипційним комплексом регуляторних послідовностей у складі генів, а також вони призводять до підвищення або зниження рівня транскрипції відповідних послідовностей як відповідь клітин на зовнішні або внутрішні регуляторні сигнали. Завдяки факторам транскрипції і регуляторним послідовностям генів стає можливим специфічний синтез РНК і здійснюється регуляція експресії генів на рівні транскрипції.

Синтез РНК молекулами РНК-полімерази *in vivo* починається в певних місцях ДНК, які називаються *промоторами*, і завершується на особливих регуляторних послідовностях – *термінаторах*. Відрізки ДНК, розташовані між промоторами і термінаторами, називають *транскрипційними одиницями*, або *транскриптонами*. У межах кожного транскриптона транскрибується тільки один ланцюг ДНК, який отримав назву «*сенсового*», «*кодуючого*» або «*матричного*». Його напрямком є 3’→5’, тим часом комплементарний («*асенсовий*», «*некодуючий*» або «*захисний*») ланцюг враховуючи антипаралельність, має 5’→3’ напрямок. Термін «транскриптон» за змістом близький

терміну «ген», але вони не є тотожніми. Так, транскрипційні одиниці прокаріотів, як правило, містять в собі генетичну інформацію декількох структурних генів і називаються *оперонами*. Тим часом, в еукаріот у межах транскриптонів розташовується один структурний ген і транскрипційна одиниця називається *цистрон*. Продуктами транскрипції оперонів є поліцистронна мРНК, в результаті трансляції якої утворюється декілька білків. Білки, які кодуються поліцистронними мРНК, зазвичай функціонально пов'язані один з одним і забезпечують протікання певного метаболічного процесу, наприклад біосинтезу однієї амінокислоти або утилізацію вуглеводів у якості джерела вуглецю. Організація генів у вигляді оперонів полегшує координовану регуляцію їх експресії лише на рівні транскрипції. Узгоджена регуляція транскрипції (і інших етапів експресії) багатьох генів, що не утворюють одного оперона, найчастіше здійснюється специфічними білками-регуляторами, які взаємодіють з гомологічними регуляторними послідовностями, які маркерують гени даної групи.

Таким чином, у порівняні з реплікацією, транскрипція має як схожі, так і відмінні особливості, зокрема:

Подібність:

1) обидва процеси починаються з деспіралізації ДНК;
2) після деспіралізації розриваються водневі зв'язки між азотистими основами обох ланцюгів ДНК і утворюється реплікативне або транскрипційне «здуття»;
3) полімеризація нового ланцюгу на матричному відбувається у напрямку 5'→3';
4) під час синтезу нового ланцюга відбувається утворення фосфодиефірних зв'язків між нуклеотидами за рахунок розриву макроергічних зв'язків їх попередників, що супроводжується утворенням пірофосфатів.

Відмінність:

1) транскрипція зберігає консервативність ДНК, оскільки синтезована на ній РНК у подальшому від'єднується; тим часом реплікація – напівконсервативна, тобто обидва ланцюги початкового дуплексу ДНК розподіляються між двома дочірніми спіралями;
2) під час реплікації деспіралізація ДНК відбувається по всій довжині, а при транскрипції – тільки на певній її ділянці – транскриптоні;

3) під час реплікації використовуються дНТФ, а під час транскрипції – НТФ;
4) основним ферментом реплікації є ДНК-полімераза різних модифікацій, а трансляція каталізується РНК-полімеразами;
5) реплікація здійснюється лише за наявності затравки, а початок синтезу РНК йде *de novo* (першопочатково), без необхідності синтезу праймера;
6) продукти трансляції додатково піддаються ко- і посттранскрипційним модифікаціям.

Процес транскрипції в даний час прийнято поділяти на 4 основні стадії: 1) *зв'язування РНК-полімерази* з ДНК і розпізнавання промотора (*преініціація*), 2) *ініціація*, 3) *елонгація*; 4) *термінація*. Після зв'язування РНК-полімерази з ДНК фермент починає пошук промоторів, на яких відбувається формування транскрипційних комплексів. Стадія ініціації транскрипції завершується утворенням декількох перших фосфодиефірних зв'язків молекули РНК, яка синтезується, після чого транскрипція переходить у стадію елонгації – послідовного подовження синтезованих молекул РНК. Стадія елонгації закінчується по досягненні молекулами РНК-полімерази спеціальних регуляторних послідовностей ДНК, які називаються термінаторами транскрипції, після чого відбувається звільнення синтезованих молекул РНК і РНК-полімерази з транскрипційних комплексів. Вивільнені молекули РНК-полімераз набувають здатності вступати в новий цикл транскрипції (рис. 24).

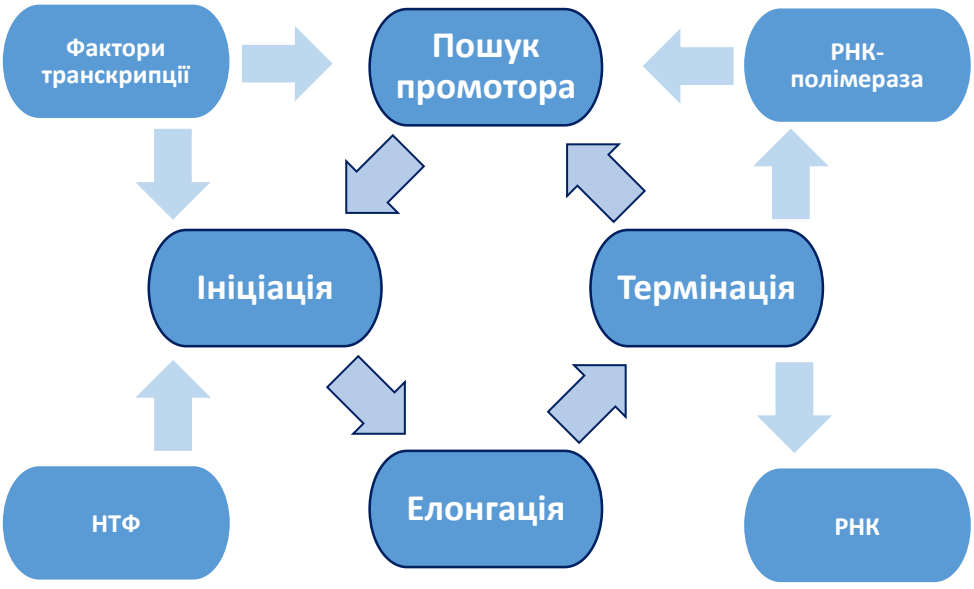


Рис. 24. **Цикл транскрипції**

Слід пам’ятати, що чіткий поділ єдиного процесу транскрипції на окремі стадії умовний; він використовується головним чином для зручності опису механізмів біосинтезу РНК і є спрощеною моделлю.

4.3. ДНК-залежні РНК-полімерази

Враховуючи субодиничний склад РНК-полімерази поділяються на дві групи. До першої групи належать ферменти, які складаються тільки з однієї субодиниці, серед них – РНК-полімерази ряду бактеріофагів (наприклад, Т3, Т7 або SP6), а також РНК-полімерази мітохондрій і хлоропластів, що кодуються ядерною ДНК деяких еукаріотів. Ці РНК-полімерази транскрибують невелике число генів простих геномів, і для їх функціонування не потрібно складних регуляторних чинників. До другої групи відносяться складно побудовані РНК-полімерази, які представляють собою полісубодиничні білкові комплекси, що здатні транскрибувати сотні і тисячі різних генів. До цієї групи відносяться РНК-полімерази хлоропластів, які кодовані ДНК цих органел, РНК-полімерази еубактерій, архей та еукаріотів, а також РНК-полімерази деяких эукаріотичних вірусів (*ASFV*, *CIV*, вірус вісповакцини). Такі ферменти під час свого функціонування реагують на численні регуляторні сигнали, які надходять від регуляторних послідовностей нуклеотидів і білкових факторів.

РНК-полімераза бактерій. Найбільш вивченою з бактеріальних ферментів є РНК-полімераза *E. coli*. Вона здійснює транскрипцію всіх бактеріальних генів. Основний (мінімальний або кор-) фермент масою ~ 390 кДа складається з п’яти субодиниць ($\alpha_2\beta\beta'\omega$):

- 2 α-субодиниці (по 36 кДа) зв’язують решту елементів ферменту і розпізнають регулюючі чинники. Кожна субодиниця складається з двох доменів: αСКД (С-кінцевий домен) зв’язує перший елемент промотора, і αNКД (N-кінцевий домен) зв’язується з рештою компонентів полімерази;
- β-субодиниця (151 кДа): містить два каталітичних центри, один здійснює ініціацію синтезу РНК, а інший відповідає за елонгацією процесу, при чому перший функціонує тільки в повному ферменті, а другий – і в повному, і в мінімальному;
- β'-субодиниця (155 кДа): відповідає за неспецифічне зв’язування з ДНК, за рахунок кластеру позитивно заряджених амінокислот;
- ω-субодиниця (11 кДа): полегшує збирання РНК-полімерази і стабілізує її.

Комплекс з п’яти субодиниць ($\alpha_2\beta\beta'\omega$), який часто позначається літерою *E* (англ. *Enzyme* – фермент), здатний здійснювати всі основні етапи транскрипції, за винятком правильної ініціації. Для останньої потрібна присутність певної регуляторної *σ*-субодиниці, яка в комплексі з мінімальним ферментом формує холофермент. Вважають, що функцією *σ*-субодиниці є розпізнавання певної ділянки (промотора) на матриці ДНК, до якої приєднується РНК-полімераза. У результаті утворюється так званий відкритий комплекс ферменту з ДНК: дволанцюгова структура ДНК розкривається («плавиться»). Кожний комплекс РНК-полімерази містить тільки одну *σ*-субодиницю. Залежно від виду бактерій *σ*-факторів може бути декілька різновидів. Так, модельна бактерія *E.coli* має як мінімум вісім *σ*-факторів, об’єднання яких з кор-ферментом дає можливість холоферменту розпізнавати різні промотори. Всі *σ*-фактори позначаються відповідно до їхньої молекулярної маси, наприклад, σ^{70} означає *σ*-фактор з молекулярною вагою 70 кДа. Тоді повний фермент позначатиметься $E\sigma^{70}$.

Молекули РНК-полімерази не вільно містяться в цитоплазмі. Коли РНК-полімераза не використовується, вона зв’язується з неспецифічними ділянками ДНК в очікуванні відкриття активного промотора.

РНК-полімерази еукаріот. На відміну від еубактерій, які при транскрипції різних наборів генів використовують різні σ-фактори, еукаріоти для досягнення тих же цілей вдаються до іншої стратегії, а саме – спеціалізації молекул РНК-полімераз. У ядрах еукаріотів виявлено щонайменше три спеціалізовані форми РНК-полімерази:

- РНК-полімераза I (A) (*Pol I*) здійснює транскрипцію генів рибосомних РНК (рРНК), синтезуючи в ядерцях єдиний 45S-попередник, що перетворюється потім на рРНК 28S, 18S і 5,8S, які і утворюють головні РНК-секції рибосоми;
- РНК-полімераза II (B) (*Pol II*) синтезує попередники мРНК, а також для більшості малих ядерних РНК (мяРНК) та мікро РНК (міРНК);
- РНК-полімераза III (C) (*Pol III*) транскрибує гени всіх транспортних (тРНК), 5S рРНК та ряду мяРНК (7SL, U6, 7SK, РНК-компонент рибонуклеаз P и MRP ссавців).

Кожен з цих ферментів являє собою полісубодиничний білковий комплекс масою 0,5-0,7 МДа, що складається з двох великих (120-220 кДа) і 10-15 малих (10-100 кДа) субодиниць. Великі субодиниці

гомологічні своїми амінокислотними послідовностями ділянкам *β*- і *β'*-субодиниць еубактерій, що, можливо, відображає фундаментальну подібність у структурі та функціонуванні активних центрів цих ферментів. Окрім того, два мотиву в первинних структурах субодиниць *Rpc*40 і *Rpc*19 РНК полімераз I і III, *Rpb*3 і *Rpb*11 РНК полімерази II, а також *D* і *L* РНК полімерази архей схожі з N-кінцевим доменом субодиниці *α* бактерій (*α*NTD). Субодиниця α, утворюючи гомодимер, бере участь у складанні бактеріальної РНК полімерази і активації транскрипції. З використанням двогібридної системи було встановлено, що субодиниці *Rpc*40 і *Rpc*19 та *Rpb*3 і *Rpb*11, також утворюють стабільні гетеродимери *in vivo*. П'ять малих субодиниць є загальними для різних форм РНК-полімераз. Декілька невеликих субодиниць еукаріотичних РНК-полімераз, які не мають аналогів у бактеріальних ферментів, є загальними для всіх РНК-полімераз, що може вказувати на їх однакові функції при транскрипції і на їх можливу участь у координації функціонування різних РНК-полімераз.

РНК-полімераза I еукаріот є великим ферментом, побудованим щонайменше з 14 субодиниць. Мінімальний фермент Pol I містить два великих поліпептиди (*Rpa*1 і *Rpa*2) з молекулярною масою 190 і 135 кДа, які є функціональними аналогами *β'*-і *β*-субодиниць РНК-полімерази *E.coli*, а також субодиниці *Rpc*40 і *Rpc*19. Формування холоферменту відбувається при асоціації з малими субодиницями, молекулярні маси яких коливаються в межах 15-60 кДа.

РНК-полімераза II еукаріот складається також щонайменше з 12 субодиниць, загальною масою ~ 550 кДа. *Rpb*1 (~190 кДа) є найбільшою субодиницею, яка містить активний центр та, відповідно, каталізує транскрипцію РНК на матриці ДНК. Субодиниця Rpb1 містить С-кінцевий домен (СКД), який і зумовлює ініціацію полімеразної активності. Цей домен зазвичай складається з 52 повторень послідовності з ~ семи амінокислот. Друга за величиною субодиниця – *Rpb*2 (~130 кДа) – у поєднанні щонайменше з двома іншими субодиницями (*Rpb*3 і *Rpb*11) формує мінімальний фермент (рис. 25). Ця структура в межах каталітичного центру ферменту підтримує контакт між матричною ДНК і РНК.

РНК-полімераза III еукаріот містить як мінімум 17 субодиниць. Найбільші субодиниці – *Rpc*1 і *Rpc*2 – є аналогами головних судбодиниць вищеописаних полімераз. Вони у комплексі з субодиницями *Rpc*40 і *Rpc*19 (тотожні субодиницям РНК-полімерази I) утворюють мінімальний фермент.

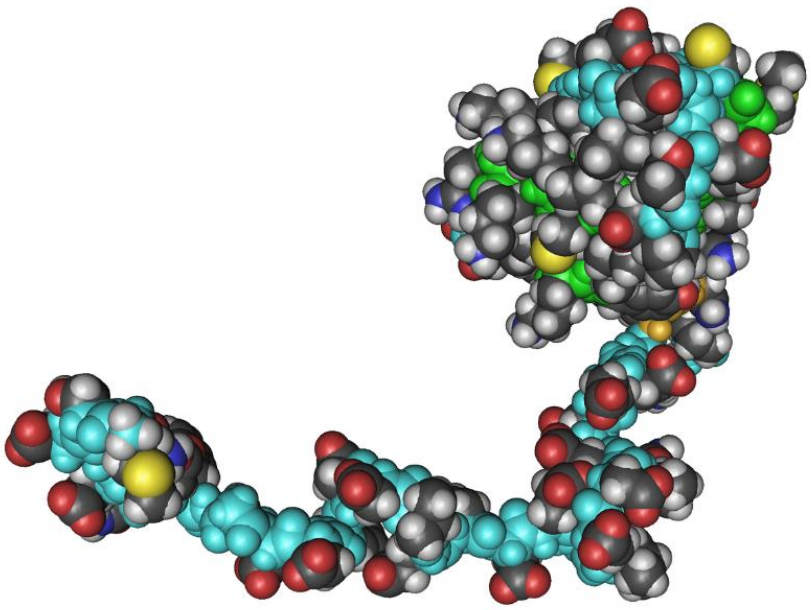


Рис. 25. **Молекулярна будова мінімального ферменту РНК-полімерази II**

Окрім вищеописаних РНК-полімераз у мітохондріях еукаріот функціонує окрема РНК-полімераза (мтРНК-полімераза), яка представлена однією субодиницею з масою 145 кДа. Ген, що кодує мтРНК-полімеразу, розташований в хромосомах ядра. Цей фермент містить специфічну N-кінцеву послідовність із 41 амінокислоти, яка є сигналом для транспорту до мітохондрії. Окрім того, мтРНК-полімераза має високу структурну гомологію та ідентичність виконуваних функцій у різних організмів, зокрема для бактерій і деяких бактеріофагів (Т3, Т7 та Sp6). С-кінцевий домен мтРНК-полімерази, аналогічно полімеразі бактерій, виконує функцію розпізнавання промотора і здатний до каталітичної активності. Відомо, що мтРНКП, на відміну від РНК-полімерази II, проявляє чутливість до рифампіцину, який також є інгібітором РНК полімерази бактерій.

Транскрипція пластидних генів забезпечується двома РНК-полімеразами, одна з яких кодується в ядрі рослинної клітини, проте як інша – пластидною ДНК.

Власна РНК-полімераза пластид володіє типовими прокаріотичними рисами і дуже близька до відповідного ферменту *E.coli*. Вона складається з чотирьох типів субодиниць $\alpha_2\beta\beta'\beta''$. Ці субодиниці кодуються пластидним геномом. Структура ферменту $\alpha_2\beta\beta'\beta''$ характерна лише для пропластид. Така РНК-полімераза не може самостійно розпізнавати промоторні області генів, для цього до неї повинна приєднатися σ-субодиниця. Вона кодується ядерним

геномом і приєднується до ферменту в умовах сонячної інсоляції. Незважаючи на ядерне кодування, продукти цих генів мають високу гомологію з *σ*- субодиницями цианобактерій і ефективно розпізнають типові промотори прокаріот. Ядерна локалізація цих генів, ймовірно, є результатом переміщення генетичного матеріалу пластид до ядра.

Оскільки в темряві і пропластидах власна РНК-полімераза неактивна, то в цих умовах функціонує інша РНК-полімераза, яка кодується ядерним геномом. Вона являє собою мономерний фермент, дуже схожий на мтРНК-полімеразу і також має сигнальну послідовність транспорту в пластиди.

РНК-полімераза архей. Археї використовують один вид РНК-полімерази, який дуже схожий на РНК-полімеразу II еукаріотів і складається приблизно з 12 субодиниць. Деякі вчені припускають, що архейна РНК-полімераза в певному наближенні може бути еволюційним предком спеціалізованих еукаріотичних полімераз.

У табл. 2 наведено перелік компонентів основних РНК-полімераз трьох доменів біоти. В одному ряді наведені функціонально аналогічні субодиниці.

Таблиця 2

Субодиничний склад РНК-полімераз різного походження *

Еубактерії	**Археї**	**Еукаріоти**		
		Pol I	**Pol II**	**Pol III**
β’	A	Rpa1	Rpb1	Rpc1
β	B	Rpa2	Rpb2	Rpc2
α_I	D	**Rpc40**	Rpb3	**Rpc40**
α_{II}	L	**Rpc19**	Rpb11	**Rpc19**
ω	K	**Rpb6**	**Rpb6**	**Rpb6**
	F	Rpa14	Rpb4	Rpc17
	H	**Rpb5**	**Rpb5**	**Rpb5**
	E	Rpa43	Rpb7	Rpc25
	G	**Rpb8**	**Rpb8**	**Rpb8**
	X	Rpa12	Rpb9	Rpc11
	N	**Rpb10**	**Rpb10**	**Rpb10**
	M (P)	**Rpb12**	**Rpb12**	**Rpb12**
		Rpa49		Rpc82
		Rpa34		Rpc53
				Rpc37
				Rpc34
				Rpc31

* Примітка: Жирним шрифтом виділені спільні субодиниці ядерних РНК-полімераз I-III

4.4. Етапи транскрипції

У звичайних умовах холофермент РНК-полімерази еубактерій для ініціації транскрипції не вимагає додаткових факторів. На відміну від цього для точної ініціації транскрипції еукаріотичних РНК-полімераз потрібна наявність, крім її субодиниць, ще й факторів транскрипції. Синтез РНК, який не залежить від присутності регуляторних молекул, отримав назву *базальної транскрипції*. Транскрипція, яка вимагає участі білків-активаторів або репресорів, отримала назву *індукованої*, або *активованої*.

Зазвичай факторами транскрипції називають білки або білкові комплекси, які безпосередньо не беруть участі в каталітичному акті утворення РНК, але які необхідні для проходження основних етапів транскрипції та її регуляції. За функціональністю прийнято розрізняти три класи факторів транскрипції. До першого класу відносяться основні фактори транскрипції (англ. *General Transcription Factor – GTF*), що забезпечують нерегульований базальний рівень транскрипції і функціонують у клітинах усіх типів. До другого класу відносяться фактори транскрипції, які специфічно взаємодіють з певними послідовностями ДНК (англ. *Specific Transcription Factor – STF*). Вони є основними регуляторами транскрипції і забезпечують тканиноспецифічну експресію генів. І, нарешті, третій клас факторів транскрипції представлений нещодавно відкритими білками – коактиваторами транскрипції, у тому числі численні *TAF*-білки (англ. *TAB-Associated Factors*), які діють узгоджено з основними і тканиноспецифічними факторами, забезпечуючи більш тонку регуляцію утворення РНК.

Як уже зазначалось процес транскрипції умовно поділяють на чотири етапи (рис. 26). Розглянемо кожний з них окремо.

Зв'язування РНК-полімераз із ДНК (преініціація). Прийнято вважати, що після початкового зв'язування РНК-полімерази з ДНК у випадкових місцях фермент просувається уздовж подвійної спіралі до тих пір, поки не натрапить на послідовності нуклеотидів промоторів, в межах яких взаємодія ферменту з ДНК стає більш міцною. Молекули РНК-полімерази під час руху можуть періодично від'єднуватись від ДНК і зв'язуватись з нею на новому місці, що прискорює процес пошуку промоторів. Останні, залежно від виду організму, можуть складатись з трьох елементів: корового, проксимального і дистального.

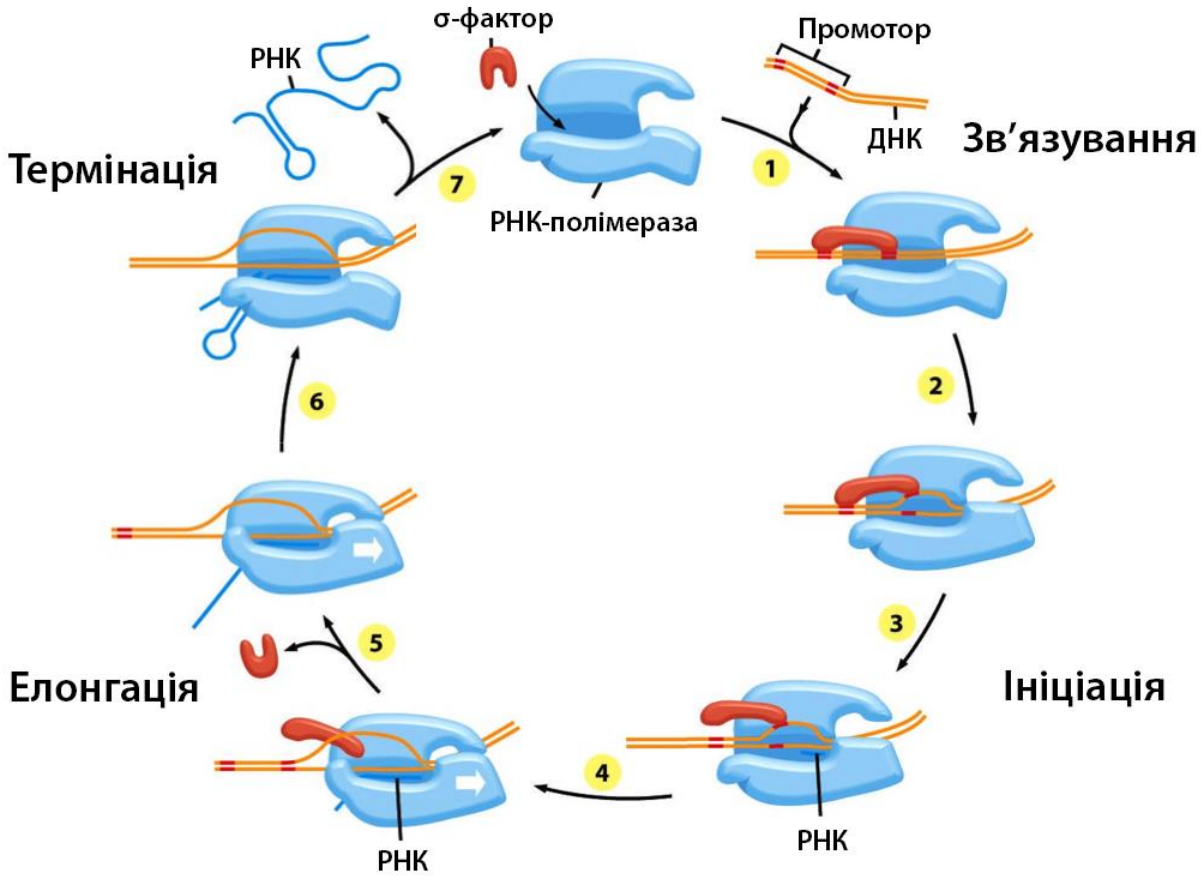


Рис. 26. **Схема транскрипції бактеріальних клітин**

Коровий промотор – це мінімальний набір послідовностей нуклеотидів, необхідних для коректної ініціації транскрипції. Він включає *сайт (місце) початку транскрипції* (англ. *Transcription Start Site – TSS*) та елементи, які розміщуються до нього, а саме сайти зв'язування з РНК-полімеразами і головними факторами транскрипції.

Проксимальний промотор – це ділянка матричної ДНК завдовжки ~ 250 нуклеотидів, яка розташована безпосередньо перед сайтом початку транскрипції. Вздовж проксимального промотора розташовані сайти зв'язування специфічних факторів транскрипції.

Дистальний промотор – це послідовність нуклеотидів матричної ДНК, яка розташована на відстані більше 250 нуклеотидів перед сайтом початку транскрипції. Цей промотор може містити додаткові регуляторні елементи, часто з більш слабким впливом, ніж у проксимального промотора, а також додаткові сайти зв'язування специфічних факторів транскрипції.

Мінімальний промотор для холоферменту РНК-полімерази бактерій містить дві канонічні послідовності. Для позначення локалізації (розташування) відповідних областей використовується відстань до (після) сайту початку транскрипції певного гену. Якщо

ділянка розміщена до цього сайту, то проставляється знак «-», якщо після – «+» або без знаку. Всі канонічні ділянки прокаріот розташовані до TSS. Перша ділянка – *Прібнов-бокс* або *-10 елемент* – розташована в діапазоні -10…-5 перед першим нуклеотидом структурного гену (+1) і складається з шести нуклеотидів (TATAAT), які можуть дещо відрізнятись у різних видів. Друга ділянка – *-35 елемент* – розташована між нуклеотидами в положеннях -35…-30 і складається також з шести нуклеотидів: TTGACA, які також можуть дещо відрізнятись у різних видів (рис. 27). Обидві ці послідовності специфічно взаємодіють з двома ділянками поліпептидного ланцюга σ^{70}-субодиниці (для інших σ-пептидів промотор має іншу структуру). Відстань між -10 і -35 послідовностями впливає на активність промотора. Оптимальна довжина відрізка між ними становить 17 п.о.

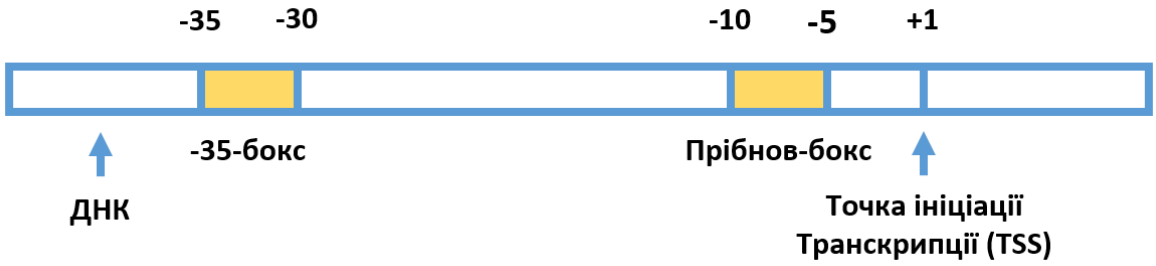


Рис. 27. **Структура промотору еубактерій**

Серед інших послідовностей, які впливають на активність промоторів, але не є універсальними, слід відмітити так звані UP-елементи (англ. *Upstream Promoter Element*). Серед таких найросповсюдженіші -42 і -52 послідовності. Перша збагачена аденіном, а друга – аденіном з тиміном.

Структура еукаріотичних промоторів більш складна і різноманітна. Здебільшого це зумовлено використанням трьох різних систем транскрипції (не рахуючи систем транскрипції генів мітохондрій і пластид) у зв'язку із функціонуванням трьох ядерних РНК-полімераз.

Промотори РНК-полімерази І. Незважаючи на те, що ділянки геному, які кодують рРНК, є одними з найбільш консервативних, регуляторні послідовності, що забезпечують ініціацію транскрипції у різних видів, дуже відрізняються. Проте, загальний план будови промоторів генів рРНК практично не відрізняється у всіх досліджених еукаріот. Промотори РНК-полімерази І містять два корові регуляторні елементи (англ. *Core Promoter Element – CPE*), локалізовані між положеннями -75…-50, а також -30…+1.

Основний (коровий) промотор здатний слабко зв'язуватись із білковим комплексом *SL*1 (англ. *Selectively factor* 1). Останній має ділянки специфічного контакту з РНК-полімеразою I. Було встановлено, що комплекс *SL*1 залишається пов'язаним з промотором протягом декількох раундів ініціації синтезу РНК РНК-полімеразою I. Стабільна взаємодія комплексу *SL*1 з промотором вимагає участі додаткового ДНК-зв'язуючого білка *UBF*, який сам по собі має здатність слабко зв'язуватися з віддаленою регуляторною послідовністю *UCE* (англ. *Upstream Control Element*), яка розташована між нуклеотидами в положеннях -90 і -150 (рис. 28). Синергізм стимулюючої дії *SL*1 і *UBF* на транскрипцію РНК-полімеразою I може бути обумовлений наявністю безпосередніх контактів між цими двома факторами.

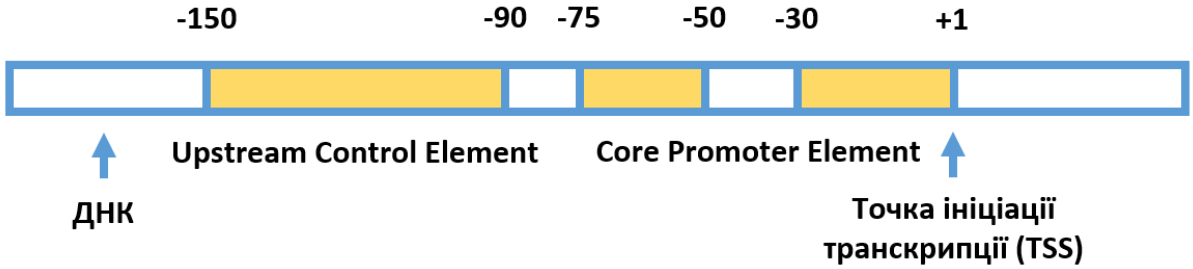


Рис. 28. **Структура промотору еукаріот для РНК-полімерази I**

Встановлено, що послідовностей *CPE* достатньо для ініціації транскрипції генів рРНК. Поясненням цього є те, що відповідні промотори найпростіших, грибів та рослин не містять *UCE*-сайтів. Також, стало відомо, що білок *UBF* не є необхідним компонентом безклітинних систем транскрипції.

Промотори РНК-полімерази II. Промотори РНК-полімераз II містять всі родини регуляторних послідовностей ДНК. Послідовності першої родини включають так звані *корові*, або *базальні елементи* (блоки, бокси, сайти) промотора, розташовані поблизу точки ініціації транскрипції. Нині відомі два класи базальних елементів: *TATA*-бокс, або *бокс Голберта-Хогнеса* (канонічна послідовність – TATAAA), розташований на відстані 25-30 нуклеотидів перед точкою ініціації, а також так званий *ініціатор* (*Inr*), послідовність якого збагачена піримідинами (канонічна послідовність – YYANT/AYY, де N – будь-який нуклеотид, Y – це будь-який піримідин, а підкреслений нуклеотид є стартовим, тобто займає положення +1). *TATA*-бокс та ініціатор функціонально схожі. Вони слугують місцем для збирання ініціаційного білкового комплексу і розпізнаються основними

факторами транскрипції (*GTF*). Промотори РНК-полімерази II містять одну чи обидві ці послідовності або ж не мають їх взагалі. При цьому обидва елементи можуть функціонувати незалежно один від одного, або ж у їх дії спостерігається синергізм.

Наступні проксимальні промоторні елементи, як правило, складаються з коротких послідовностей довжиною 10-15 п.н., з якими безпосередньо взаємодіють фактори транскрипції. Один з таких елементів – *CAT*-бокс – розташований на відстані 75-80 п.н. перед сайтом ініціації і складається з канонічної послідовності типу GGCCAATCT. Інший елемент – *GC*-бокс – розташований на відстані 110 п.н. з канонічною послідовністю GGGCGG (рис. 29).

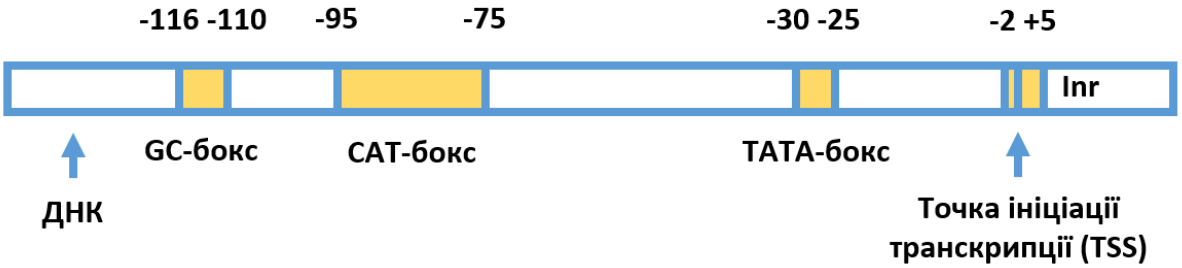


Рис. 29. **Структура промотору еукаріот для РНК-полімерази II**

Дистальні елементи промоторів складніше влаштовані, ніж проксимальні й можуть розташовуватись на значних відстанях від точки ініціації ~ 60 т.п.н. До них відносяться *енхансери* – короткі ділянки ДНК, до якої можуть приєднуватись фактори транскрипції, що збільшують рівень транскрипції гену. Також, дистальними є *сайленсери* – послідовності ДНК, з якими зв'язуються фактори транскрипції, що знижують або повністю пригнічують синтез РНК ферментом РНК-полімеразою. Слід зазначити, що в активному промоторі дистальні і проксимальні регуляторні елементи зближаються один з одним за рахунок утворення петель ДНК.

Промотори РНК-полімерази III. У зв'язку із тим, що спектр продуктів РНК-полімерази III ширший, ніж у інших аналогічних ферментів еукаріот, гени, які кодують відповідні РНК, умовно поділяють на три типи:

- I тип – гени, що кодують 5S рРНК;
- II тип – гени, що кодують тРНК;
- III тип – гени, що кодують мяРНК.

Гени 5S рРНК містять внутрішній регуляторний регіон (англ. *Internal Control Region – ICR*) та основний регуляторний регіон (англ. *Essential Control Region – ECR*). Останній у різних видів дещо

відрізняється за складом, проте спільною рисою є наявність ТАТА-мотиву (ділянки, що зустрічається в різних генах). Так у *D.melanogaster* ця ділянка складається з послідовності GAGTATAA, і локалізується у діапазоні -34…-27, хоча весь *ECR* розташований в межах від -39 до -26 п.н. У зв'язку зі своїм положенням, *ECR* ще називають *-30-регіон*. Внутрішній регуляторний регіон складається з декількох елементів, які розпізнають основні фактори транскрипції. Одна із найрозповсюдженіших схем передбачає три таких елементи. Перший з них – *А-бокс* – складається з найбільш консервативної послідовності нуклеотидів, яка розташовується між нуклеотидами +50 і +64. Другий – *С-бокс* – локалізується в положенні +80…+97. Ще один елемент, який названий *проміжним* (англ. *Intermediate Element – IE*), найкоротший і обмежений 67 і 72 нуклеотидами після точки початку ініціації (рис. 30). Діапазони локалізації внутрішніх елементів, а також їх кількість можуть відрізнятись у різних видів. З трьома елементами *ICR* взаємодіє основний фактор транскрипції *TFIIIA* (англ. *Transcription Factor III A*). Комплекс *TFIIIA-ICR* стабілізується після взаємодії *TFIIIA* з фактором С (*TFIIIC*), хоча для останнього в промоторі відсутня специфічна ділянка зв'язування.

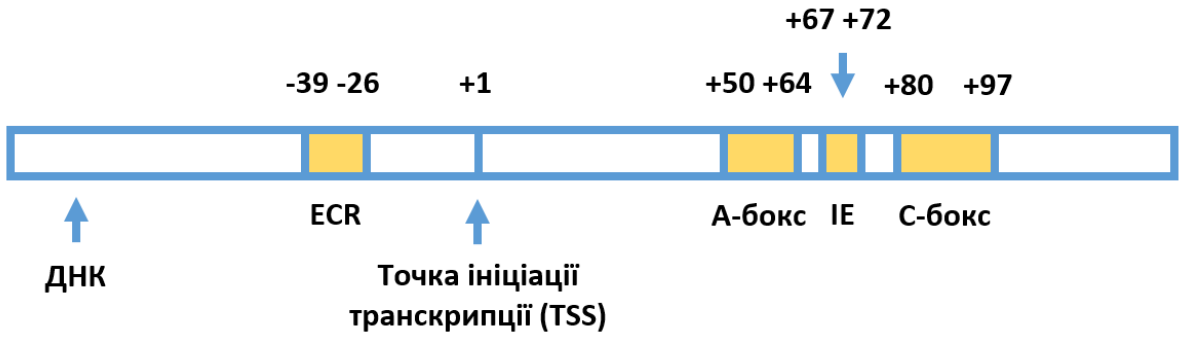


Рис. 30. **Структура промотору еукаріот для РНК-полімерази III (гени I типу)**

Другий тип промоторів складається з двох високо консервативних боксів А і В, розташованих усередині транскрибованої області. Бокси А першого і другого типу промоторів є гомологічними один одному та іноді можуть бути взаємозамінними, але в промоторах другого типу *А-блок* розташовується ближче до точки початку транскрипції (+8…+19). Розташування *блоку В* сильно варіює не тільки від виду до виду, але навіть серед тРНК одного організму, частково через те, що деякі гени тРНК містять короткий інтрон. Найчастіше *В-бокс* розташований в положенні +52…+62 (рис. 31). Обидва ці регуляторні елементи розпізнаються безпосередньо фактором *TFIIIC*, який утворює з ними

дуже міцний комплекс. Враховуючи, що блок В не має фіксованого положення, вражає гнучкість фактора *IIIC*. Принаймні чотири поліпептидні ланцюги, що входять до складу комплексу *TFIIIC*-промотор, контактують один з одним і покривають ділянку ДНК між положеннями -25 і +75.

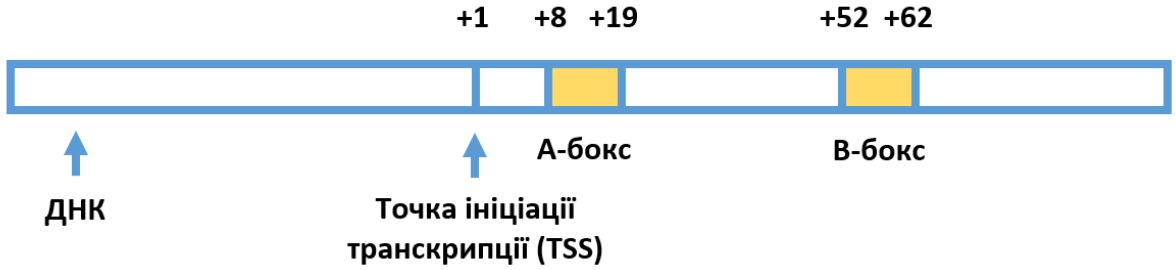


Рис. 31. **Структура промотору еукаріот для РНК-полімерази III (гени II типу)**

Гени третього типу, які кодують мяРНК, наприклад U6-РНК, у вищих еукаріот, містять тільки регуляторні елементи, розташовані перед точкою ініціації транскрипції. Для ефективної роботи промотору потрібні: *TATA-бокс*, розташований між нуклеотидами -25 та -30, і проксимальний елемент *PSE* (англ. *Proximal Sequence Element*), що знаходиться між нуклеотидами -66 і -47, а також дистальний елемент *DSE* (англ. *Distal Sequence Element*), що займає ділянку від -244 до -214 нуклеотиду (рис. 32).

Рис. 32. **Структура промотору еукаріот для РНК-полімерази III (гени III типу)**

Незважаючи на наявність *TATA*-елемента, зазвичай саме *PSE* фіксує положення точки ініціації транскрипції. Виявлено два різних *PSE*-зв'язуючих білкових комплекси: *SNAP* і *PTF*. Активність промоторів третього типу залежить від наявності ТАТА-зв'язуючого білка (англ. *TATA Binding Protein – TBP*). Білок *TBP*, що входить до складу фактора транскрипції *TFIIIB*, взаємодіє безпосередньо з ТАТА-елементом промотора. Оскільки для ініціації транскрипції на цих

промоторах потрібна наявність *PSE*-елемента, припускають, що *PSE*-зв'язуючі фактори взаємодіють з *TBP*-компонентом фактора *TFIIIB.*

Ініціація транскрипції. Ініціація транскрипції починається зі збірки на промоторі преініціаційного комплексу (англ. *Preinitiation Complex – PIC*), до складу якого входять молекули РНК-полімерази і матричної ДНК. Для здійснення цього процесу в прокаріотичній клітині не потрібні додаткові білкові фактори. Тим часом, механізм складання такого комплексу за участю РНК-полімерази II еукаріот, а також аналогічного ферменту архей, носить більш складний характер.

Згідно з домінуючою моделлю *Pol II* входить до складу преініціаційного комплексу у вигляді холоферменту, який складається з багатьох субодиниць. Під час утворення цього комплексу відбувається послідовне зв'язування з промотором основних факторів транскрипції.

Першим з *TATA*-послідовністю промотора зв'язується *TBP*, який разом із щонайменше дев'ятьма білковими субодиницями в подальшому формує білковий комплекс *TFIID*. Білок *TBP*, також, необхідний для здійснення транскрипції РНК-полімеразами I і III; він є універсальним фактором транскрипції в еукаріот. Взаємодія *TBP* з *TATA*-послідовністю характеризується зміною структури ДНК в цьому місці, що супроводжується частковим розгортанням подвійної спіралі. У подальшому відбувається приєднання *TFIIA* до *TBP* субодиниці *TFIID*. Окремо фактор транскрипції II A не взаємодіє з промотором ДНК, проте стабілізує зв'язок *TBP* з *TATA*-боксом.

Наступним приєднується *TFIIB*. Його N-кінцевий домен підлаштовує ДНК для контакту з РНК-полімеразою II. Комплекс з трьох факторів транскрипції (*TFIID*-*TFIIA*-*TFIIB*) і ДНК утворюють так званий *DAB*-промотор. Така структура здатна з'єднуватись з комплексом РНК-полімерази II і *TFIIF*, амінокислотні послідовності якого виявляють явну гомологію з послідовностями σ70-фактора РНК-полімерази *E.coli*. Це може вказувати на певну спільність функцій і еволюційного походження про- і еукаріотичних факторів транскрипції.

Наступним до зростаючого комплексу приєднується *TFIIE*. Цей фактор ймовірно залучений до локального плавлення подвійної спіралі ДНК у положеннях між нуклеотидами -10…+3 з утворенням коротких одноланцюгових ділянок. Ця властивість зумовлена наявністю так званого «цинкового пальця», який здатен з'єднуватись з одноланцюговою ДНК.

Транскрипційний фактор II *E* сприяє приєднанню наступного елемента PIC – TFIIH, який, ймовірно, входить до комплексу разом з *TFIIJ*. Фактор транскрипції II H складається з багатьох субодиниць, зокрема в ній присутні *CDK7*/*cyclin H* кіназа і ДНК хелікази. Відповідно *TFIIH* виконує три важливі функції:

- специфічно зв'язується лише з матричним ланцюгом для забезпечення правильної плавки за рахунок власної хеліказної активності;
- за рахунок активності кіназ відбувається повне фосфорилювання серинових і треонінових залишків С-кінцевого домену (*CTD*) *Pol II*, що дозволяє вивільнити РНК-полімеразу II з промотора;
- здійснює ексцизійну репарацію нуклеотидів пошкодженої ДНК.

Фактори II E і II H міцно взаємодіють один з одним. Самостійно *TFIIH* не здатний виконувати власних функцій.

Окрім того, ще один білковий комплекс – медіатор (транскрипційний коактиватор) – упаковує всі фактори транскрипції і *Pol II*. Також він здатний взаємодіяти з енхансерами.

У бактерій більшість функцій факторів транскрипції виконує тільки *σ*-субодиниця.

Після утворення преініціаційного закритого комплексу з ним відбуваються певні конформаційні зміни, які необхідні для утворення активного ініціюючого транскрипційного комплексу. Особливістю останнього є те, що холофермент РНК-полімерази II повністю охоплює молекулу ДНК в околицях точки ініціації транскрипції. При цьому відбувається локальне розплітання подвійної спіралі ДНК. У подальшому в присутності чотирьох рибонуклеозидтрифосфатів може відбуватися ініціація транскрипції, яка супроводжується синтезом коротких (до 7-8 нуклеотидів) олігорибонуклеотидів. Якщо подальший синтез РНК неможливий (наприклад, через відсутність чергового нуклеотиду), транскрипційний комплекс буде безперервно ініціювати транскрипцію. Ця стадія синтезу РНК отримала назву *абортивної транскрипції* (рис. 33). Після синтезу РНК довжиною більше дев'яти нуклеотидів фермент спроможний звільнитись з промотора.

Припускається, що *in vivo* часткове фосфорилювання *CTD*-домену утримує молекулу РНК-полімерази II на промоторі, а його повне фосфорилювання дозволяє ферменту покинути промотор і перейти до елонгації ланцюгів РНК. Цей процес отримав назву «звільнення промотора» (англ. *Promoter Clearance*). Крім того, перехід закритого

преініціаційного комплексу, утвореного РНК-полімеразою II, у відкритий комплекс є АТР-залежним процесом.

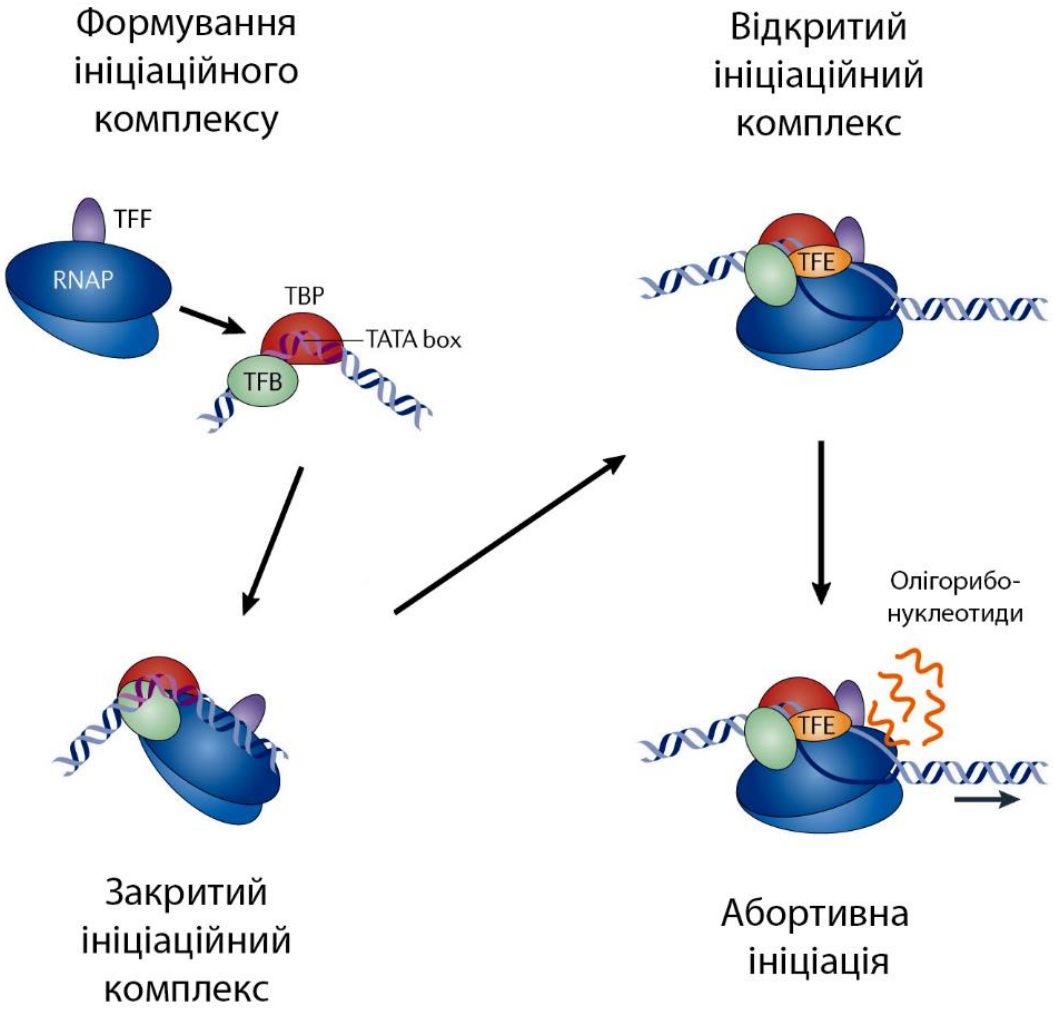


Рис. 33. **Схема формування ініціаційного комплексу РНК-полімерази II**

Елонгація ланцюгів РНК. Момент переходу РНК-полімерази від ініціації транскрипції до елонгації точно не визначений. У бактерій існує три основні біохімічні події, які характеризують цей перехід: від'єднання σ-фактора, перша транслокація молекули ферменту уздовж матриці і сильна стабілізація транскрипційного комплексу, до складу якого окрім РНК-полімерази входить зростаючий ланцюг РНК і транскрибована ДНК. Такі ж явища характерні для РНК-полімераз еукаріот і архей, хоча в цьому випадку момент переходу від ініціації до елонгації ще більш невизначений. В усіх випадках перехід від ініціації до елонгації супроводжується розривом зв'язків між ферментом, промотором і факторами ініціації транскрипції, а в ряді випадків – переходом РНК-полімерази в стан компетентності щодо

елонгації (наприклад, фосфорилювання CTD-домену у РНК-полімерази II).

Основні риси структури потрійного елонгуючого комплексу консервативні для всіх ДНК-залежних РНК-полімераз. У кожному такому комплексі є каталітичний центр, одноланцюгова ділянка ДНК-матриці, а також декілька сайтів зв'язування ДНК і РНК. Відповідно до сучасних уявлень існує два таких сайти, кожен з яких покриває на матричній ДНК приблизно 10 н.п., при цьому довжина ділянки РНК між ними складає 30-40 нт. Для реалізації принципу комплементарності (при побудові зростаючого ланцюга РНК) ділянка матричної ДНК, яка входить до складу комплексу, знаходиться в розплетеному стані. Ця ділянка ДНК, яка названа *транскрипційною бульбашкою, або сферою* (*Transcription Bubble*), контактує з каталітичним центром РНК-полімерази. По обидва боки транскрипційної сфери є ділянки ДНК, які при переміщенні ферменту уздовж матриці піддаються розплітанню і повторному відпалу (відновлення зв'язків між ланцюгами ДНК), в результаті якого відновлюється вихідна структура ДНК (рис. 34). Вважається, що останній процес не є каталітичним, протікає самовільно і пов'язаний з особливостями структури РНК-полімерази як такої.

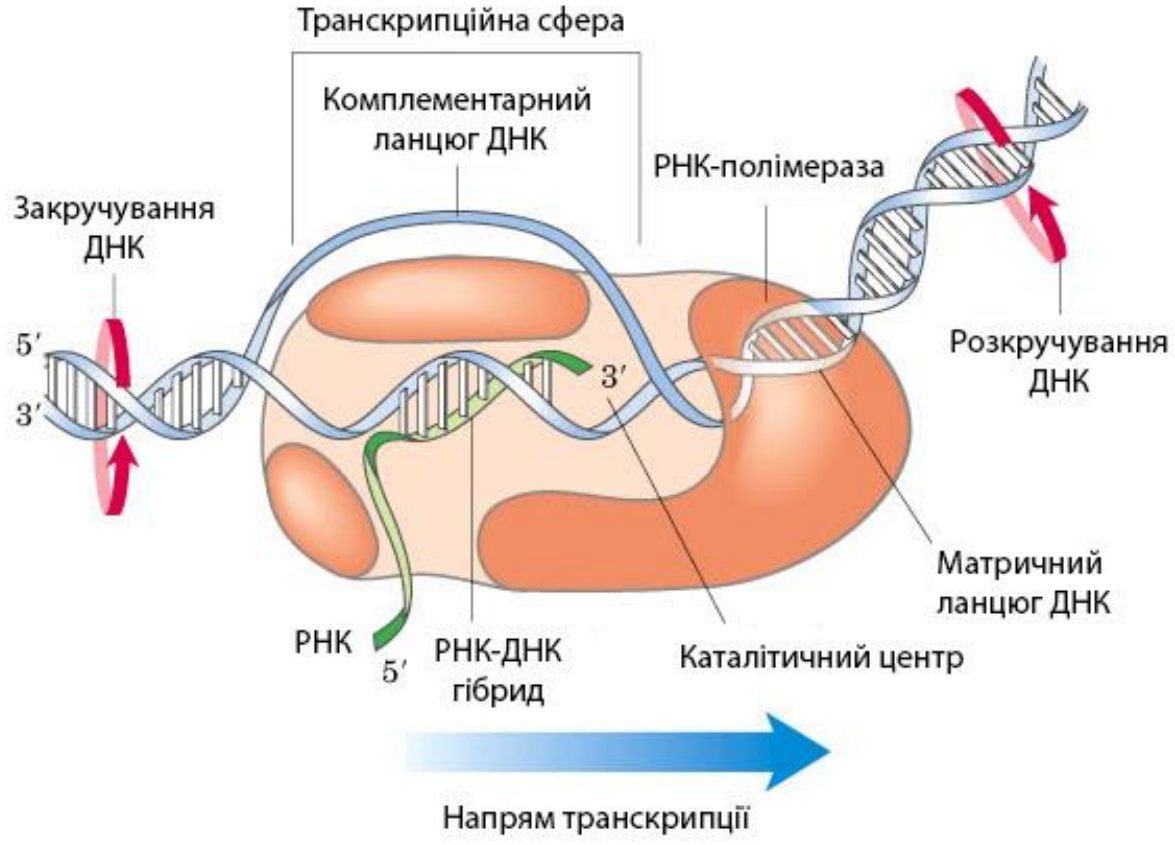


Рис. 34. **Принципова схема елонгуючого комплексу еукаріот**

Швидкість транскрипції різних РНК-полімераз значно відрізняється. Виявлена слабка кореляція між субодиничною будовою цих ферментів і швидкістю, з якою вони здатні полімеризувати РНК. Так, РНК-полімерази бактеріофагів, які складаються з однієї субодиниці, є найбільш швидкими. Вони здатні елонгувати *in vitro* зростаючий ланцюг РНК зі швидкістю 200-400 нт/с. Бактеріальні РНК-полімерази транскрибують ДНК з проміжною швидкістю – 50-100 нт/с, хоча швидкість елонгації РНК-полімеразою II багатоклітинних організмів *in vitro* становить всього 5-10 нт/с. Еукаріотичні РНК-полімерази елонгують ланцюг РНК *in vivo* зі швидкістю ~ 20-30 нт/с.

Також встановлено, що елонгація РНК не відбувається з постійною швидкістю. Під час цього процесу РНК-полімераза може отримувати сигнали, які викликають затримку (*pause*), припинення (*arrest*), або термінацію транскрипції. У результаті затримки молекула РНК-полімерази тимчасово зупиняє синтез РНК на певний період часу, після чого спонтанно продовжує транскрипцію. На відміну від цього, елонгуючі комплекси, які припинили синтез РНК, не здатні продовжити транскрипцію без допомоги додаткових факторів. Сигнали, що викликають таку поведінку РНК-полімерази, можуть бути внутрішніми, у вигляді певної послідовності нуклеотидів транскрибованої ДНК, або зовнішніми – у якості специфічних білків-регуляторів, які зв’язалися з матрицею. Припинення транскрипції може бути викликане і в штучних умовах за відсутності одного або декількох рибонуклеозидтрифосфатів. Під час затримки або припинення синтезу РНК РНК-полімераза залишається каталітично активною, стабільно зв’язаною з ДНК і утримує зростаючий транскрипт у складі потрійного комплексу. Саме ці характерні особливості відрізняють РНК-полімеразу в стані затримки або припинення елонгації РНК від ферменту, що знаходиться у фазі термінації транскрипції. У багатьох випадках, коли неможливо чітко диференціювати три вищезазначених стани транскрипції, кажуть просто про блокування синтезу РНК.

В еукаріотів є білкові фактори елонгації РНК, які відносять до двох різних класів: основним (англ. *General Elongation Factors – GEF*) і регуляторним факторам (англ. *Specific Elongation Factors – SEF*). Основні фактори елонгації РНК забезпечують ефективну транскрипцію всіх генів, які кодують білки, але регуляторні фактори специфічно контролюють експресію окремих генів або навіть цілих їх родин. Одна група *GEF* перешкоджає переходу затриманих

елонгуючих комплексів РНК-полімерази II в стан повного припинення транскрипції. До них відносяться *P-TEFb* і *SII (TFIIS)*. Інша група основних факторів елонгації супресує (пригнічує) затримку елонгації ланцюгів РНК, тим самим зменшуючи ймовірність переходу елонгуючих комплексів в стан повного припинення росту РНК. До цієї групи належать три структурно неспоріднених білка: фактори *TFIIF*, елонгін (*SIII*) і *ELL*, які, мабуть, взаємодіють безпосередньо з компонентами потрійного елонгуючого комплексу.

Точність транскрипції, яка здійснюється РНК-полімеразами, нижче відповідного параметра ДНК-полімераз. Частота приєднання нуклеотидів до РНК некомплементарних матриці ДНК становить 10^{-3}…10^{-5}. Це пояснюється, насамперед, тим, що РНК-полімерази позбавлені коригуючої системи у вигляді 3’→ 5’- і 5’ → 3’-екзонуклеазної активності.

Термінація транскрипції. Припинення синтезу РНК під дією РНК-полімерази відбувається наприкінці транскрипційних одиниць на особливих ділянках ДНК – *термінаторах транскрипції*. Термінатори транскрипції, які функціонують з різною ефективністю, можуть знаходитися і всередині транскриптонів. Такі термінатори є потужними факторами, регулюючими рівень транскрипції (і інших етапів експресії) відповідних генів. Для здійснення термінації транскрипції на деяких термінаторах РНК-полімеразам не потрібно додаткових білкових факторів, у той час як інші термінатори за їх відсутності не функціонують.

Типові термінатори бактерій, які для свого розпізнавання РНК-полімеразою не потребують додаткових білкових факторів, містять GC-багату ділянку, яка характеризується центральною симетрією. Слідом за останньою знаходиться послідовність нуклеотидів, яка складається з розташованих підряд чотирьох-восьми залишків А матричного ланцюга ДНК. Транскрипція завершується на кінці цієї оліго-А-послідовності або ж на наступному за нею нуклеотиді. Передбачається, що після проходження РНК-полімеразою GC-багатої ділянки в цьому місці РНК утворюється шпилька (рис. 35), яка зумовлює паузу транскрипції, а олігоуридил-олігоаденіловий дуплекс (РНК-ДНК-гібрид) як найменш стабільний, дисоціює в ході цієї паузи. Ефективність припинення транскрипції на такому термінаторі залежить від стабільності термінаторної шпильки РНК. Мутації, що порушують комплементарне парування основ у шпильці,

послаблюють термінацію. Така термінація еубактерій називається – *ρ-незалежна*.

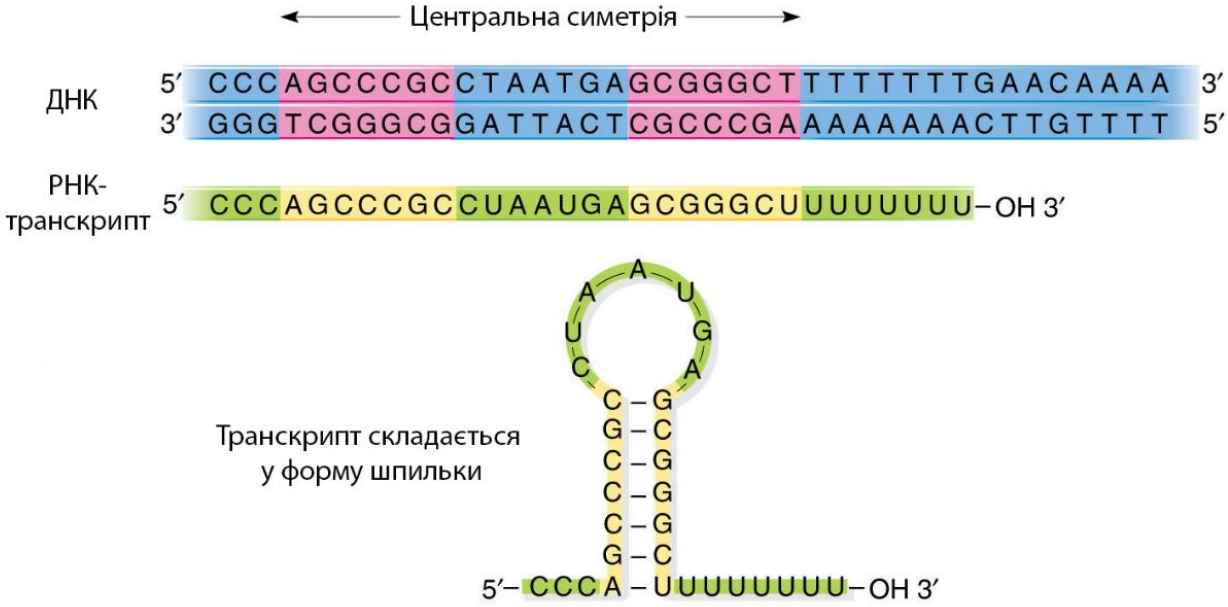


Рис. 35. **Формування РНК-шпильки під час *ρ*-незалежної термінації транскрипції**

Отже, першим з комплексу звільняється РНК-продукт, а потім мінімальний фермент РНК-полімерази. Після об'єднання з вільним σ-фактором утворений холофермент РНК-полімерази вступає в новий цикл транскрипції.

Крім вищеописаного, у бактерій виявлено термінатори транскрипції, які розпізнаються РНК-полімеразою тільки в присутності білкового фактора термінації *ρ* з молекулярною масою 46 кДа. У такому випадку термінація буде називатись *ρ-залежною*. *ρ*-білок (47 кДа) володіє РНК-залежною нуклеозидтрифосфатазною та РНК-ДНК-хеліказною активністю. Встановлено, що фактор *ρ* зв'язується з ланцюгом РНК в особливих неструктурованих ділянках, які називаються *рат-сайтами* (англ. *Rut Sites*), до того, як фермент досягне термінатора. Потім на *ρ*-залежних термінаторах РНК-полімераза призупиняє елонгацію, а *ρ*-фактор витісняє РНК з транскрипційного комплексу під час цієї паузи (рис. 35). У цьому процесі, також, приймають участь асоційовані з РНК-полімеразою фактори *NusA* і *NusG*.

Разом із цим у складі ряду оперонів виявлено так звані *атенюатори*, тобто ділянки ДНК, які викликають передчасну термінацію транскрипції. Ці генетичні елементи розташовуються перед сайтом ініціації в оперонах, які відповідають за біосинтез ряду

амінокислот. Регуляція шляхом атенюації заснована на тісному сполученні у прокаріот транскрипції і трансляції, які, як правило, протікають одночасно. У процесі трансляції іРНК, яка ще синтезується, рибосома екранує близько 10 нуклеотидів, що може істотно впливати на конформацію трансльованої іРНК, а та, у свою чергу, на просування РНК-полімерази вздовж матриці ДНК. При формуванні «критичної» конформації іРНК, як правило шпилькоподібної, настає дисоціація РНК-полімерази від ДНК.

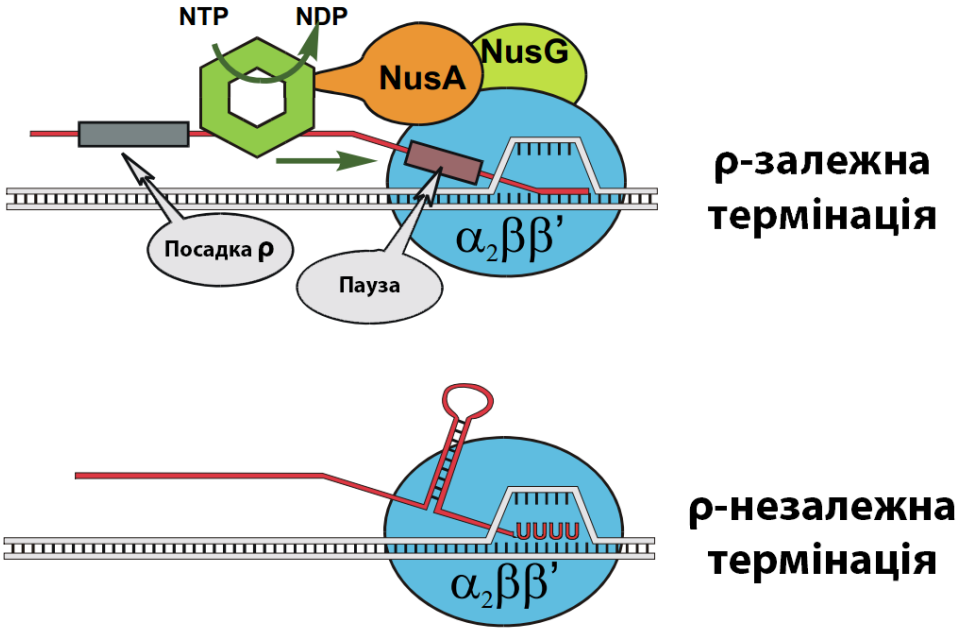


Рис. 35. **Варіанти термінації транскрипції еубактерій**

В еукаріот виявлено також ряд факторів термінації транскрипції (англ. *Termination Transcription Factors – TTF*). Зокрема для РНК-полімерази I механізм термінації передбачає наявність так званого *Sal*-боксу, який є частиною термінаторної послідовності. До цієї ділянки приєднується білок *TTF-I*, який згинає молекулу ДНК і викликає затримку елонгуючого транскрипційного комплексу на термінаторі. Передбачається, що в цей момент відбувається конформаційна зміна молекули *Pol I*, що послаблює взаємодію компонентів комплексу один з одним. Остаточний розпад комплексу та звільнення *Pol I*, а також нового транскрипту відбувається лише в присутності додаткового фактора *PTRF* (англ. *Polymerase Transcript-Release Factor*), який контактує як з *Pol I*, так і з *TTF-I*.

Хоча для кожної з форм РНК-полімерази виявлено свої специфічні білкові *TTF*, цим не обмежуються механізми, що забезпечують термінацію транскрипції в еукаріот. Дійсно, одним з основних

факторів термінації транскрипції за участю РНК-полімерази II є складний білковий комплекс, що забезпечує процесинг 3’-кінцевих послідовностей у попередників мРНК. У цьому випадку термінація транскрипції тісно поєднана з процесингом пре-мРНК досі невідомим молекулярним механізмом.

РНК-полімераза III завершує транскрипцію на невеликій ділянці з п’яти-шести нуклеотидів Т. При цьому утворення шпильки не є обов’язковим, як у прокаріот.

4.5. Хроматин під час транскрипції

В еукаріотичних клітинах матрицею для РНК-полімерази слугує ДНК, яка перебуває у складі хроматину. Логічно, що білки нуклеосом і більш високоорганізованого хроматину повинні бути перешкодою для утворення ініціаційного комплексу та переміщення транскрипційного комплексу вздовж такої матриці. Наявність нуклеосом стримує неспецифічну транскрипцію інактивованих генів і є однією з необхідних умов їх правильної експресії. Розглянемо ряд сучасних моделей, в яких робиться спроба пояснення таких механізмів.

Відповідно до сучасної моделі, для утворення функціонально активного ініціаційного комплексу, до складу якого входять РНК-полімераза і фактори транскрипції, потрібне локальне руйнування нуклеосомної структури хроматину поблизу промотору та регуляторних елементів. При цьому реалізуються дві стратегії: безперервне існування ділянки ДНК у вигляді вільної від нуклеосом послідовності нуклеотидів і індуковане руйнування нуклеосом. Перший механізм функціонує на промоторах конститутивно (постійно) зчитуваних еукаріотичних генів і забезпечується білковими факторами, які руйнують наявну нуклеосомну структуру даної ділянки ДНК або перешкоджають її утворенню. Описано, принаймні, три способи здійснення цього механізму:

1) фактори транскрипції встигають взаємодіяти з реплікуємою ДНК до формування нуклеосом;
2) фактори зв’язуються з відповідними ділянками ДНК, що містять нуклеосоми, і їх дестабілізують;
3) спеціалізовані білки руйнують нуклеосомну структуру поблизу промоторів неекспресуючих генів.

Всі ці механізми можуть функціонувати як окремо, так і в різних поєднаннях.

Для активації промоторів, структурованих в нуклеосоми, потрібно кілька етапів. Спочатку регуляторні фактори взаємодіють своїми ДНК-зв'язуючими доменами з відповідною регуляторною послідовністю, розташованою вище промотора, що супроводжується витісненням частини або всіх гістонів нуклеосом цієї послідовності. Активуючі домени білкових факторів транскрипції далі індукують дисоціацію гістонів від основного промотора, що супроводжується утворенням ініціаційного комплексу за участю РНК-полімерази та основних факторів транскрипції. Збірка транскрипційного комплексу призводить до витіснення ще однієї порції гістонів з промотора (рис. 36).

До недавнього часу залишалося незрозумілим, яким чином активуючі домени факторів транскрипції можуть впливати на структуру хроматину. Це питання почало прояснюватись після клонування генів ядерних і цитоплазматичних ацетилаз гістонів та вивчення їх особливостей. Вже давно була виявлена кореляція між підвищеним рівнем ацетилювання гістонів і посиленням транскрипції певних ділянок геному, а знижений рівень такої модифікації нукеосомних білків був пов'язаний з мовчазними генами і гетерохроматином. Однак, залишався незрозумілим механізм вибіркового ацетилювання на промоторах активуючих генів. Цю проблему було подолано після дослідження генів ацетилаз гістонів дріжджів. Було виявлено високу гомологічність гену ацетилази *HAT A* з геном коактиватора транскрипції *Gcn5*, який, як виявилось, також мав здатність до ацетилювання гістонів.

Сама процедура ацетилювання гістонів відбувається на специфічних залишках лізину N-кінцевих частинах їх поліпептидних ланцюгів, які розташовані на поверхні нуклеосомных частинок. Ця модифікація зменшує сумарний позитивний заряд корових частинок нуклеосом і послаблює взаємодію плечей гістонів з ДНК.

Таким чином, індивідуальні фактори транскрипції можуть виконувати кілька різних функцій у регуляції синтезу РНК, які визначаються їх вираженою доменною структурою. ДНК-зв'язуючі домени цих білків можуть безпосередньо змінювати структуру нуклеосом поблизу промоторів, а активуючі домени не тільки контактують з основними факторами транскрипції і стабілізують їх зв'язок з промоторами, але й здатні модифікувати структуру

хроматину, що є необхідним для ефективної ініціації транскрипції та звільнення промотору елонгуючим комплексом транскрипції.

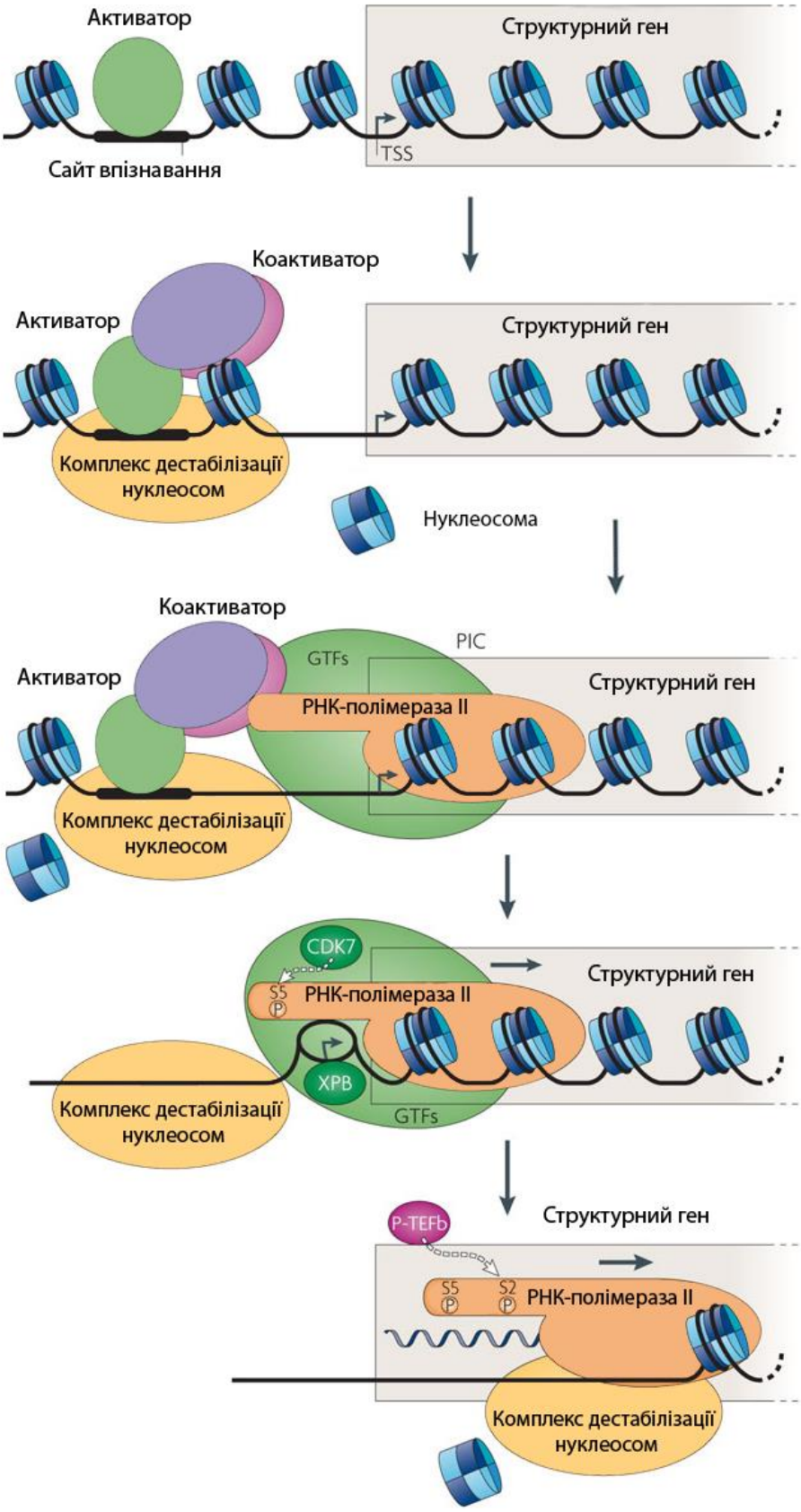


Рис. 36. **Дестабілізація і витіснення нуклеосом під час транскрипції**

У свою чергу, механізми, які забезпечують елонгацію транскрипції на нативному хроматині, не до кінця зрозумілі. Однією з гіпотез, що пояснюють процес елонгації транскрипції на хроматині, є модель подвійної суперскрученості доменів. Відповідно до цієї моделі передбачається, що транскрибуюча РНК-полімераза індукує в ДНК утворення локальної суперскрученості доменів. Позитивні супервитки утворюються попереду елонгуючої РНК-полімерази, а негативні – позаду ферменту. Закручування ДНК навколо гістонового октамера в нуклеосомі призводить до незначних змін в параметрах подвійної спіралі ДНК і до утворення одного негативного супервитка в молекулі ДНК. Його формування має призводити до компенсаторної позитивної надспіралізації ділянок ДНК, прилеглих до нуклеосоми. Утворення нуклеосом здійснюється переважно на негативно надспіралізованій ДНК, а її позитивна надспіралізація супроводжується послабленням структури нуклеосом або їх руйнуванням у присутності додаткових білкових факторів.

Таким чином, відповідно до цієї моделі, елонгуюча РНК-полімераза індукує попереду себе локальну позитивну надспіралізацію молекули ДНК, що полегшує руйнування нуклеосом, які знаходяться в цій зоні. Повторне утворення нуклеосом відбувається в зоні негативно надспіралізованої ДНК позаду транскрибуючої РНК-полімерази.

4.6. Концепція транскриптосоми

Як було показано вище, транскрипційний комплекс, до складу якого входить еукаріотична РНК-полімераза II, влаштований досить складно. З’являється все більше даних на користь того, що транскрипційний комплекс взаємодіє з іншими великими білковими комплексами, які беруть участь, зокрема, у руйнуванні нуклеосом і репарації ДНК. Повний розмір стабільного транскрипційного комплексу, що утворюється при цьому, містить більше 70 поліпептидів і наближається до розміру рибосоми. Такий колосальний розмір транскрипційного комплексу еукаріот, ймовірно, повинен уповільнювати пошук регуляторних послідовностей нуклеотидів ДНК, на яких відбувається ініціація транскрипції. Обговорюється можливість того, що ініціація транскрипції в еукаріот здійснюється в спеціалізованих надмолекулярних комплексах, специфічно пов’язаних з ядерним матриксом. Такі комплекси стали називати

транскриптосомами. Принаймні, один з білкових компонентів, що входять до складу холофермента РНК-полімерази II тварин, а саме *YY1*, виявився ідентичним фактору *NMP*-1, який асоційований з ядерним матриксом. Можливо, саме за участю цього білка відбувається прикріплення транскриптосом до ядерних мембран.

У підсумку необхідно відзначити, що ініціація транскрипції, елонгація транскриптів і термінация синтезу РНК є дуже складно організованими процесами. Структури матричної ДНК і зростаючих ланцюгів РНК впливають на процес звільнення промотора РНК-полімеразами, а також на властивості самих елонгуючих і термінуючих ферментів. При цьому на ініціацію, затримку і припинення транскрипції, розщеплення РНК і її реітеративний синтез, а також на саму термінацію впливають численні білкові фактори. Все це знаходить своє вираження в складності регуляторних процесів, які забезпечують координовану експресію генів на рівні транскрипції.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. Охарактеризуйте головну догму молекулярної біології.
2. Які типи РНК залучені до процесу реалізації генетичної інформації?
3. З яких молекулярних механізмів складається експресія генів?
4. У чому полягає подібність процесів транскрипції і реплікації?
5. У чому полягає відмінність процесів транскрипції і реплікації?
6. З яких стадій складається процес транскрипції?
7. Які функції виконують субодиниці РНК-полімерази бактерій?
8. Які форми РНК-полімераз виявлено в ядрах еукаріот і які функції вони виконують?
9. У чому полягає особливість РНК-полімерази архей?
10. Які фактори транскрипції існують?
11. З яких елементів складаються промотори?
12. У чому полягає особливість структури еукаріотичних промоторів?
13. Які існують фактори ініціації транскрипції еукаріот та яка їх роль?
14. Які процеси відбуваються при переході від ініціації транскрипції до елонгації?
15. Які функції виконують основні регуляторні фактори елонгації транскрипції еукаріот?
16. Яка різниця між ρ-залежною і ρ-незалежною термінацією?
17. Які існують способи індукованого руйнування нуклеосом?

5. Котранскрипційна і посттранскрипційна модифікація РНК

5.1. Загальні особливості і типи РНК

РНК (*рибонуклеїнова кислота*) – клас нуклеїнових кислот, лінійних полімерів нуклеотидів, до складу яких входять залишок фосфорної кислоти, рибоза (на відміну від ДНК, що містить дезоксирибозу) і азотисті основи – аденін, цитозин, гуанін і урацил (детальніше див. розділ 1). У «зрілій» РНК є багато модифікованих основ і цукрів. Всього в РНК налічується близько 100 різних модифікацій нуклеозидів, з яких найчастіша модифікація цукру 2'-О-метилрибоза, а азотистої основи – псевдоуридин (Ψ) і дигідроуридин (D). Роль багатьох модифікацій ще не до кінця вивчено.

Азотисті основи у складі РНК можуть утворювати водневі зв'язки між цитозином і гуаніном, аденіном і урацилом, а також між гуаніном і урацилом. Однак можливі й інші взаємодії, такі як, наприклад, кілька аденінів можуть утворювати петлю, або петля, що складається з чотирьох нуклеотидів, в якій є пара основ аденін-гуанін.

Важлива структурна особливість РНК, що відрізняє її від ДНК – це наявність гідроксильної групи в 2'-положенні рибози. Ця особливість при формуванні вторинної структури дозволяє молекулі РНК існувати в А-, а не В-конформації, характерної для ДНК. Друга особливість, зумовлена наявністю 2'-гідроксильної групи, полягає в тому, що ділянки молекули РНК, які не беруть участь в утворенні подвійної спіралі (конформаційної пластичної ділянки), здатні хімічно «атакувати» інші фосфатні зв'язки та їх розщеплювати. «Робоча форма» одноланцюгової молекули РНК, як і у білків, часто володіє третинною структурою. Третинна структура утворюється на основі елементів вторинної, що утворюється за допомогою водневих зв'язків усередині однієї молекули. Розрізняють декілька типів елементів вторинної структури – стебло-петлі, петлі і псевдовузли (рис. 37).

РНК містяться, головним чином, в цитоплазмі клітин. Ці молекули синтезуються в клітинах усіх клітинних живих організмів, а також містяться у віроїдах та деяких вірусах. У останніх РНК є носієм генетичної інформації (кодує білки оболонки та ферменти вірусів). Віроїди складаються з кільцевої молекули РНК та не містять у собі інших молекул. Існує гіпотеза «світу РНК», згідно з якою РНК виникли до білків й були першими формами життя.

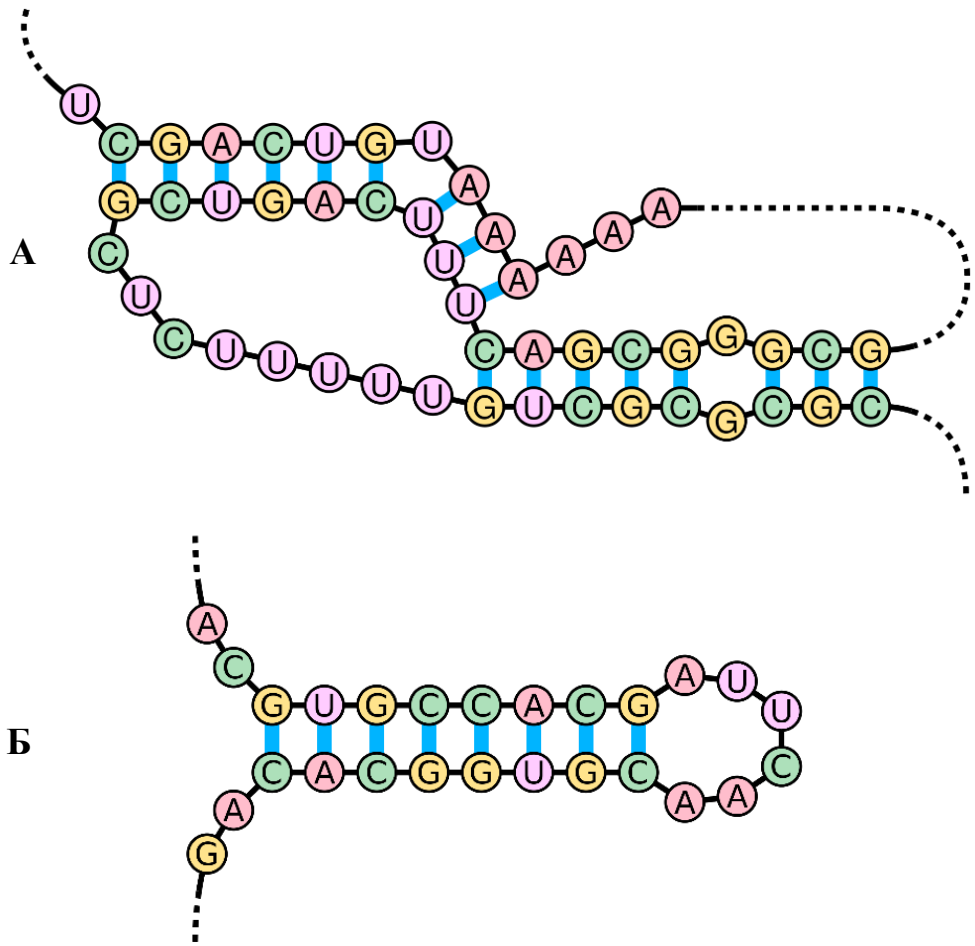


Рис. 37. **Псевдовузол (А) і стебло-петля (шпилька) РНК (Б)**

Клітинні РНК утворюються в ході процесу, що зветься транскрипцією (див. вище). Далі всі РНК піддаються різним модифікаціям, внаслідок яких формується остаточна первинна структура, а також відбувається утворення вторинної та третинної структур. Усі ці процеси надають різним РНК специфічні лише для них функції.

Нині виділяють такі основні родини РНК:

- РНК, що приймають участь у біосинтезі білку (мРНК, рРНК, тРНК, тмРНК);
- РНК, що приймають участь у модифікаціях попередників зрілих РНК (мяРНК, мяцРНК та ін.);
- Регуляторні РНК (аРНК, мікроРНК, міРНК та ін.);
- Паразитичні РНК.

Багато типів РНК у клітині функціонують у вигляді комплексів із білками, які асоціюють з молекулами РНК після їх синтезу або в еукаріот експорту з ядра до цитоплазми. Такі РНК-білкові комплекси

називаються *рибонуклеопротеїдними комплексами* (РНПК) або *рибонуклеопротеїдами* (РНП).

Матрична рибонуклеїнова кислота (мРНК, синонім – інформаційна РНК, іРНК) – РНК, що відповідає за перенесення інформації про первинну структуру білків від ДНК до місць синтезу білків. мРНК синтезується на основі ДНК під час транскрипції, після чого, у свою чергу, використовується у трансляції як матриця для синтезу білків. Тим самим мРНК відіграє важливу роль у «прояві» (експресії) генів.

Довжина типової зрілої мРНК складає від кількох сотень до кількох тисяч нуклеотидів. Найдовші мРНК відмічено у РНК-вмісних вірусів, наприклад пікорнавірусів, проте слід пам’ятати, що у цих вірусів мРНК утворює весь їхній геном.

ДНК нерідко порівнюють з кресленнями для виготовлення білків. Розвиваючи цю інженерно-виробничу аналогію, можна сказати, що, якщо ДНК – це повний набір креслень для виготовлення білків, що знаходиться на зберіганні, то мРНК – тимчасова робоча копія окремого креслення.

Матрична гіпотеза синтезу білку, як і інших полімерних молекул ДНК і РНК, отримала нині повне підтвердження. Її правильність була доведена в експериментах, які забезпечували точне відтворення первинної структури полімерних молекул; причому цей синтез на відміну від безладного хімічного синтезу відрізнявся не лише високою швидкістю і специфічністю, але і спрямованістю самого процесу, в суворій відповідності з програмою, записаною в лінійній послідовності молекули матриці.

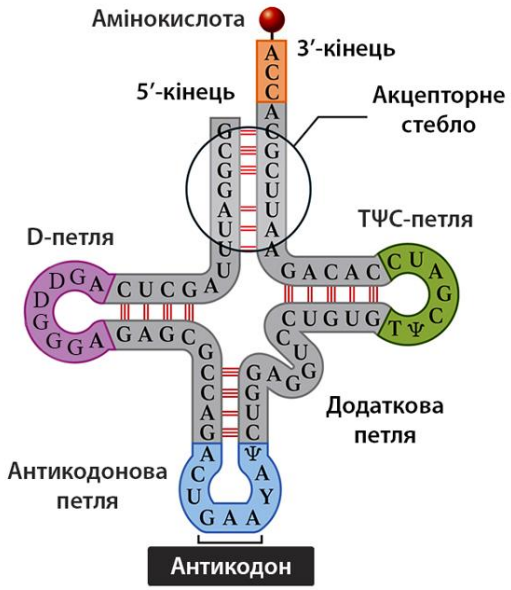
Однак переважна більшість РНК не слугують матрицею при кодуванні білків. Ці некодуючі РНК можуть транскрибувати з окремих генів або бути похідними інтронів. Класичні, добре вивчені типи некодуючих РНК – це транспортні РНК (тРНК) і рибосомальні РНК (рРНК), які беруть участь у процесі трансляції. Існують, також, класи РНК, відповідальні за регуляцію генів, процесинг мРНК, тощо. Крім того, є й молекули некодуючих РНК, здатні каталізувати хімічні реакції, такі, як розрізання та лігування молекул РНК. За аналогією з білками, здатними каталізувати хімічні реакції – ензимами (ферментами), каталітичні молекули РНК називаються *рибозимами*.

Транспортні рибонуклеїнові кислоти (тРНК) – невеликі РНК, які переносять специфічні амінокислоти до місця синтезу пептидного зв’язку в рибосомі. Частка тРНК складає близько 10-15% від загальної

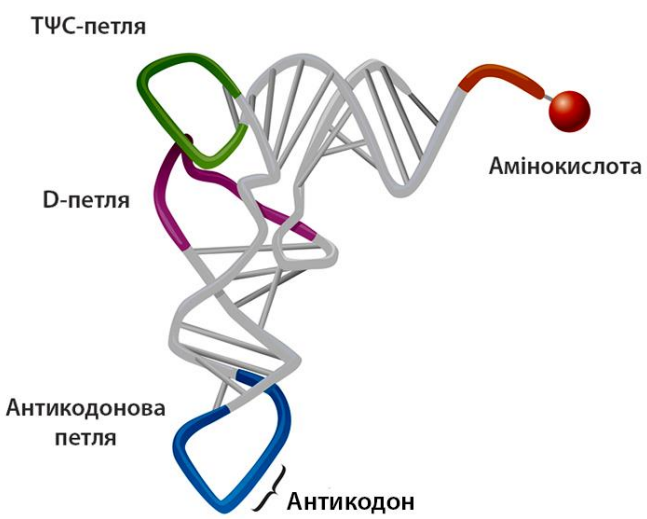
кількості клітинної РНК. До теперішнього часу відкрито 61 варіант тРНК. Для кожної амінокислоти в клітині є принаймні одна специфічна РНК (для ряду амінокислот характерно більше однієї тРНК). Молекулярна маса більшості тРНК коливається від 24 до 29 кДа. Ці молекули мають типову довжину від 73 до 93 нуклеотидів і розміри близько 5 нм. Амінокислоти приєднуються до вільної 3’-ОН-групи кінцевого мононуклеотиду шляхом утворення ефірного зв’язку. Майже усі тРНК мають не лише індивідуально схожі функції, але і консервативну тривимірну структуру (рис. 38).

Вивчення структури тРНК дозволило виявити ряд функціональних ділянок. Так, на 3’-гідроксильному кінці розташовується однакова для усіх тРНК послідовність ССА-ОН, до якої за допомогою ефірного зв’язку приєднується специфічна амінокислота. Зв’язування в основному відбувається через 3’-ОН-групу кінцевого аденілового нуклеотиду, хоча існують дані щодо можливості приєднання амінокислоти і через 2’-ОН-групу. *Тимідин-псевдоуридин-цитидилова* (ТΨС) петля, мабуть, забезпечує зв’язування аміноацил-тРНК з поверхнею рибосоми. *Дигідроуридилова* (D) петля, з протилежного боку, виявилася необхідною як сайт розпізнавання специфічним ферментом – аміноацил-тРНК-синтетазою. Окрім того, є *додаткова* петля, склад якої варіює у різних типів молекул тРНК; її призначення поки невідоме. Є також *антикодонова петля*, що несе триплет (трійка нуклеотидів) – *антикодон*, і розташована на протилежному боці від того кінця, куди приєднується амінокислота. Антикодон є антипаралельним і комплементарним до кодону (триплет мРНК). Антикодон поєднується з кодоном через водневі зв’язки. Це дозволяє розмістити тРНК в положення, що сприяє утворенню чергового пептидного зв’язку між останньою амінокислотою утворюваного білку і амінокислотою, приєднаною до тРНК. Аналіз нуклеотидної послідовності різних тРНК показав, що усі вони містять однаковий 5’-кінцевий нуклеотид – гуанін з вільною 5’-фосфатною групою.

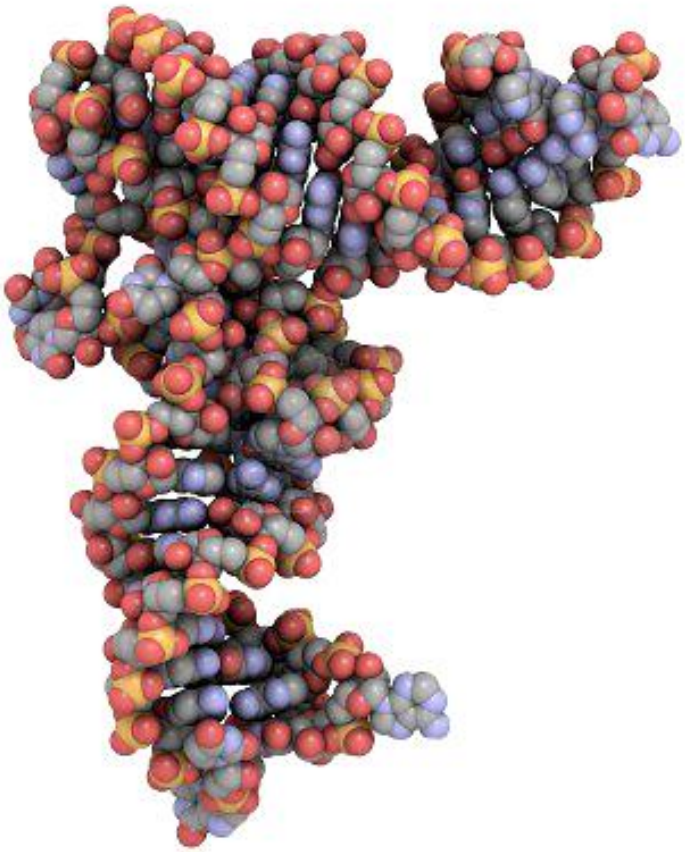
Згортання полімерного ланцюга тРНК призводить до формування дуже компактного глобулярного ядра, з якого під прямим кутом стирчать два виступи, утворюючи тривимірну L-подібну структуру. Ці виступи є короткими подвійними спіралями за типом ДНК, але організовані за рахунок взаємодії ділянок одного і того ж ланцюга РНК.



А



Б



В

Рис. 38. **Будова тРНК**

А – Вторинна структура; Б – Третинна структура; В – Атомарна модель.

Адаптерна функція молекул тРНК полягає в зв’язуванні кожної молекули тРНК зі своєю специфічною функціональною амінокислотою. Але оскільки між тРНК і специфічною

функціональною групою амінокислоти не існує відповідності та спорідненості, цю функцію розпізнавання виконує аміноацил-тРНК-синтетаза, яка розрізняє як молекули тРНК, так і специфічні до них амінокислоти.

Рибосомальні рибонуклеїнові кислоти (рРНК) – каталітична складова рибосом. Основною функцією рРНК є здійснення процесу трансляції – зчитування інформації з мРНК за допомогою адаптерних молекул тРНК і каталіз утворення пептидних зв'язків між амінокислотами з'єднаними з тРНК. рРНК становить до 80% РНК, що виявляється в цитоплазмі еукаріотичної клітини. У цитоплазмі рибосомальні РНК з'єднуються з рибосомальними білками і формують нуклеопротеїн, що називають *рибосомою*. Рибосома приєднується до мРНК і синтезує білок.

На електронно-мікроскопічних зображеннях інтактних рибосом помітно, що вони складаються з двох різних за розмірами субодиниць. Зв'язок між ними відносно слабкий. Зіставлення мас субодиниць становить ~ 2:1. Маси, у свою чергу, виражаються у *константах седиментації* (швидкість осідання в *одиницях Сведберга – S*) при ультрацентрифугуванні. Саме цей параметр і ліг в основу номенклатури рРНК, рибосом і рибосомальних субодиниць. Оскільки коефіцієнти седиментації залежать не тільки від молекулярної маси, але і від форми частинок, седиментаційні коефіцієнти при дисоціації неадитивні: так, наприклад, бактеріальна рибосома має коефіцієнт седиментації 70S, і позначається так само – 70S. При цьому вона дисоціює на субодиниці 50S і 30S.

Рибосомальні РНК (як і рибосоми) прокаріот та еукаріот відрізняються одна від одної, хоча і виявляють значну схожість окремих ділянок послідовностей. 70S рибосома прокаріотів складається з великої 50S субодиниці (побудованої на основі двох молекул рРНК – 5S і 23S) та малої 30S субодиниці (побудованої на основі 16S рРНК). 80S рибосома еукаріот складається з великої 60S субодиниці (побудованої на основі трьох молекул рРНК – 5S, 5,8 S і 28S) та малої 40S субодиниці (побудованої на основі 18S рРНК).

Довжина ланцюгів рибосомних РНК дуже значна. Так, РНК малої субодиниці бактеріальної рибосоми містить більше 1504 нт, а РНК великої субодиниці – 2961 нт. У ссавців, включаючи людину, ці РНК ще більші – 1753 нт і 3628 нт у малій і великій субодиницях відповідно (рис. 39).

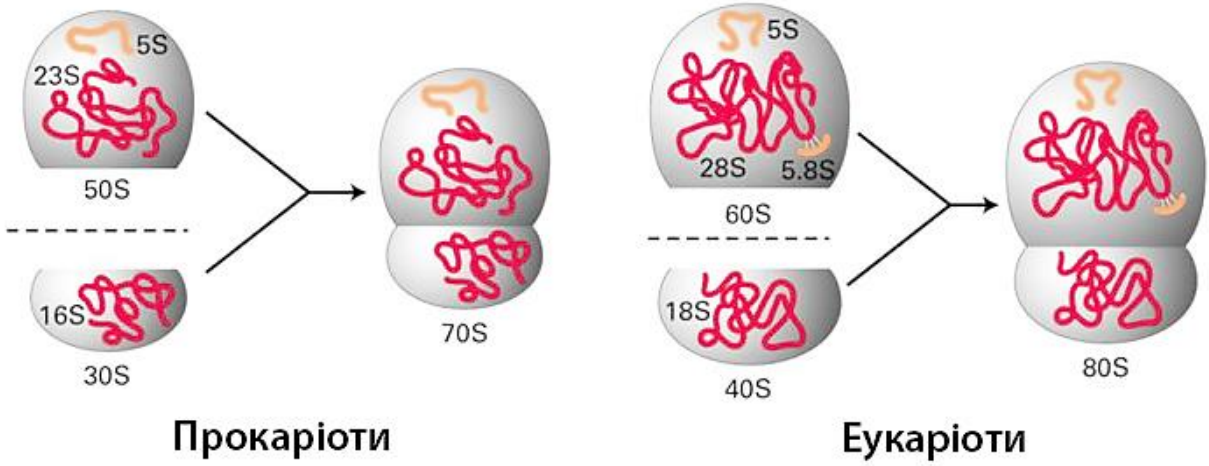


Рис. 39. **Вміст рРНК в рибосомах про- та еукаріот**

У бактерій, архей, мітохондрій і хлоропластів гени 16S, 23S і 5S рРНК зазвичай організовані разом у одному операні. У геномі може бути більше однієї копії оперону. Деякі археї можуть містити значну кількість копій. На відміну від прокаріот, еукаріоти мають багато копій генів рРНК організованих в тандемних повторах (у людини приблизно 300-400 таких повторень).

Незвичайний тип РНК, який діє в якості тРНК і мРНК виявлений у багатьох бактеріях і пластидах та називається **транспортно-матрична рибонуклеїнова кислота** (тмРНК). При зупинці рибосоми на дефектних мРНК без стоп-кодонів тмРНК приєднує невеликий пептид, який направляє білок на деградацію. Частина тмРНК за структурою аналогічна транспортній РНК, і після аміноацетилювання несе залишок аланіну, інша ж кодує короткий пептид – маркер протеолізу (рис. 40). У цитоплазмі тмРНК утворює рибонуклео-протеїдний комплекс з *малим білком B* (англ. *Small Protein B, SmpB*), фактором елонгації *Tu* і рибосомним білком *S*1.

Малі ядерні рибонуклеїнові кислоти (мяРНК, snRNA) – клас малих молекул РНК, які зустрічаються в ядрі клітин еукаріотів. Вони транскрибуються РНК-полімеразою II або РНК-полімеразою III та беруть участь у важливих процесах, таких як сплайсинг (видалення інтронів з попередників мРНК), регуляції транскрипції або РНК-полімерази і підтримці цілосності теломер. Вони завжди асоційовані зі специфічними білками, утворюючи комплекси, що звуться малими ядерними рибонуклеопротеїнами (мяРНП).

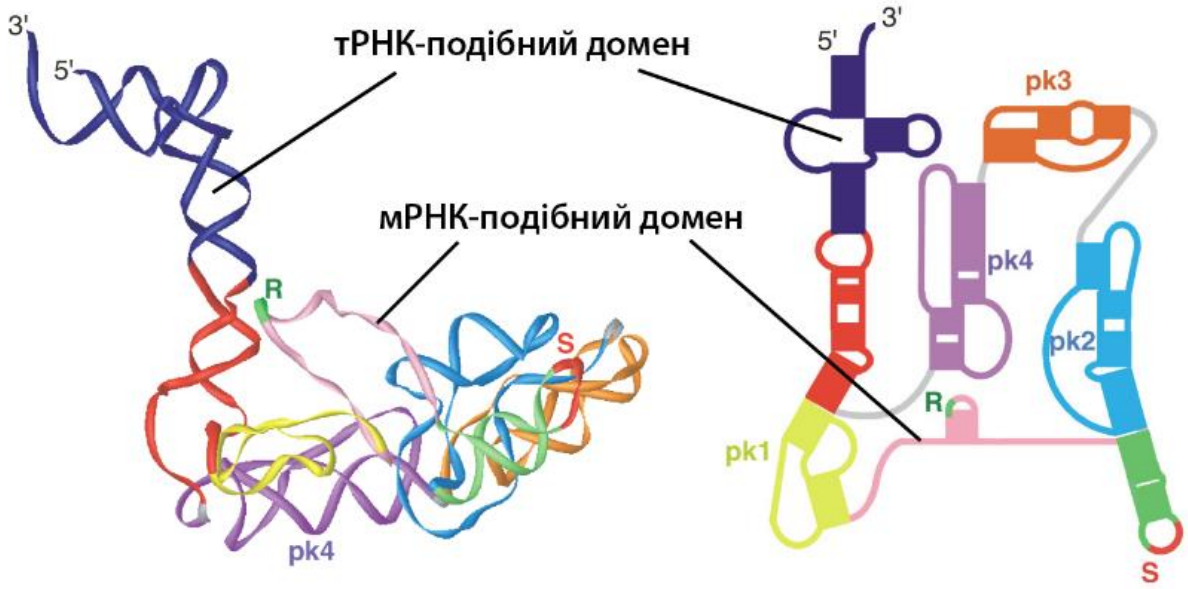


Рис. 40. **Третинна (ліворуч) і вторинна (праворуч) структури тмРНК**
(pk 1-4 – псевдовузли 1-4; R – перший кодон внутрішньої рамки зчитування)

Малі ядерцеві рибонуклеїнові кислоти (мяцРНК, snoRNA) – клас малих РНК, що беруть участь у хімічних модифікаціях (метилюванні і псевдоуридилюванні) рРНК, а також тРНК і мяРНК. Вплив цих модифікацій на функції зрілої рРНК вивчено недостатньо. Ймовірно, такі модифікації не є необхідними, але вони полегшують укладку РНК і взаємодію з рибосомними білками. При цьому, модифікації розташовані виключно в консервативних і функціонально важливих доменах рРНК і схожі у еволюційно віддалених груп еукаріот.

Антисенсові рибонуклеїнові кислоти (аРНК) – це одноланцюгові РНК, які комплементарні клітинним мРНК. Штучні аРНК вводять у клітини для пригнічення трансляції мРНК за рахунок того, що антисенсові РНК комплементарно з'єднуються з мРНК-мішенню і фізично перешкоджають формуванню трансляційного комплексу.

Мікрорибонуклеїнові кислоти (мікроРНК) – дволанцюгові молекули РНК довжиною 21-22 нт, що беруть участь у регуляції синтезу білків шляхом РНК-інтерференції (система контролю активності генів еукаріотичних клітин, що здійснюється за допомогою коротких молекул РНК). Ці РНК відіграють важливу роль у регуляції трансляції та деградації мРНК. Регулювання здійснюється шляхом комплементарного зв'язування мікроРНК з частково

комплементарними сайтами в нетрансльованих ділянках мРНК-мішені. Також є дані що вказують на можливість взаємодії мікроРНК безпосередньо з ДНК генів у процесі РНК-залежного метилювання ДНК, яке є одним з ключових механізмів репресії генів, алельного вимкнення і запобігання активності транспозонів. Однак відкриті мікроРНК, які навпаки підсилюють експресію генів.

Нині мікроРНК виявлено у тварин і рослин. Мішенями мікроРНК є значне число генів – щонайменше третина генів геному. Раніше вважалося, що мікроРНК притаманні лише багатоклітинним організмам, однак, наявність цієї групи молекул вже виявлено і у одноклітинних еукаріот. Це може свідчити про більший еволюційний вік мікроРНК, ніж раніше передбачалося.

МікроРНК відіграють важливу роль у пригніченні експресії інших генів та у регуляції розвитку, особливо у визначенні часу морфогенезу та підтриманні недиференційованих або не повністю диференційованих типів клітин, таких як стовбурові клітини.

Малі інтерферуючі рибонуклеїнові кислоти (міРНК) – це клас дволанцюгових РНК, довжиною 20-25 нуклеотидів, з двома неспареними виступаючими нуклеотидами на 3’-кінцях. Короткі інтерферуючі РНК з такою структурою утворюються в результаті активності ферменту Dicer (рибонуклеаза з родини РНКази III), субстратами якого є довгі дволанцюгові РНК або короткі РНК, що містять шпильки. Малі інтерферуючі РНК можуть бути штучно введені в клітини для нокдауну певного гена. При цьому експресія практично будь-якого гена з відомою послідовністю нуклеотидів може бути цілеспрямовано змінена. Дана властивість робить короткі інтерферуючі РНК зручним інструментом для дослідження функцій генів і вивчення мішеней лікарських засобів.

Рибозими. Існування організмів основних трьох доменів життя засновані на обміні речовин. Усі біохімічні реакції метаболізму відбуваються з необхідними для забезпечення життя швидкостями тільки завдяки високоспецифічним каталізаторам, які створені еволюцією. Упродовж багатьох десятиліть біохіміки були упевнені, що біологічний каталіз завжди і всюди здійснюється білками, які називають ферментами, або ензимами. Тим не менш, у 1967 році було вперше висунуте припущення, що РНК може бути каталізатором. Воно ґрунтувалося на тому, що РНК може утворювати складну вторинну структуру. Зараз відомо, що багато молекул РНК мають також складну третинну структуру.

Вперше каталітична активність РНК була виявлена в 1980-му році. Такі РНК-каталізатори були названі *рибозимами* – (англ. *ribozyme – ribonucleic acid enzyme*), що також називається РНК-ферментом або каталітичною РНК – молекула РНК, що каталізує хімічні реакції. Багато природних рибозимів каталізують або гідроліз одного із своїх власних фосфодиефірних зв'язків, або гідроліз фосфодиефірних зв'язків інших молекул РНК. Крім того, рибозими входять до складу рибосом, де вони каталізують амінотрансферазну активність.

Та обставина, що РНК може містити спадкову інформацію, дозволило висунути припущення, що в давнину РНК використовувалася і в якості генетичного матеріалу, і в якості каталізаторів та структурних компонентів клітини, а згодом ці ролі були перерозподілені між ДНК і білками. Ця гіпотеза зараз відома як «*Гіпотеза світу РНК*».

Якщо РНК були першими молекулярними машинами, що використалися в ранніх живих клітинах, то рибозими, існуючі сьогодні (наприклад, апарат рибосоми), можуть вважатися живими копалинами – зразками живих істот, що складалися з нуклеїнових кислот.

Мультифункціональність РНК. Огляд знань про РНК дозволяють говорити про багатофункціональність цього полімеру в живій природі. Можна дати наступний список основних відомих функцій РНК:

Реплікативна функція: структурна можливість копіювання (реплікації) лінійних послідовностей нуклеотидів на основі послідовності комплементу. Функція реалізується при вірусних інфекціях і аналогічна головній функції ДНК в життєдіяльності клітинних організмів – реплікації генетичного матеріалу;

Кодуюча функція: програмування білкового синтезу лінійними послідовностями нуклеотидів. Деякі високо структуровані РНК беруть участь у синтезі білка клітини, наприклад, транспортні РНК служать для впізнавання кодонів та доставки відповідних амінокислот до місця синтезу білка, а матричні РНК служать структурною і каталітичною основою рибосом;

Регуляторна функція: низькомолекулярні РНК є компонентами окремих регуляторних механізмів в клітині. Так, малі ядерні РНК беруть участь під час процесингу різних РНК, регуляціїї рівня експресії окремих генів, а також в інших процесах.

Структуроутворююча функція: формування унікальних тривимірних структур. Для одноланцюгових РНК характерні різноманітні просторові структури, в яких частина нуклеотидів одного і того ж ланцюга спарені між собою. Компактно згорнуті молекули малих РНК принципово подібні до тривимірних структур глобулярних білків, а довші молекули РНК можуть утворювати і більші біологічні частки або їх ядра;

Функція впізнавання: високоспецифічні просторові взаємодії з різними макромолекулами і з малими лігандами. Ця функція заснована на здатності полімеру згортатися унікальним чином і формувати специфічні тривимірні структури. Функція пізнавання є базою специфічного каталізу;

Каталітична функція: специфічний каталіз хімічних реакцій рибозимами. Ця функція полягає в тому, що молекули РНК входять до складу деяких ферментів (наприклад, теломерази), а у окремих РНК виявлена власна ензиматична активність, здатність вносити розриви в інші молекули РНК або, навпаки, «склеювати» два РНК-фрагменти.

У підсумку варто відмітити, що РНК здатна виконувати функції обох принципово важливих для життя полімерів – ДНК і білків. Недивно, що перед наукою і постало питання: а чи не могло виникнення і самодостатнє існування світу РНК передувати появі життя в її сучасній ДНК-білковій формі?

5.2. Процесинг попередників РНК у бактерій

Транскрипція у будь-якого організму є першим етапом реалізації генетичної інформації – експресії генів. Однак первинні транскрипти, як правило, являють собою лише попередники зрілих РНК, які перед виконанням своїх функцій повинні зазнати численні зміни.

Первинні транскрипти більшості бактеріальних генів, які кодують білки, функціонують у якості мРНК без подальшої модифікації. Дійсно, трансляція мРНК часто починається навіть до завершення синтезу 3’-кінця транскрипту. Для решти мРНК (1-40%) характерне поліаденілювання їх 3’-кінцевих послідовностей.

Поліаденілювання – це процес приєднання до 3’-кінця транскрипту від 14 до 16 нуклеотидів. У бактерій цей процес каталізують принаймні дві полі-А-полімерази, які здійснюють незалежне від матриці послідовне приєднання залишків аденілату. Більш детальний опис цього процесу наведений у пункті 5.3 даного підручника.

Незважаючи на те, що поліаденілювання РНК інтенсивно досліджується більше з 1980-х років, його функціональна роль навіть для еукаріот повністю не з'ясована. Ще менше відомо про роль поліаденілювання РНК у бактерій. Однак з наявних даних вже зрозуміло, що вплив поліаденілювання РНК на молекулярні процеси бактеріальної клітини дуже різноманітний і поширюється, принаймні, на контроль числа копій бактеріальних плазмід, стабільність мРНК (дестабілізувати транскрипти за наявності у них 3'-кінцевих шпильок і стабілізувати «лінійні» форми мРНК) і її трансляцію.

Зовсім інша ситуація спостерігається для молекул рРНК і тРНК. У цьому випадку окремі і спільні кластери рРНК- і тРНК-генів часто транскрибуються з утворенням єдиного ланцюга РНК. І хоча транскрипція цих генів завжди починається на певних промоторах і закінчується на певних термінаторах, для утворення зрілих функціональних форм повинні відбутися специфічні надрізання первинних РНК-транскриптів і їх модифікація або просто процесинг РНК. Механізми процесингу рРНК і тРНК та ферменти, за допомогою яких він здійснюється, найбільш повно вивчено в *E.coli*.

Зокрема, у геномі *E.coli* ідентифіковано сім дискретних транскрипційних одиниць, які кодують рРНК. Кожна така транскрипційна одиниця – це молекула РНК, довжиною ~ 5000 нт, містить по одній копії послідовностей для 5S-, 16S- і 23S-рРНК. Транскрипція в цьому регіоні здійснюється в напрямку 16S → 23S → 5S. Також, окрім цих трьох послідовностей транскрипти рРНК містять вставки одного-двох тРНК-генів. Вони зазвичай лежать між генами рРНК або в 3'-кінцевих спейсерних сегментах. Спейсерні ділянки, які фланкують окремі рРНК, містять симетрично комплементарні послідовності нуклеотидів. Вони формують дуплексне стебло шпильки, в петлі якої міститься та чи інша рРНК (рис. 41).

Для утворення функціонально зрілих молекул РНК необхідно їх відокремити одна від одної. До або під час такого розрізання відбувається модифікація специфічних основ у спейсерних послідовностях, а також у рРНК- і тРНК-ділянках.

Початкове розщеплення первинних транскриптів на фрагменти здійснює ендонуклеаза РНКаза III. Її мішенями слугують комплементарні дуплекси РНК. РНКаза III вносить розриви в ці дволанцюгові стебла, в результаті чого утворюються окремі ланцюги рРНК. Потім зайві нуклеотиди спейсерних послідовностей видаляються, можливо за допомогою тієї ж самої РНК-екзонуклеази.

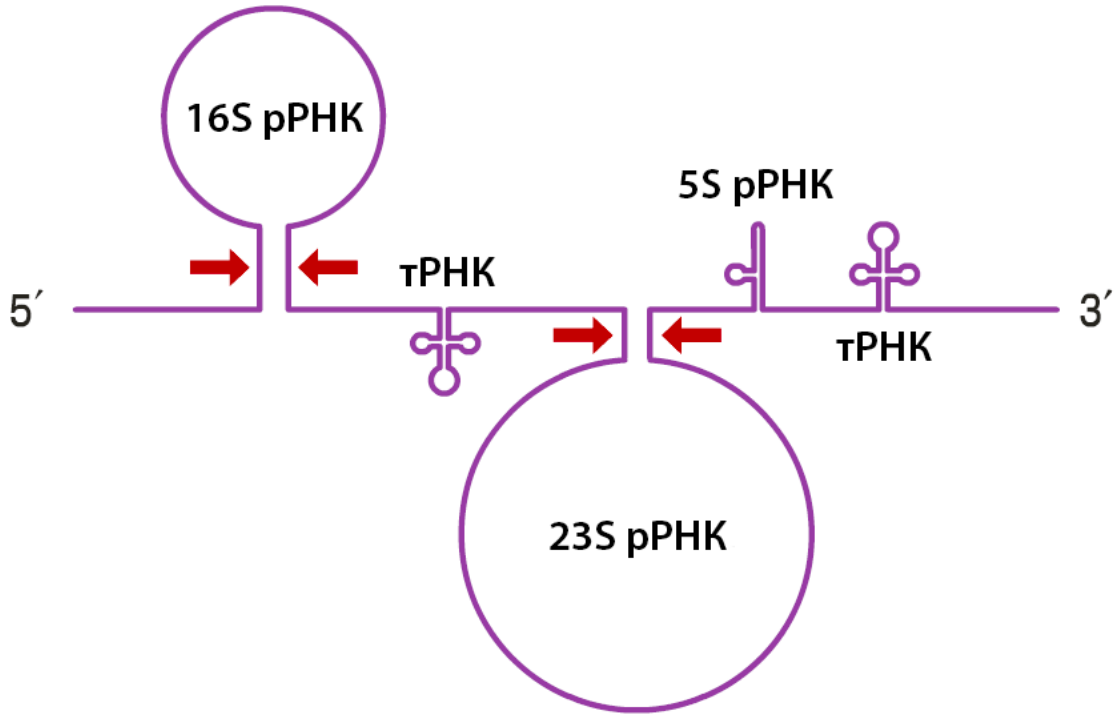


Рис. 41. **Первинний транскрипт з рРНК**
(червоними стрілами позначені місця розрізання РНКази III)

Незважаючи на те, що деякі тРНК знаходяться всередині транскрипційних одиниць рРНК і експресуються спільно з генами рРНК, основна частина тРНК-генів представлена поодинокими генами або об'єднана в кластери. Одні кластери містять множинні повтори одних і тих же генів, інші – різні і неспоріднені тРНК-гени. У деяких випадках кожен кластер транскрибується як одна велика молекула РНК, яка піддається процесингу з послідовним вищепленням зрілих тРНК-фрагментів. Для утворення зрілої функціональної тРНК, мабуть, повинні відбутися специфічна модифікація основ і приєднання одного, двох або всіх трьох нуклеотидів CCA до 3'-кінця.

Незалежно від того, чи містить первинний транскрипт одну або більше тРНК-послідовностей або ці послідовності містяться в спейсерних ділянках рРНК, 5'-кінці всіх тРНК утворюються за участю однієї ендонуклеази – РНКази Р (складається з білка і РНК довжиною 377 нт). Відмінною особливістю РНКази Р є те, що розміщення сайту розщеплення для неї залежить від правильного укладання молекули тРНК. Зміни нуклеотидної послідовності тРНК, які не приводять до порушення її укладання, не впливають на процесинг 5'-кінця. Мабуть, РНКаза Р розпізнає характерну структуру тРНК у попереднику та відщеплює лідерну або спейсерну послідовність, що розташована перед 5'-кінцем зрілої послідовності тРНК.

3’-кінці тРНК утворюються внаслідок декількох актів. Досі неідентифікована ендонуклеаза, яка розщеплює РНК-попередник у тому місці шпильки, де знаходиться 3’-кінець зрілої тРНК. Тим не менш, після цієї дії інша ендонуклеаза, РНКаза D, завершує утворення правильного 3’-кінця (рис. 42). У деяких випадках екзонуклеазне розщеплення припиняється точно на кінці CCA-3’ зрілої тРНК. В інших випадках спочатку під дією екзонуклеази утворюється кінець, який слугує затравкою. Потім до нього тРНК-нуклеотидилтрансфераза додає один або більше інваріантних кінцевих нуклеотидів.

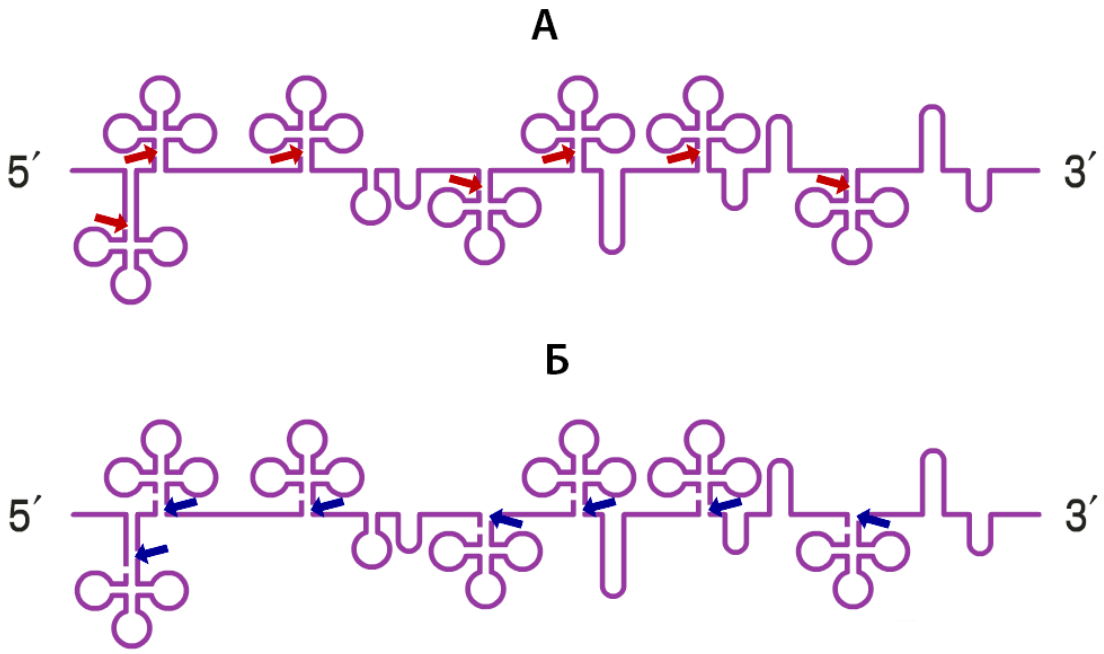


Рис. 42. **Вирізання тРНК з первинних транскриптів**
(А – утворення 5’-кінця; Б – утворення 3’-кінця)

Зрілі тРНК не тільки мають характерну конформацію, але й містять модифіковані нуклеотиди. Більшість з таких модифікацій виявляються суттєвими для виконання деяких фізіологічних функцій тРНК. Сьогодні охарактеризовані лише небагато з цілої армії ферментів, які каталізують величезну кількість реакцій модифікацій.

5.3. Процесинг попередників мРНК еукаріот

Процесингові модифікації попередників еукаріотичних мРНК порівняно з тими ж змінами первинних транскриптів прокаріот більш різноманітні і грають велику роль в регуляції експресії їх генів. Майже всі ці реакції відбуваються в ядрі у процесі синтезу РНК або відразу ж після його завершення. Перш за все, до 5’-кінцевого нуклеотиду

більшості пре-мРНК приєднуються *кеп-групи*, що супроводжується метилюванням одного або декількох кінцевих нуклеотидів. Така зміна в більшості випадків необхідна для стабілізації та експорту відповідних мРНК з ядра до цитоплазми, а також їх ефективної трансляції рибосомами. В основному ті ж функції, мабуть, виконує і *поліаденілювання* 3’-кінцевих послідовностей мРНК, які готуються до цього етапу шляхом специфічного відщеплення надлишкових 3’-кінцевих нуклеотидів попередника. Крім того, інтрони, що містяться в гігантських первинних попередниках мРНК, з високою точністю віддаляються в результаті *сплайсингу*.

Кепування. Відразу ж після ініціації транскрипції найчастіше відбувається котранскрипційна модифікація 5’-кінця мРНК, яка супроводжується приєднанням так званої *кеп-групи* та подальшими її змінами. Кепування є однією з найбільш ранніх модифікацій зростаючих ланцюгів РНК і відбувається після полімеризації її перших 20-30 нуклеотидів. Така котранскрипційна модифікація мРНК не тільки її стабілізує в цитоплазмі, а й необхідна для ефективного сплайсингу пре-мРНК, її поліаденілювання та експорту з ядра, а також у більшості випадків для її коректної трансляції. Кепуванню піддаються тільки транскрипти РНК-полімерази II.

Транскрипція в еукаріот і прокаріот починається, як правило, з пуринових рибонуклеозидтрифосфатів (ATP, або GTP), причому трифосфатна група зберігається у складі мРНК. Кепування починається з приєднання до зростаючого ланцюга мРНК молекули GMP, яка виявляється пов’язаною з 5’-кінцевим пурином 5’-5’-трифосфатною групою. У результаті нуклеотид кеп-групи розташовується в зворотній орієнтації по відношенню до решти нуклеотидів мРНК.

Далі здійснюється модифікація кеп-групи. Спочатку відбувається метилування кеп-гуаніну у положенні 7. Така структура характерна для одноклітинних еукаріот і отримала назву *кепа 0-го типу*. Слідом за цим у більшості багатоклітинних еукаріот відбувається метилування 2’-ОН-групи рибози першого нуклеотиду мРНК. Така форма кепа більшості еукаріот отримала назву *кепа 1-го типу* і є основною. Окрім того, у деяких видів еукаріот відбувається метилування 2’-ОН-групи рибози другого нуклеотиду мРНК з утворенням структури, що отримала назву *кепа 2-го типу* (рис. 43). Якщо ця реакція має місце, то частка мРНК, які містять кеп 2-го типу, складає 10-15% від загальної популяції молекул мРНК.

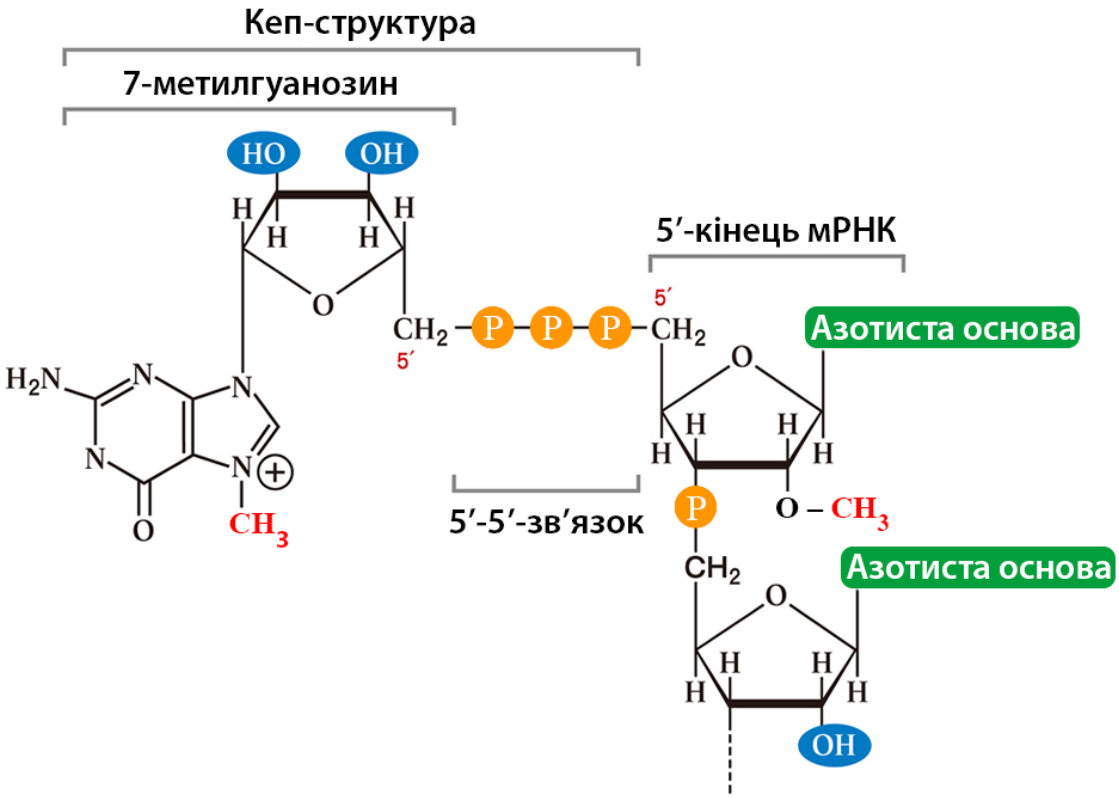


Рис. 43. **Хімічна будова кеп-групи 1-го типу**

Інша структура кеп-групи характерна для деяких зрілих некодуючих РНК, зокрема малих ядерних РНК, збагачених урацилом (U-мяРНК). У цьому випадку залишок гуанозіна кеп-групи двічі метилований в положенні 2 на додаток до звичайної метильної групи в положенні 7. Таке гіперметилування U-мяРНК необхідно для імпорту зібраних U-мяРНП-частинок до ядра і, можливо, запобігає залученню U-мяРНК в трансляцію.

Поліаденілювання. Одним з обов'язкових етапів дозрівання попередників еукаріотичних мРНК є процесинг їх 3'-кінцевих послідовностей, що тісно пов'язаний з приєднанням кеп-групи. Дозрівання 3'-кінця мРНК є двоетапним процесом. Спочатку попередник втрачає 3'-кінцеву некодуючу послідовність, після чого, як правило, до 3'-кінця приєднується полі-А-послідовність шляхом ферментативної полімеризації залишків АМР.

Місця відщеплення 3'-кінцевих некодуючих послідовностей в мРНК тварин зазвичай позначені спеціальними комбінаціями нуклеотидів (рис. 44). Є, принаймні, дві такі комбінації, які утворюють *сайти поліаденілювання*, або *полі-А-сайти*. Один з них – 5'-AAUAAA-3' розташований на відстані 15-ти нуклеотидів перед місцем розрізання і практично однаковий в усіх досліджених організмах.

Інший, менш вивчений сайт розташовується відразу ж за першим і часто складається з декількох залишків U або збагачений GU. Сайт розщеплення РНК визначається відстанню між цими двома елементами з переважним розщепленням в сайті 5’-CA-3’.

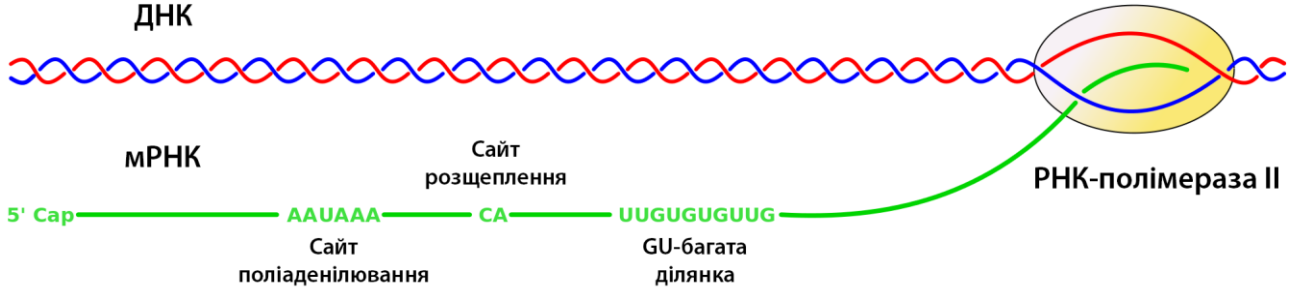


Рис. 44. **Схематичне розташування елементів поліаденілювання пре-мРНК**

З послідовністю AAUAAA взаємодіє фактор *CPSF* (англ. *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), який визначає специфічність розщеплення і поліаденілювання РНК. З GU-багатою ділянкою зв’язується гетеродимерний білковий фактор *CSTF* (англ. *Cleavage Stimulating Factor*), стимулюючий тільки розщеплення. Окремо фактори *CPSF* і *CSTF* лише слабко взаємодіють з РНК. Проте їх одночасна присутність призводить до утворення міцного комплексу. У розщепленні РНК безпосередньо беруть участь ще два фактори: *CF*I і *CF*II (англ. *Cleavage Factors*). Як і в попередньому випадку, вони лише разом утворюють міцний комплекс з РНК. Окрім того для процесингу 3’-кінця мРНК необхідна також наявність полі-А-полімерази – ферменту, який безпосередньо здійснює поліаденілювання. Присутність цього ферменту потрібна не для самого акту розщеплення РНК, а лише для стабілізації білкового комплексу.

Процес поліаденілювання починається відразу ж після розщеплення РНК і відбувається дуже швидко. Таке сполучення двох реакцій необхідне для захисту 3’-кінцевих послідовностей РНК від деградації нуклеазами. При цьому сам акт поліаденілювання вимагає наявності фактора *CPSF*, а також полі-А-зв’язуючого білка *PAB* II (англ. *Poly-A-Binding Protein* II), який пов’язує поліаденілюючий комплекс з РНК після приєднання до неї, принаймні, десяти залишків А. У присутності цих двох факторів полі-А-полімераза відразу синтезує полі-А-послідовність зі швидкістю ~ 25 нт/с до тих пір, поки довжина полі-А-хвоста не досягне ~ 250 нуклеотидів. Після цього процесивна (безперервна) реакція припиняється, і відбувається

повільне дистрибутивне приєднання залишків АМР різними молекулами полі-А-полімерази. Припускають, що елонгуючий білковий комплекс розпізнає довжину синтезованої полі-А-послідовності за участю фактора *PAB* II. За цим механізмом зв'язування певного числа молекул *PAB* II з полі-А припиняє її елонгацію.

Нині відомо декілька винятків вищеописаної схеми поліаденілювання. Так, гістонові мРНК тварин і мРНК деяких вірусів, попередники яких розщеплюються за допомогою високоспецифічних ендонуклеаз не поліаденілюються. Залишаються без полі-А-хвоста і U-мяРНК. У цьому випадку первинний транскрипт вже з кеп-групою експортується з ядра до цитоплазми. Там відбувається видалення надлишкової послідовності на 3'-кінці, яке в ядрі блоковано специфічним білковим інгібітором TPI (3'-*Terminal Processing Inhibitor*).

Сплайсинг. До початку 70-х років XX століття було виявлено, що цитоплазматичні мРНК набагато коротші своїх ядерних двійників – гяРНК (пре-мРНК), і це незважаючи на те, що і ті й інші мали 5'-кепи і 3'-полі-А-хвости. Виникало закономірне питання, – яким чином гяРНК могли бути вкорочені при збереженні характерних структур на обох кінцях полімерів. Відповідь було отримано в 1977 році після виявлення явища *сплайсингу* молекул РНК. Більшість структурних генів вищих еукаріот (і деякі у нижчих еукаріот) в геномі закодовані у формі *мозаїчної інтрон-екзонної структури*. Ділянки послідовностей, які кодують білки, називаються *екзонами*. Вони розділені вставними неінформативними послідовностями, що іменуються *інтронами*. Останні можуть мати лінійні розміри від 75 до більш, ніж 10000 нт. Таким чином, первинний транскрипт є копією повного гена, що включає інтрони і екзони: інтрони ж потім видаляються під час сплайсингу пре-мРНК.

Послідовності елементів пре-мРНК, які спрямовують видалення інтронів, являють собою короткі ділянки на кожному з кінців інтрону. Практично завжди першими двома нуклеотидами в інтроні є пара GU. Цей кінець називається *донором сплайсингу* або 5'-*кінцевим сайтом сплайсингу*. Два протилежних нуклеотиди в інтроні – AG – називаються *акцептором сплайсингу* або 3'-*кінцевим сайтом сплайсингу*. Фланкуючі послідовності екзонів також проявляють певний ступінь консервативності. Окрім того, в інтроні присутній ключовий аденіловий нуклеотид, який розташований в межах

консервативної послідовності 5’-UACUA**A**C-3’ на відстані 30-ти нуклеотидів від акцептору сплайсингу (рис. 45). Цей залишок аденозину називається *точкою розгалуження інтрону* (англ. *Branch Point*).

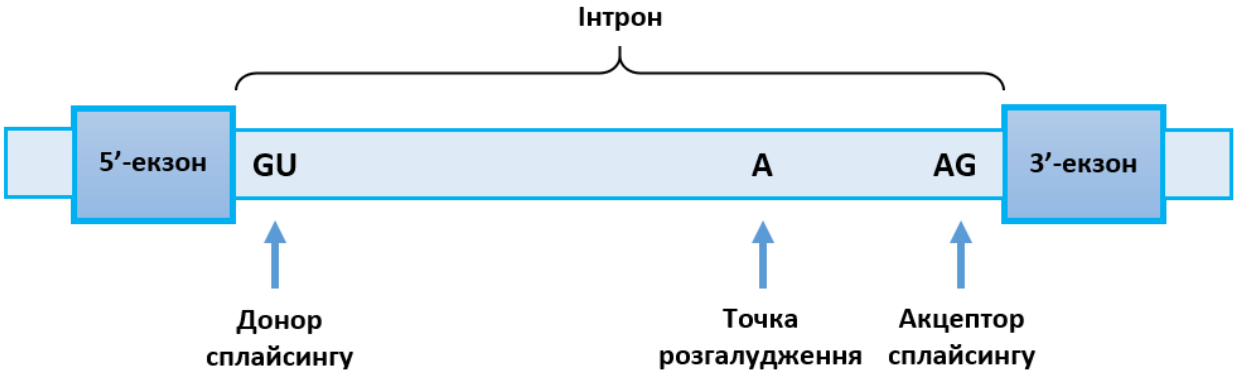


Рис. 45. **Елементи пре-мРНК, які залучені до сплайсингу**

Встановлено, що сплайсинг відбувається в два етапи. У ході першого етапу відбуваються реакції трансетеризації під час якої 5’-кінцевий сайт сплайсингу звільняється від екзону і з’єднується з 2-ОН-групою рибози аденіловим нуклеотидом точки розгалуження. Таким чином формується незвичний 2’-5’-зв’язок, тим часом як традиційні 3’-5’-зв’язки продовжують з’єднувати цей аденін із сусідніми нуклеотидами. У результаті цієї реакції інтрон утворює внутрішньомолекулярну структуру типу «ласо» (англ. *Lariat*). Потрібно відзначити, що в цьому випадку точка розгалуження інтрона і 5’-сайт сплайсингу повинні бути фізично зближені. Це стає можливим завдяки участі у цьому процесі мяРНК.

Під час другого етапу 3’-кінець 5’-екзону, що був вивільнений попередньо, впливає на акцептор сплайсингу, що призводить до ковалентного з’єднання 5’- і 3’-екзонів, завершуючи тим самим відщеплення інтрону. Вільна петля інтрону перетворюється згодом у лінійну молекулу та під дією нуклеаз швидко руйнується (рис. 46).

Реакції сплайсингу здійснюються за участю великого РНК-білкового комплексу, що називається сплайсомою. Вона за своїми розмірами схожа з рибосомою. Ключовими компонентами сплайсоми є п’ять малих ядерних рибонуклеопротеїдних субодиниць – мяРНП (snRNP – «*Snurps*»). Кожна мяРНП-субодиниця це комплекс мяРНК з 10-20 білками. У реакціях сплайсингу пре-мРНК беруть участь мяРНК, що позначаються символами U1, U2, U4, U5 і U6. Деякі з білків мяРНП-субодиниць входять до складу їх усіх як, наприклад, сім Sm-білків. Інші білки, які містяться в мяРНП-комплексах, проявляють

більш високу специфічність і можуть бути пов’язані тільки з певною мяРНК. У цілому сплайсоми містять багато додаткових білків.

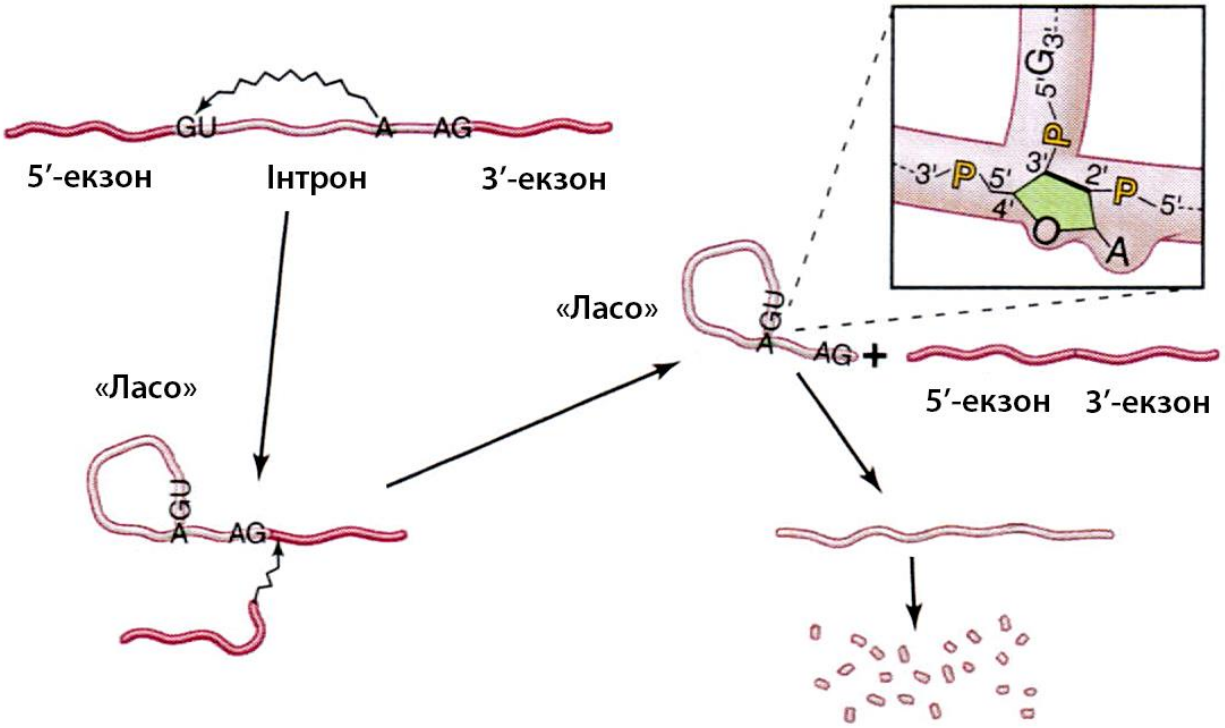


Рис. 45. **Механізм сплайсингу**

Взаємодії, які виникають між пре-мРНК і молекулами мяРНК, а також поміж різними мяРНК за рахунок з’єднання їх основ у сукупності зі стабілізаційною функцією білків, змушують 5’- і 3’-сайти сплайсингу, а також точку розгалуження інтрону набувати відповідної просторової структури, яка необхідна для проходження сплайсингу. При цьому кожна мяРНП-субодиниця виконує конкретну, узгоджену в часі функцію.

Формування сплайсоми починається з приєднання мяРНК U1 до 5’-кінцевого сайту сплайсингу через з’єднання її основ з послідовністю сайту GU. Потім мяРНК U2 розпізнає область з точкою розгалуження інтрона і приєднується до неї. Так формується А-комплекс, (пре-мРНК, U1-мяРНК і U2-мяРНК), який потім з’єднується з іншим потрійним комплексом, який містить малі ядерні РНК U4, U5 і U6. Така структура низивається В-комплексом. U5-мяРНК утримує разом кінці сусідніх екзонів у складі пре-мРНК. U4-мяРНК діє як шаперон (структура, яка залучена до збирання і/або розбирання молекулярних комплексів) і, вивільняючись з В-комплексу також витісняє U1-мяРНК. Внаслідок цього утворюється активний В*-комплекс. Мала ядерна РНК U6 утримуючи U2-мяРНК, забезпечує тим самим

наближення аденілового нуклеотиду з області точки розгалуження до 5’-кінцевого сайту інтрона. Після чого відбувається утворення «ласо», потім інтрон повністю вирізається, а екзони зшиваються. Вважають, що мяРНК U6 при цьому грає центральну роль (рис. 47).

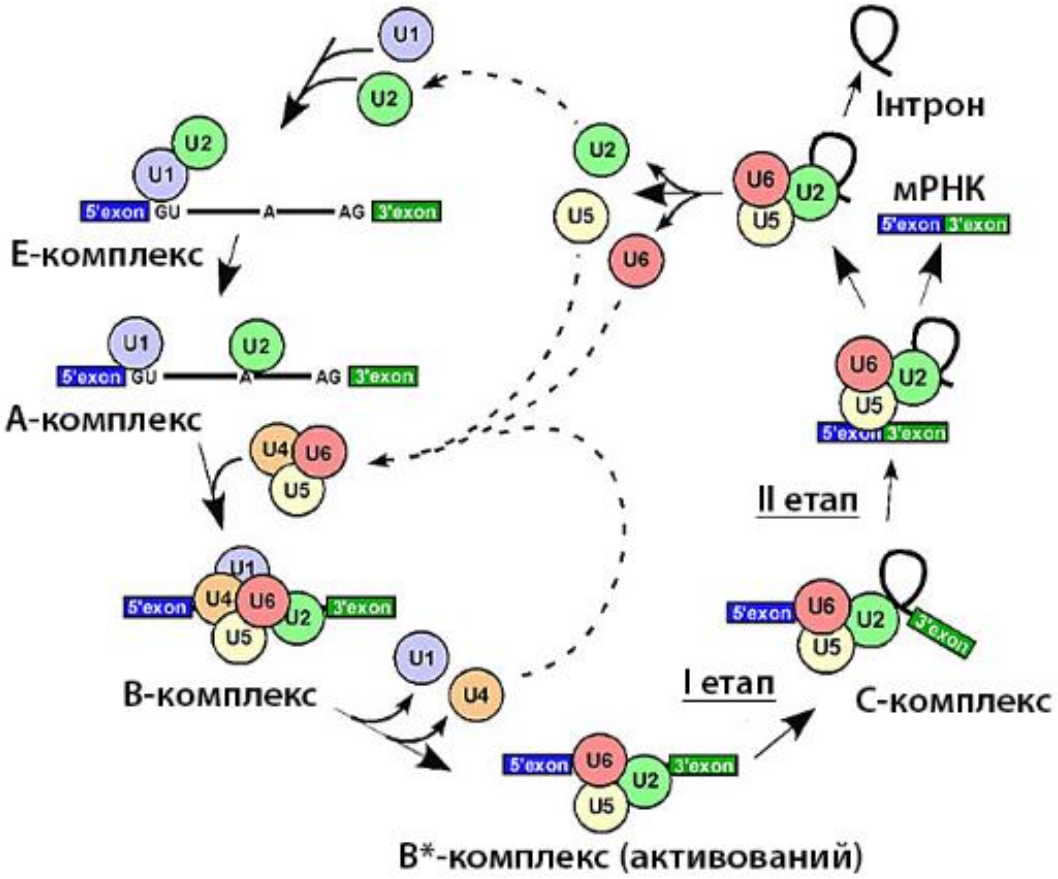


Рис. 47. **Принципова схема участі мяРНК під час сплайсингу мРНК**

Однак не всі інтрони для свого видалення вимагають функціонування такого складного апарату. Зокрема, для вирізання деяких інтронів не потрібно ніяких додаткових компонентів, крім самих попередників РНК. Останній процес отримав назву *аутосплайсинга* (англ. *Self-Splicing*). Механізми хімічних реакцій, що відбуваються в ході аутосплайсингу, подібні до аналогічних при функціонуванні сплайсоми.

Альтернативний і транс-сплайсинг. Встановлено, що сплайсинг надає клітині можливість «підганяти» структуру генних продуктів до своїх ситуативних потреб. Механізм, що дозволяє це здійснювати називається *альтернативний сплайсинг*. Суть цього явища полягає у використанні різних донорних і/або акцепторних сайтів сплайсингу, що передбачає утворення з одного гена декількох молекул мРНК з різним набором екзонів (рис. 48).

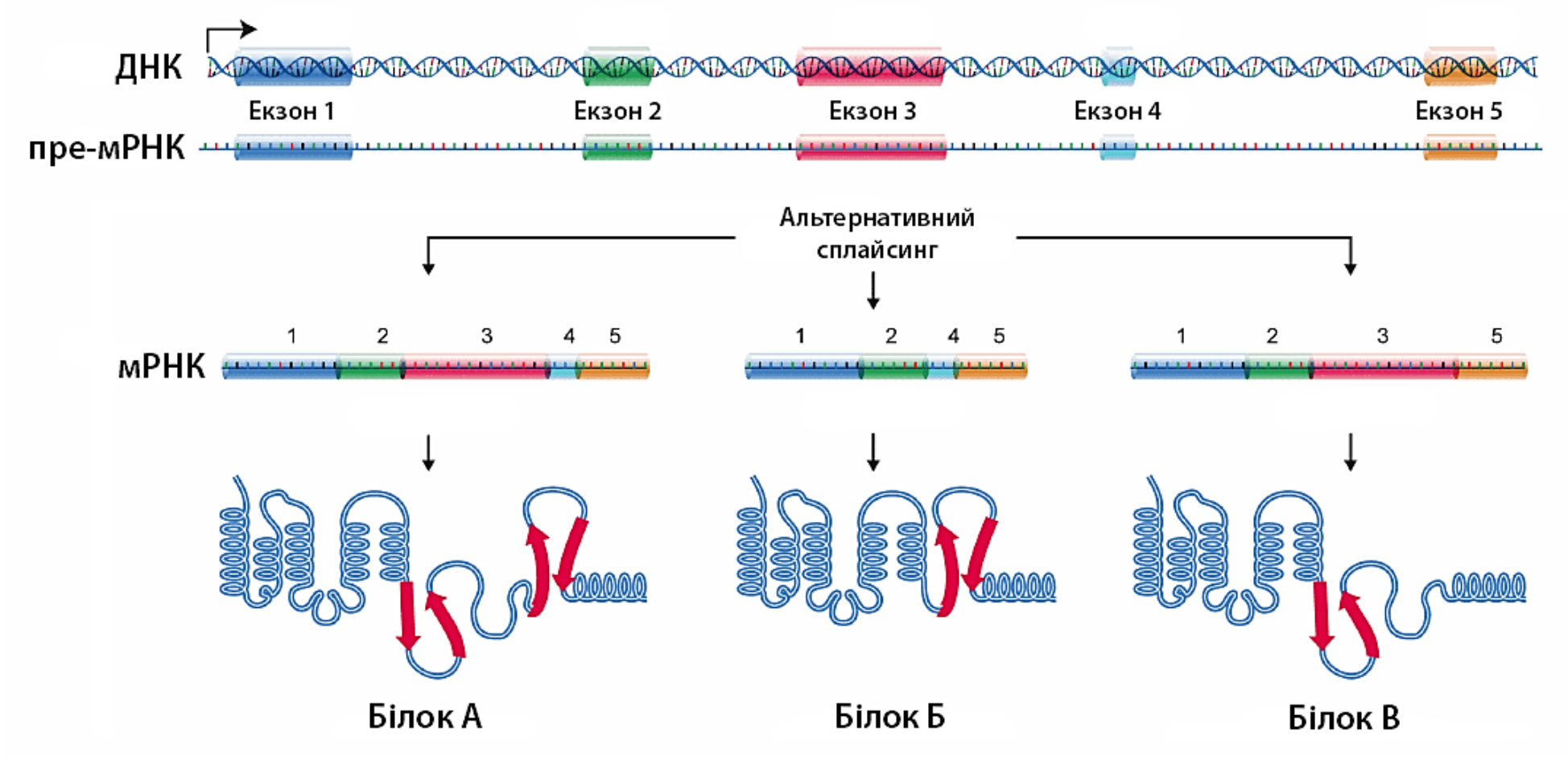


Рис. 48. **Альтернативний сплайсинг**

Різні альтернативні 5’-сайти сплайсингу можуть з’єднуватись із загальним 3’-сайтом і навпаки, різні альтернативні 3’-сайти здатні об’єднуватись із одним 5’-сайтом сплайсингу. Таким способом можуть додаватися або видалятися частини екзонів, а також цілі екзони. Внаслідок цього, екзон однієї мРНК може опинитися в інтроні мРНК, яка утворена альтернативним сплайсингом. Не дивлячись на те, що це явище було вперше виявлено у вірусів, альтернативний сплайсинг характерний також для клітинних транскриптів, особливо для вищих еукаріот.

Хоча деякі транскрипти піддаються альтернативному сплайсингу в клітинах всіх типів, інші по-різному сплайсуются в окремих клітинах дозволяючи тим самим продукувати спеціалізовані форми певних білків. Більше того, альтернативний сплайсинг може призвести до утворення тканино-специфічних мРНК здатних кодувати транскрипційні фактори, які впливатимуть на диференційну експресію інших генів.

Усі відомі реакції сплайсингу ядерних транскриптів у вищих еукаріот відбуваються інтрамолекулярно (тобто в межах одного транскрипту пре-мРНК). Проте у деяких нижчих еукаріот зафіксований інтермолекулярний сплайсинг між екзонами двох різних транскриптів. Цей, так званий, *транс-сплайсинг* з’єднує спільну лідерну РНК сплайсингу (англ. *Spliced Leader RNA – SL-RNA*, яка відповідає 5’-екзону) з певного первинного транскрипту з різними кодуючими екзонами інших пре-мРНК. Механізм цієї реакції схожий на звичайний механізм сплайсингу пре-мРНК за винятком того, що *SL-RNA*, мабуть, одночасно діє і як донор екзона, і як U1-мяРНК.

Еволюційне значення сплайсингу. Сплайсинг молекул пре-мРНК є процесом, який виник ще у давнину. Він характерний для еукаріот, архей, деяких бактеріофагів, проте він не виявлений у еубактерій. Одні дослідники вважають, що предковий організм спільний для прокаріот і еукаріот, використовував інтрони, які були згодом втрачені в ході еволюції нинішніми еубактеріями. Інші дослідники вважають, що процес сплайсингу з’явився в ході еволюції пізніше. Найбільш ймовірно, що складна, громіздка машина сплайсингу є похідною від спеціалізованих рибозимів, які були спроможні до самосплайсингу. Набагато більша структурна складність сплайсоми могла виникнути для уникнення необхідності кодування кожним інтроном власного рибозиму.

Сплайсинг безумовно ускладнює процес утворення молекул мРНК. Однак, він може служити інтересам еволюції, сприяючи створенню нових генів з новими функціями через процес перетасовування екзонів. Оскільки геноми часто піддаються рекомбінації, гени з новими функціями могли б найбільш зручним способом створюватись із сегментів існуючих функціональних одиниць (екзонів) і величезних фланкуючих їх інтронів шляхом рекомбінації практично в будь-якому місці цих інтронів. Таким чином, на шляху еволюції інтрони могли полегшувати рекомбінацію з метою створення нових генів, здатних кодувати білки з новою специфікою.

Редагування мРНК. Відносно нещодавно з'явилися повідомлення про нові механізми зміни кодуючого потенціалу мРНК на посттранскрипційному рівні, що названі *редагуванням РНК* (англ. *Editing*). Виявилося, що в клітинах багатьох організмів є ферментні системи, здатні з високою специфічністю змінювати первинну структуру мРНК, що, у свою чергу, змінює їх кодуючий потенціал і призводить до утворення функціонально-нових білків. Такі ферментні системи формують складний нуклеопротеїдний комплекс – *едітосому*, аналогічну до сплайсоми.

Редагування РНК передбачає серії різнотипових і не схожих між собою механізмів, які відчутно відрізняються від описаних раніше. Вони включають в себе як модифікації нуклеозидів, наприклад, дезамінування цитидину (С) в уридин (U) і аденозину (А) в інозин (I), а також вставки (інсерції) нуклеотидів без матриці або їх видалення (делеції). Редагування мРНК значно змінює послідовність кодованого поліпептиду, таким чином трансльований білок може сильно відрізнятися від закодованого в геномній ДНК.

Дезамінування цитидину в уридин, що каталізується специфічною дезаміназою, може призводити до передчасної термінації синтезу білка. Такий механізм виявлений у деяких вищих еукаріот, але гени мітохондрій і хлоропластів деяких нижчих еукаріот і рослин демонструють набагато частіші і більш специфічні варіанти перетворення С в U у складі їх матричних РНК.

Інший вид редагування РНК характеризується перетворенням залишків А в І у складі дволанцюгових ділянок деяких РНК, що відбувається за допомогою аденозин-дезамінази. Нездатність інозину утворювати водневі зв'язки з раніше комплементарним урацилом полегшує поділ ланцюгів у ділянці модифікації молекули РНК.

Редагування РНК, що супроводжується вставкою/видаленням, починається зі спарювання первинного транскрипту з РНК-провідником (англ. *Guide RNA – gRNA*), яка містить комплементарні послідовності поблизу сайтів вставки/видаленням. Утворена дволанцюгова ділянка далі покривається едітосомою. У ході редагування відбувається розрізання в сайті, де не утворюються комплементарні пари між РНК-провідником і нередагованим транскриптом. Наступна стадія каталізується ферментом кінцевою U-трансферазою, яка додає залишки урацилу до 3’-кінця мРНК. Вбудовані залишки утворюють комплементарні зв’язки з РНК-провідником. Процес вбудовування триває до тих пір поки в молекулі РНК-провідника зустрічаються А або G і зупиняється при натраплянні на С або U. «Відкриті» кінці утримуються іншими білками едітосомного комплексу. Після того, як едітосомний комплекс добудовує послідовність мРНК комплементарну РНК-провіднику, РНК-лігаза з’єднує кінці відредагованої мРНК. Вбудовані нуклеотиди викликають зсув рамки зчитування і зумовлюють відмінності білка від послідовності гена, який його кодує.

Едітосомний комплекс здатний редагувати мРНК лише в напрямку від 3’- до 5’-кінця. Рибонуклеїновий транскрипт, який вимагає масштабного редагування, потребує декількох РНК-провідників і декількох едітосомних комплексів.

5.4. Процесинг попередників рРНК і тРНК еукаріот

Процесинг попередників рРНК (пре-рРНК) полягає в зміні первинних транскриптів і відбувається в ядрі. В еукаріот місця зосередження генів, що кодують рРНК, зазвичай добре помітні в ядрі клітини, завдяки скупченню навколо них субодиниць рибосом, самозбирання яких відбувається тут же. Ці скупчення добре фарбуються цитологічними барвниками і відомі під назвою *ядерця*. У процесі транскрипції зчитується 2 види попередників рРНК.

Довга молекула-попередник з коефіцієнтом седиментації 45S синтезується РНК-полімеразою I. Дозрівання цього попередника передбачає його розрізання на 18S-, 5,8S- та 28S-рРНК. Під час цих ендо- і екзонуклеазних реакцій зовнішні та внутрішні спейсерні послідовності (англ. *External* і *Internal Transcribed Spacers – ETS* та *ITS*, відповідно) видаляються і згодом руйнуються, за принципом видалення інтронів пре-мРНК (рис. 49). При чому на цій стадії

процесингу окрім ряду нуклеаз залучені ще й малі ядерцеві РНК (мяцРНК), зокрема U3- і U8-мяРНК.

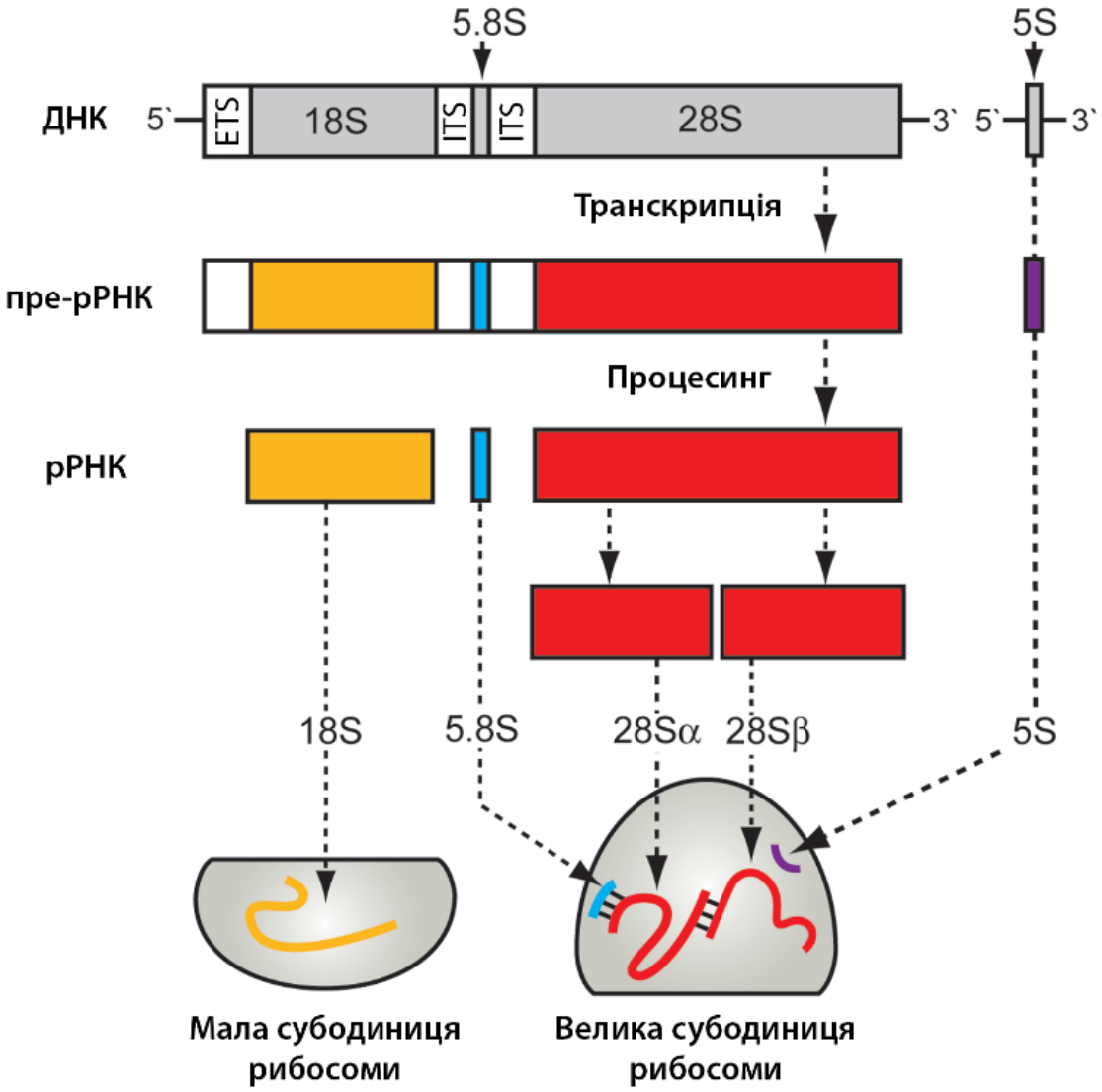


Рис. 49. **Схема процесингу пре-рРНК**

Процесинг молекул пре-рРНК полягає не тільки в реакціях розрізання, але і в модифікаціях, яким піддаються приблизно 200 специфічних нуклеотидних залишків у складі первинного транскрипту. У даному випадку модифікації здійснюються тільки на тих ділянках первинного транскрипту, з яких у процесі реакцій процесингу сформуються зрілі рРНК. Новоутворені молекули 18S-, 5,8S- та 28S-рРНК ще додатково піддаються серії метилувань, після чого вони взаємодіють із рибосомними білками формуючи 60S рибосомну субодиницю. 18S-рРНК аналогічним способом бере участь у формуванні 40S рибосомної субодиниці.

5S рРНК зв'язується з 28S рРНК і 5,8 S рРНК з утворенням великої субодиниці рибосоми. Однак, на відміну від інших рибосомних РНК –

5S рРНК кодується окремим геном, транскрибується РНК-полімеразою III і піддається іншому варіанту процесингу. Дійсно, 5S рРНК відрізняється найбільш простим процесингом серед усіх РНК-транскриптів еукаріот. Вона не піддається кепуванню, зберігаючи 5’-трифосфатну групу, не відбувається ні поліаденілювання, ні сплайсингу. Це єдина відома еукаріотична РНК, яка синтезується, як правило, зрілою. Її 5’- і 3’-кінці захищені від деградації вторинними структурами, стабілізованими міцними взаємодіями комплементарних пар основ, і пов’язаними з ними білками, як у випадку з іншими стабільними молекулами рРНК. У одних видів первинний транскрипт 5S рРНК являє собою вже повністю зрілий продукт, а у інших – 3’-кінці попередників «підрівнюються» екзонуклеазами до утворення зрілої форми. Такий мінімальний процесинг 5S рРНК у еукаріот контрастує з відповідним процесингом у прокаріот. У останніх, як вище зазначалось, 5S рРНК транскрибується у складі єдиного великого попередника пре-рРНК і потребує процесингу 5’- і 3’-кінців.

Процесинг попередників тРНК (пре-тРНК) включає наступні реакції: видалення 5’-лідерної нуклеотидної послідовності; видалення 3’-кінцевої послідовності; додавання послідовності ССА на 3’-кінець; вирізання інтронів; модифікації окремих нуклеотидів.

5’-кінці транспортних РНК формуються за рахунок ендонуклеазного розщеплення, каталітичним рибонуклеопротеїдним комплексом РНКази Р, який складається з висококонсервативного рибозиму і дев’яти білків. РНКаза Р розпізнає відповідну шпилькову структуру у складі пре-тРНК.

Процесинг 3’-кінців транспортних РНК починається одразу ж по закінченні транскрипції. До ділянки полі-U приєднується білок *La*, який є необхідним елементом для правильного процесингу 3’-кінців молекул пре-тРНК. Потім під дією екзонуклеази видаляється надлишкова 3’-кінцева послідовність, після чого додається термінальна ССА-послідовність за допомогою РНК-нуклеотидилтрансферази. Послідовність ССА необхідна для приєднання відповідної амінокислоти до тРНК.

Загальною властивістю пре-тРНК усіх еукаріот, а також архей, є присутність одиничних інтронів на відстані в один нуклеотид від 3’-кінця антикодону. Спосіб видалення інтронів суттєво відрізняється від механізму сплайсингу пре-мРНК. Він не вимагає участі РНК-кофакторів (мяРНК), не відбуваються реакції переетеризації і не утворюються проміжні форми інтронів у вигляді петель. Замість цього

спочатку інтрони з пре-тРНК видаляються за участю ендонуклеаз, які роблять розрізи по кінцям інтронів формуючи нестандартні 2’-3’-циклофосфатний і 5’-ОН-кінці фланкуючих екзонів. Потім 2’-3’-циклофосфатний кінець перетворюється на 2’- фосфатний, вивільняючи групу 3’-ОН. Інший 5’-ОН-кінець екзону фосфорилюється з утворенням канонічного 5’-фосфатного кінця. Нарешті ці сформовані, вже звичайні 3’-ОН і 5’-фосфатний кінці екзонів лігуються за участю тРНК-лігази (рис. 50).

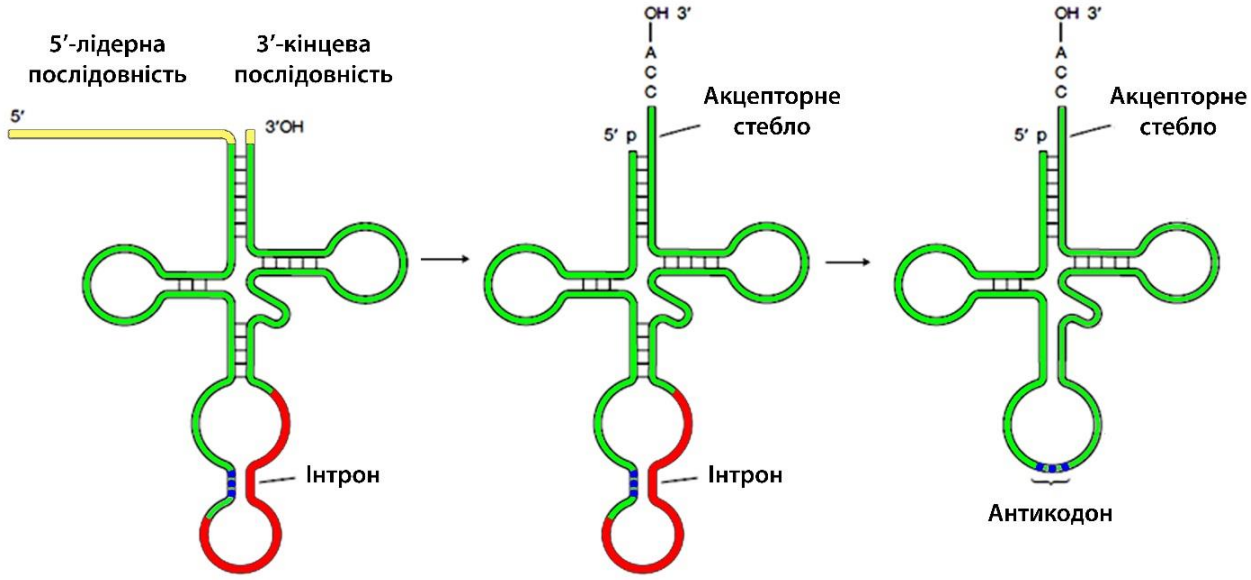


Рис. 50. **Процесинг попередників тРНК**

Модифікації нуклеотидів пре-тРНК – починаючи з простого додавання метильних груп і закінчуючи великомасштабними перебудовами структури нуклеозидів – здійснюються за допомогою хімічної зміни структури нуклеотидів без розщеплення цукрофосфатного остову транспортних РНК. Ензимологія цих модифікацій часто дуже складна – окремі білки можуть вносити одну й ту ж модифікацію нуклеозиду, але в різних позиціях тРНК. Вважається, що модифіковані нуклеозиди надають дії тРНК неповторності і специфічності. У цілому, молекули транспортних РНК становлять більшу частину класу високо модифікованих РНК, кожна з яких включає близько 100 різних видів модифікацій нуклеозидів, розташованих в різних положеннях внутрішньої нуклеотидної послідовності.

Екзосома. Незважаючи на те, продуктом транскрипції якої РНК-полімерази є та чи інша пре-РНК, у них у всіх видаляються непотрібні послідовності нуклеотидів за допомогою екзонуклеаз. Нині відомі екзонуклеази, які здатні деградувати РНК у напрямку 5’ → 3’, тоді як

інші видаляють надлишкові послідовності в напрямку 3’ → 5’. Відносно нещодавно був виявлений великий білковий комплекс, що містить безліч 3’ → 5’-екзонуклеаз, які важливі для процесингу великої кількості молекул РНК. Функціонування комплексу залежить від присутності всіх білків. Цей комплекс отримав назву *екзосоми*. Екзосома підрізає (підрівнює) 3’-кінці попередників рРНК, мяРНК і мяцРНК. Окрім того, екзосомний комплекс розщеплює пре-мРНК, з якими не відбувся сплайсинг, а також руйнує спейсерні ділянки рРНК.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. Які існують типи вторинної структури РНК?
2. Вкажіть основні типи РНК.
3. Охарактеризуйте будову тРНК.
4. У чому полягає адаптерна функція молекул тРНК?
5. У чому полягає основна функція рРНК?
6. Що таке рибозими і в чому їх особливість?
7. Які основні функції виконує РНК?
8. Опишіть особливості процесингу тРНК.
9. У чому полягає особливість процесу кепування під час транскрипції про- і еукаріот?
10. Що таке поліаденілювання і для чого цей процес необхідний?
11. Вкажіть етапи сплайсингу.
12. У чому полягає особливість альтернативного сплайсингу?
13. Які ферментні системи здатні змінювати первинну структуру мРНК?
14. У чому полягає відмінність процесингу 5S-рРНК про- і еукаріот?
15. З яких реакції складається процесинг попередників тРНК?
16. Які функції виконує екзосома?

6. Біосинтез білка на рибосомах

6.1. Генетичний код і його властивості

До процесу біосинтезу білка рибосомами залучено безліч макромолекул і макромолекулярних комплексів. На цьому етапі експресії, який називається *трансляцією*, відбувається зчитування генетичної інформації з мРНК та її перекодування у послідовність амінокислот поліпептидних ланцюгів білків. При цьому послідовність амінокислот білків, що синтезуються, як правило, однозначно визначена послідовністю нуклеотидів мРНК відповідно з генетичним кодом.

Генетичний код – це комплекс правил розташування амінокислот у молекулі білку на основі порядку розміщення нуклеотидів нуклеїнових кислот (ДНК та РНК).

Як відомо, в ДНК використовується чотири нуклеотиди – аденін (A), гуанін (G), цитозин (C) і тимін (T). Ці «літери» й складають «абетку» генетичного коду. У РНК використовуються ті ж нуклеотиди, за винятком тиміну, який замінений схожим нуклеотидом – урацилом (U). Оскільки у молекулах ДНК та РНК нуклеотиди складають ланцюги, то і генетична інформація закодована у вигляді послідовності «літер» нуклеїнових кислот.

Для синтезу білків у природі використовуються 20 різних амінокислот. Кожен білок є ланцюгом амінокислот з суворо визначеною послідовністю. Ця послідовність називається первинною структурою білка, яка визначає його будову, а, отже, і всі біологічні властивості. Набір амінокислот також універсальний для переважної більшості живих організмів.

Експресія генів або реалізація генетичної інформації у живих клітинах здійснюється за допомогою двох основних матричних процесів: *транскрипції* (тобто синтезу мРНК на матриці ДНК) і *трансляції* генетичного коду в амінокислотну послідовність (синтез поліпептидного ланцюга на матриці мРНК).

Ідею про існування генетичного коду першим сформулював видатний фізик-теоретик, який народився на півдні України в Одесі, Джордж Ентоні (Георгій Антонович) Гамов (1904-1968). Він висунув гіпотезу, у якій припускав, що послідовність нуклеотидів, яка визначає ту чи іншу амінокислоту білка, повинна містити три нуклеотиди, тобто *триплет*. Пізніше було доведено, що така послідовність складається

саме з трьох нуклеотидів, яку стали називати кодоном. Отже, *кодон* – це одиниця генетичного коду, три послідовно розташовані нуклеотидні залишки в ДНК або мРНК, які кодують включення однієї амінокислоти до молекули білку. Оскільки нуклеотидів всього чотири, то максимальна кількість їх комбінацій у кодоні визначається наступним рівнянням: $4^3=64$. Такої кількості триплетів більш ніж достатньо для кодування 20-ти основних амінокислот, з яких складаються білки живого. Загальноприйняті скорочення, що відповідають амінокислотам подано у табл. 3.

Таблиця 3

Амінокислоти білків та їх офіційні скорочення

Амінокислота	**Трилітерне позначення (укр.)**	**Трилітерне позначення (англ.)**	**Однолітерне позначення (англ.)**
Аланін	Ала	Ala	A
Аргінін	Арг	Arg	R
Аспарагін	Асн	Asn	N
Аспарагінова кислота	Асп	Asp	D
Валін	Вал	Val	V
Гістидин	Гіс	His	H
Гліцин	Глі	Gly	G
Глутамін	Глн	Gln	Q
Глутамінова кислота	Глу	Glu	E
Ізолейцин	Іле	Iso	I
Лейцин	Лей	Leu	L
Лізин	Ліз	Lys	K
Метіонін	Мет	Met	M
Пролін	Про	Pro	P
Серин	Сер	Ser	S
Тирозин	Тир	Tyr	Y
Треонін	Тре	Thr	T
Триптофан	Три	Trp	W
Фенілаланін	Фен	Phe	F
Цистеїн	Цис	Cys	C

Після відкриття структури ДНК Watson-Crick розгорнулись активні дослідження генетичного коду і до 1965 року було встановлене значення всіх 64 кодонів. Нині відомо, що гени більшості організмів закодовані за допомогою так званого «стандартного генетичного коду», з 64 можливих кодонів якого 61 кодують певні амінокислоти, а решта 3 кодони (UGA, UAG і UAA в мРНК) сигналізують про зупинку

трансляції поліпептидного ланцюга і називаються стоп-кодонами. Кодон UAG в мРНК також носить назву амбер-кодон, UGA – опал, а UAA – охра. Існує також один стартовий кодон AUG, з якого починається утворення поліпептидного ланцюга в процесі трансляції. Якщо ж кодон AUG міститься в середині мРНК, то від кодуватиме амінокислоту метіонін. У прокаріот найефективнішим стартовим кодоном також є AUG, хоча часто використовуються кодони GUG і AUU.

Оскільки в процесі біосинтезу поліпептидного ланцюга білка беруть участь всього 20 амінокислот, то різні кодони можуть кодувати однакові амінокислоти. Такі кодони прийнято називати *ізоакцепторними*. Крім того, кодони, які не зумовлюють включення амінокислоти в білок, називають *беззмістовними* (*асенсовими*) або *нонсенс-кодонами*; до таких відноситься група стоп-кодонів. Решта кодонів стандартного генетичного коду і відповідних їм амінокислот наведено у табл. 4.

Також, таблицю кодонів стандартного коду відображають у вигляді секторної діаграми (рис. 51).

У деяких випадках постає завдання встановити яким кодоном була зашифрована та чи інша амінокислота. У такому випадку використовують зворотну таблицю генетичного коду (табл. 5).

Більшість організмів переважно користуються одним варіантом коду, який щойно був описаний, проте це не завжди є правилом. Перший приклад відхилення від стандартного генетичного коду був відкритий в 1979 році при дослідженні генів мітохондрій людини. З того часу було знайдено декілька подібних варіантів відхилень, включаючи різні альтернативні коди мітохондрій (табл. 6). Наприклад, зчитування стоп-кодону стандартного коду UGA як кодону, що визначає триптофан у мікоплазм. У бактерій і архей GUG і UUG часто використовуються як стартові кодони. У деяких випадках гени починають кодувати білок зі старт-кодону, який відрізняється від звичайного, що використовується даним видом. У деяких білках нестандартні амінокислоти, такі як селенцистеїн і піролізин вставляються рибосомою, під час зчитування стоп-кодону за умови наявності певних послідовностей в мРНК після нього. Селенцистеїн часто розглядається як 21-а, а піролізин – 22-а амінокислоти, що входять до складу білків.

Таблиця 4

Послідовність нуклеотидів у кодонах мРНК для 20-ти амінокислот білків *

Перший нуклеотид (на 5'-кінці кодону)	Другий нуклеотид	Третій нуклеотид (на 3'-кінці кодону)			
		U	C	A	G
U	U	Фенілаланін Phe (F)	Фенілаланін Phe (F)	Лейцин Leu (L)	Лейцин Leu (L)
	C	Серин Ser (S)	Серин Ser (S)	Серин Ser (S)	Серин Ser (S)
	A	Тирозин Tyr (Y)	Тирозин Tyr (Y)	Стоп-кодон	Стоп-кодон
	G	Цистеїн Cys (C)	Цистеїн Cys (C)	Стоп-кодон	Триптофан Trp (W)
C	U	Лейцин Leu (L)	Лейцин Leu (L)	Лейцин Leu (L)	Лейцин Leu (L)
	C	Пролін Pro (P)	Пролін Pro (P)	Пролін Pro (P)	Пролін Pro (P)
	A	Гістидин His (H)	Гістидин His (H)	Глутамін Gln (Q)	Глутамін Gln (Q)
	G	Аргінін Arg (R)	Аргінін Arg (R)	Аргінін Arg (R)	Аргінін Arg (R)
A	U	Ізолейцин Ile (I)	Ізолейцин Ile (I)	Ізолейцин Ile (I)	Метіонін Met (M)
	C	Треонін Thr (T)	Треонін Thr (T)	Треонін Thr (T)	Треонін Thr (T)
	A	Аспарагін Asn (N)	Аспарагін Asn (N)	Лізин Lys (K)	Лізин Lys (K)
	G	Серин Ser (S)	Серин Ser (S)	Аргінін Arg (R)	Аргінін Arg (R)
G	U	Валін Val (V)	Валін Val (V)	Валін Val (V)	Валін Val (V)
	C	Аланін Ala (A)	Аланін Ala (A)	Аланін Ala (A)	Аланін Ala (A)
	A	Аспарагінова кислота Asp (D)	Аспарагінова кислота Asp (D)	Глутамінова кислота Glu (E)	Глутамінова кислота Glu (E)
	G	Гліцин Gly (G)	Гліцин Gly (G)	Гліцин Gly (G)	Гліцин Gly (G)

* неполярні | полярні | основні | кислотні

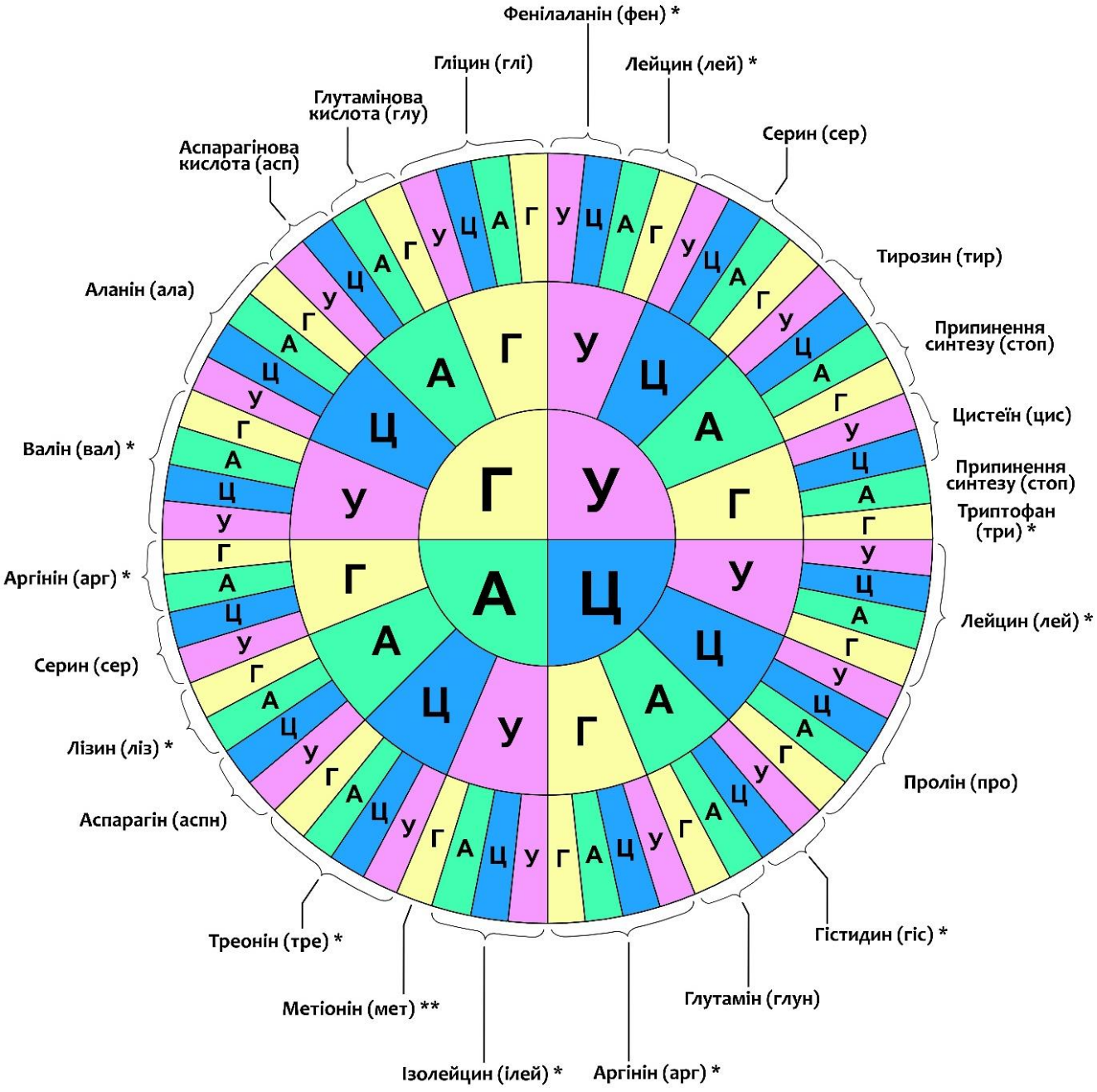


Рис. 51. **Секторна діаграма генетичного коду**

* незамінні амінокислоти;

** незамінна амінокислота, кодон якої є стартовим.

Таблиця 5

Зворотна таблиця генетичного коду

Аміно-кислота	Кодони мРНК	Аміно-кислота	Кодони мРНК
Ала	GCU, GCC, GCA, GCG	**Лей**	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Арг	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	**Ліз**	AAA, AAG
Асн	AAU, AAC	**Мет**	AUG
Асп	GAU, GAC	**Фен**	UUU, UUC
Цис	UGU, UGC	**Про**	CCU, CCC, CCA, CCG
Глн	CAA, CAG	**Сер**	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Глу	GAA, GAG	**Тре**	ACU, ACC, ACA, ACG
Глі	GGU, GGC, GGA, GGG	**Три**	UGG
Гіс	CAU, CAC	**Тир**	UAU, UAC
Іле	AUU, AUC, AUA	**Вал**	GUU, GUC, GUA, GUG
Старт	AUG	**Стоп**	UAG, UGA, UAA

Окрім того, в деяких білках зустрічаються й інші амінокислоти. Так, скажімо, до складу колагену входять гідроксипролін і гідроксилізин, усі фосфопротеїди містять фосфосерин, йодопохідні тирозину знайдені у складі тиреоглобуліну, амінокислота цистин є складовою різних білків тощо. Всі ці амінокислоти є похідними інших амінокислот, які кодуються мРНК. Вони утворюються внаслідок модифікацій білків вже після трансляції.

На основі наявних даних про особливості генетичного коду були сформульовані його властивості:

1) Триплетність: три послідовно розміщені нуклеотиди, формуючи триплет, або кодон, визначають включення в білок однієї з 20 амінокислот.
2) Безперервність: кодони не розділяються між собою, тобто йдуть одразу один за одним без пропусків, відповідно до чого інформація зчитується безперервно.
3) Дискретність (неперекриваємість): один і той же нуклеотид одночасно не може входити до складу двох або більше кодонів, тобто суміжні кодони не мають спільних нуклеотидів.

4) Специфічність (однозначність): кожний кодон відповідає за приєднання суворо тільки однієї амінокислоти у поліпептид, що синтезується.
5) Виродженість (надлишковість): оскільки сенсових кодонів 61, а амінокислот 20, то одна і та же амінокислота може кодуватися декількома різними кодонами (від 2-х до 6-ти).
6) Колінеарність: послідовність кодонів нуклеотидів певного гену (в еукаріот лише його екзонів) точно відповідає послідовності амінокислотних залишків у поліпептиді.
7) Наявність термінальних кодонів: асенсові, або стоп-кодони не здатні кодувати амінокислоти. Вони виконують функцію розмежовувача між двома ланцюгами кодонів та переривають синтез поліпептиду.
8) Універсальність: єдиний генетичний код є практично однаковим в організмах різного рівня складності – від вірусів до людини, хоча існують декілька інших, менш поширених варіантів генетичного коду (див. вище).

Таблиця 6

Деякі відхилення від стандартного генетичного коду

Представники	**Кодон**	**Стандартне значення**	**Альтерна-тивне значення**
Деякі види дріжджів роду *Candida*	CUG	Лейцин	Серин
Мітохондрії, зокрема у *S.cerevisiae*	CU (U, C, A, G)	Лейцин	Серин
Мітохондрії вищих рослин	CGG	Аргінін	Триптофан
Мітохондрії (в усіх досліджених видів)	UGA	Стоп	Триптофан
Мітохондрії ссавців, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* та багатьох протист	AUA	Ізолейцин	Метіонин = Старт
Прокаріоти	GUG	Валін	Старт
Еукаріоти (рідко)	CUG	Лейцин	Старт
Еукаріоти (рідко)	GUG	Валін	Старт
Прокаріоти (рідко)	UUG	Лейцин	Старт
Еукаріоти (рідко)	ACG	Треонін	Старт
Мітохондрії ссавців	AGC, AGU	Серин	Стоп
Мітохондрії *D. melanogaster*	AGA	Аргінін	Стоп
Мітохондрії ссавців	AG (A, G)	Аргінін	Стоп

У цілому, вважається, що триплетний код склався досить рано в ході еволюції життя. Але існування відмінностей у деяких організмів, що з'явилися на різних еволюційних стадіях, вказує на те, що він був не завжди таким.

6.2. Білоксинтезуюча система

Процес синтезу білку є дуже складним і багатостадійним. Здійснюється він у спеціальних органелах – рибосомах, яких у клітині міститься величезна кількість. Наприклад, у *E.coli* їх близько 20 000.

Рибосома (англ. *Ribosome*) є немембранною органелою клітини, на якій відбувається трансляція генетичної інформації з молекул мРНК в поліпептидний ланцюг білка. Таким чином, рибосому можна вважати фабрикою, що виготовляє білки, базуючись на наявній в клітині генетичній інформації.

Рибосома несе двояку функцію: є структурною платформою для процесу декодування генетичної інформації з РНК, та володіє каталітичним центром відповідальним за формування пептидного зв'язку, так званим *пептидил-трансферазним центром*. Вважається, що пептидил-трансферазна активність асоціюється з рРНК, і тому рибосома є рибозимом.

У клітині дозрілі рибосоми можуть вільно пересуватись в цитоплазмі або бути прикріпленими до цитоплазматичного боку мембран ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) чи ядра (рис. 52).

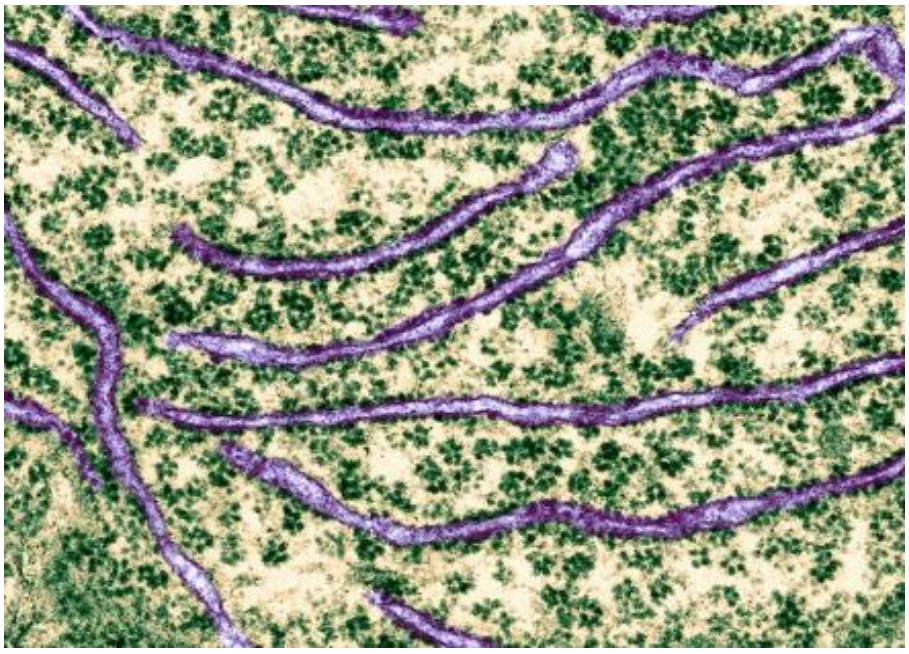


Рис. 52. **Рибосоми і полісоми (забарвлені зеленим) в цитоплазмі і на поверхні ЕПР**

Активні (ті, що є в процесі трансляції) рибосоми знаходяться переважно у вигляді полісом (див. нижче). В еукаріотичних організмах рибосоми можна знайти не лише в цитоплазмі, а й всередині деяких великих мембранних органел, зокрема в мітохондріях та пластидах. Будова та молекулярний склад цих рибосом відрізняється від складу загально-клітинних рибосом, і є ближчим до складу рибосом прокаріотів. Такі рибосоми синтезують органело-специфічні білки, транслюючи органело-специфічну мРНК.

Рибосоми представляють собою великий рибонуклеопротеїдний комплекс, що складається з рибосомних білків, молекул рРНК і асоційованих з ними факторів трансляції. Рибосоми прокаріот та еукаріот у загальних рисах є подібними за будовою та функцією, але відрізняються за розміром. У еукаріот рибосоми представлені 80S-субодиницями, проте як коефіцієнт седиментації рибосом прокаріот становить 70S.

Рибосоми всіх відомих організмів побудовані з двох нерівних субодиниць: прокаріотичні – 30S і 50S, а еукаріотичні – 40S і 60S. В обох випадках рибосомні білки у складі рибосом асоційовані з молекулами рРНК, утворюючи просторово організовані рибонуклеопротеїдні тяжі (рис. 53). Основні характеристики еукаріотичних і прокаріотичних організмів представлені в табл. 7.

Таблиця 7

Характеристики рибосом і їх субодиниць еукаріот та еубактерій

Комп-лекс	Показник	Еукаріоти	Еубактерії
Рибо-сома	Коефіцієнт седиментації	80 S	70 S
	Молекулярна маса	~3,2×10^6 Да	~2,0×10^6 Да
	Діаметр	~250-300 Å	~200 Å
Велика субодиниця	Коефіцієнт седиментації	60 S	50 S
	Молекулярна маса	~2,0×10^6 Да	~1,3×10^6 Да
	Кількість протеїнів	47	33
	Склад рРНК	28 S рРНК (3354 нт) 5 S рРНК (154 нт) 5,8 S рРНК (120 нт)	23S рРНК (2839 нт) 5S рРНК (122 нт)
Мала суб-одиниця	Коефіцієнт седиментації	40 S	30 S
	Молекулярна маса	~1,2×10^6 Да	~0,7×10^6 Да
	Кількість протеїнів	32	20
	Склад рРНК	18S рРНК (1753 нт)	16S рРНК (1504 нт)

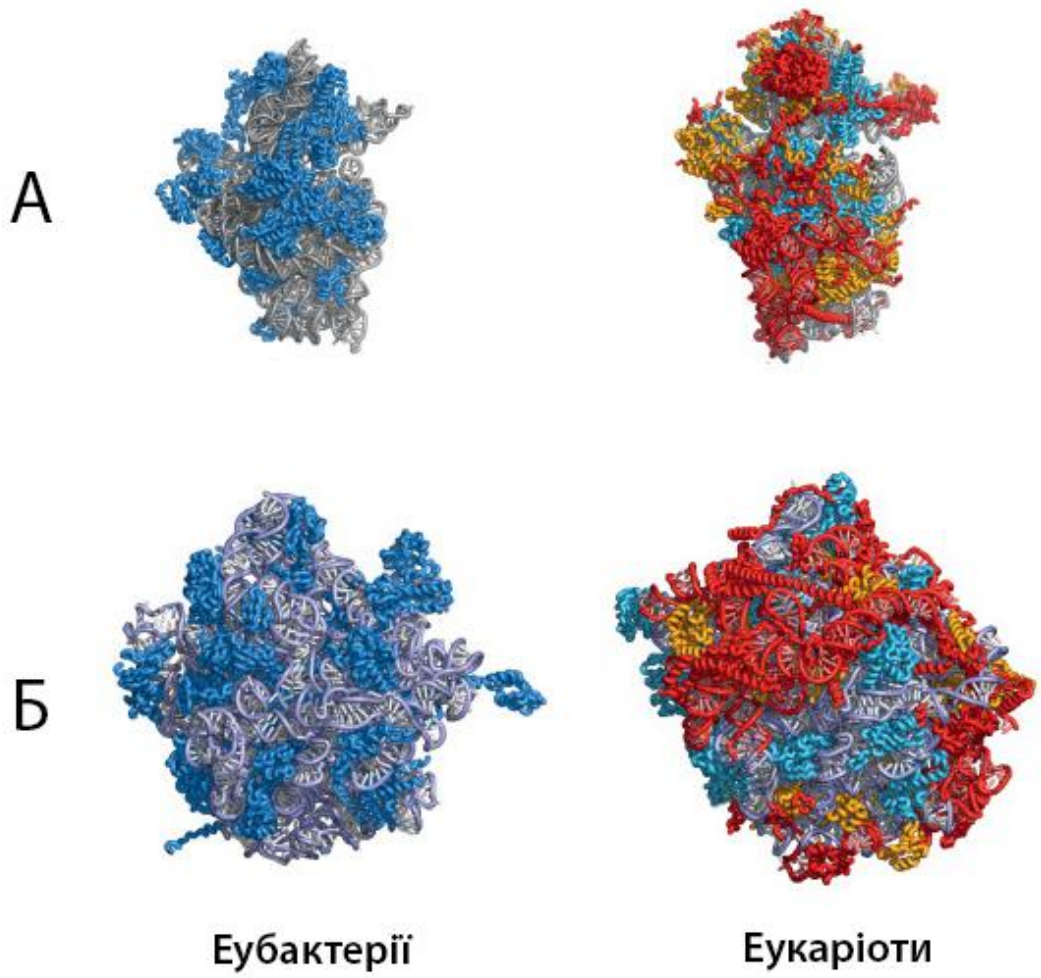


Рис. 53. **Просторова будова малої (А) і великої (Б) субодиниць рибосом**

Рибосома містить чотири сайти зв’язування для молекул РНК: один для мРНК і три для тРНК (рис. 54).

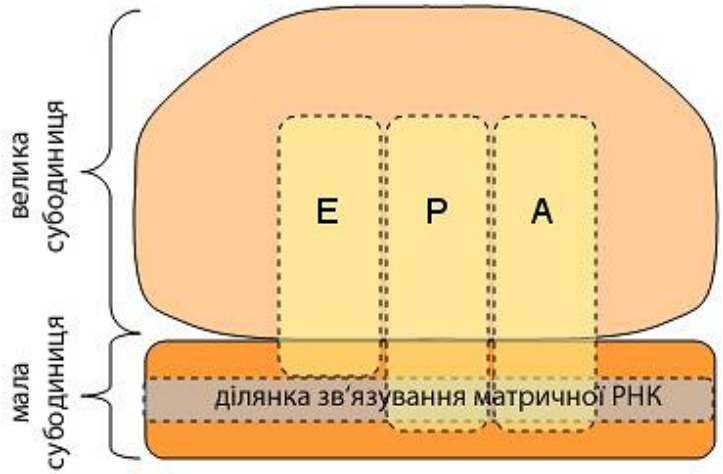


Рис. 54. **Схема сайтів зв’язування з РНК на рибосомі**
А – аміноацил-тРНК-зв’язуюча (акцепторна) ділянка;
Р – пептидил-тРНК-зв’язуюча (донорна) ділянка;
Е – ділянка виходу тРНК (англ. *exit*).

Перший сайт зв'язування тРНК називається сайтом *аміноацил-тРНК*, або *А-сайтом*, або *акцепторним*. У цьому сайті міститься молекула тРНК «заряджена» наступною амінокислотою. Другий сайт зв'язування – *пептидил-тРНК*, або *Р-сайт*, або *донорний* – містить молекулу тРНК, яка зв'язує кінець поліпептидного ланцюга, що росте. Третій сайт, це *сайт виходу*, або *Е-сайт*. До цього сайту потрапляє порожня тРНК яка передала кінець поліпептиду, що росте, після його взаємодії з наступною «зарядженою» амінокислотою в пептидильному сайті. Сайт зв'язування мРНК знаходиться в малій субодиниці. Він утримує рибосому «нанизаною» на мРНК, котру рибосома транслює.

6.3. Загальні відомості щодо механізму трансляції

Після того як було встановлено, що ДНК є носієм і ощадником спадкової інформації, було поставлено питання про те, яким чином ця генетична інформація трансформується у фенотипові ознаки і функціональні властивості живих організмів, що передаються у спадок. Нині можна дати однозначну відповідь на це питання: генетична інформація програмує синтез специфічних білків, що визначають у свою чергу специфічність структури і функції клітин, органів і цілісного організму.

Провідна роль білків у явищах життя пов'язана з багатством і різноманітністю їх хімічних функцій, з винятковою здатністю до різних перетворень і взаємодій з іншими простими і складними речовинами, що входять до складу цитоплазми. Тому, одним з найважливіших процесів, які протікають у клітині, є синтез білків.

Кожна клітина містить безліч білків, у тому числі і властивих тільки даному їх типу. Оскільки в процесі життєдіяльності усі білки рано чи пізно руйнуються, клітина повинна безперервно синтезувати білки для відновлення своїх мембран і немембранних структур, а також забезпечувати власний ріст і розмноження. Все це можливо за наявності величезної «армії» ферментів, які, також, за своєю природою є білками. Крім того, багато клітин виготовляють білки для потреб усього організму, наприклад клітини залоз внутрішньої секреції, які виділяють у кров білкові гормони. У таких клітинах синтез білку йде особливо інтенсивно.

Таким чином, процес синтезу білків з амінокислот, що каталізуються рибосомою на матриці мРНК, називається *трансляцією*.

Вона є останньою стадією біосинтезу білків, а також черговим етапом процесу експресії генів.

Основні етапи передачі генетичної інформації: синтез на матриці ДНК молекул мРНК (транскрипція) і синтез в рибосомах поліпептидного ланцюга за програмою, що міститься в мРНК (трансляція), універсальні для усіх живих істот. Проте тимчасові і просторові взаємини цих процесів розрізняються у про- і еукаріот.

В організмів, що мають ядро, транскрипція і трансляція суворо розподілені в просторі і часі: синтез різних РНК відбувається в ядрі, після чого молекули РНК повинні покинути межі ядра, пройшовши через ядерну мембрану. У подальшому в цитоплазмі РНК транспортуються до місця синтезу білка – рибосом. Лише після цього настає наступний етап – трансляція.

У бактерій, ядерна речовина яких не відокремлена від цитоплазми мембраною, транскрипція і трансляція відбуваються практично одночасно. У цих організмів на ділянках бактеріальної ДНК, ще до завершення транскрипції відбувається приєднання до мРНК рибосом. При цьому останні, просуваючись уздовж ланцюга мРНК, здійснюють паралельний синтез білку.

Під час трансляції, інформація, що міститься в мРНК, розшифровується згідно з правилами, відомими як генетичний код, та використовується для синтезу закодованої поліпептидної послідовності.

Процес трансляції умовно можна поділити на чотири фази: *активацію*, *ініціацію*, *елонгацію* та *термінацію*. При активації, певна амінокислота приєднується до відповідної тРНК. Зв’язана з амінокислотою тРНК називається аміноацил-тРНК або «зарядженою» тРНК. Хоча активація часто розглядається окремо від трансляції, вона необхідна для її початку. При ініціації мала субодиниця рибосоми зв’язується з 5’-кінцем мРНК за допомогою факторів ініціації й інших білків, які допомагають цьому процесу. Елонгація триває, коли чергова аміноацил-тРНК використовується для збільшення поліпептидного ланцюга. Термінація відбувається, коли рибосома зустрічає стоп-кодон (UAA, UAG або UGA), для якого не існує відповідної тРНК, при цьому відбувається звільнення поліпептидного ланцюга.

Таким чином, під час трансляції рибосома, зв’язавшись з мРНК, починає послідовно, кодон за кодоном, просуватись уздовж матриці, вибираючи з навколишнього середовища молекули аміноацил-тРНК. При цьому кожен індивідуальний акт трансляції завершується

приєднанням чергової вибраної молекули амінокислоти до ланцюга білка, що синтезується. Сусідні амінокислоти білка з'єднуються за допомогою *пептидного зв'язку*, який формується між карбоксильною групою кінцевої і аміно-групою нової амінокислоти. Саме у зв'язку із цим білки ще називають *пептиди*, або *поліпептиди*.

Трансляція починається з 5'-кінця мРНК, а завершується на її 3'-кінцевій частині. При цьому біосинтез поліпептиду починається з його N-кінцевої амінокислоти.

6.4. Активація амінокислот

Молекули білків по суті є поліпептидними ланцюгами, складеними з окремих амінокислот. Але вільні амінокислоти не розпізнаються рибосомами і недостатньо активні, щоб з'єднатися між собою самостійно. Тому, перш ніж з'єднатися одна з однією і утворити молекулу білка, амінокислоти повинні активуватися. Суть *активації* полягає в утворенні кон'югату амінокислоти з певною тРНК. Цей процес відбувається під дією особливих ферментів – *аміноацил-тРНК-синтетаз* (*АРСази*).

Аміноацил-тРНК-синтетази каталізують утворення аміноацил-тРНК під час реакції етерифікації певної амінокислоти з відповідною їй молекулою тРНК. Для кожної амінокислоти існує своя аміноацил-тРНК-синтетаза.

Кожна молекула АРСази складається з двох основних доменів – антикодон-зв'язуючого і аміноацитилюючого. Перший домен розпізнає антикодон певної тРНК і зв'язує його ферментом. Другий домен містить активний центр, у якому відбуваються реакції приєднання амінокислоти до тРНК. Окрім того, існують ще й додаткові службові домени, наприклад, домени для АТР, а також домени для гідролізу неправильних аміноацил-тРНК, що несуть не той амінокислотний залишок. За рахунок існування такого коригувального механізму забезпечується негайне видалення помилково приєднаної амінокислоти до тРНК.

Механізм аміноацетилювання є двостадійним (рис. 55). Спочатку в активному центрі АРСази зв'язуються відповідна амінокислота і АТР. З трьох фосфатних груп АТР дві відщеплюються, утворюючи молекулу пірофосфату (PPi), а на їх місце приєднується амінокислота. Утворена сполука (аміноацил-аденілат) складається з ковалентно з'єднаних високоенергетичним зв'язком амінокислотного залишку і

AMP. Енергії, яка міститься в цьому зв’язку, вистачає на всі подальші етапи, необхідні для того, щоб амінокислотний залишок зайняв своє місце в поліпептидному ланцюзі білку. Аміноацил-аденілати нестабільні і легко гідролізуються при дисоціації (звільнення) з активного центру АРСази. Коли аміноацил-аденілат сформований, починається наступна стадія. З активним центром синтетази зв’язується 3’-кінець тРНК, антикодон якої відповідає амінокислоті, що активується цією АРСазою. Розпізнавання тРНК АРСазами не завжди відбувається за антикодонами. Активний центр деяких ферментів виявляє комплементарну відповідність іншим ділянкам просторової структури тРНК. Далі відбувається перенесення амінокислотного залишку з аміноацил-аденілату на 2’-або 3’-ОН групу рибози останнього аденіну тРНК на 3’-АСС-кінці. У результаті утворюється стабільна аміноацил-тРНК (аа-тРНК), тобто тРНК, до якої ковалентно приєднаний амінокислотний залишок. Від аміноацил-аденілату при цьому залишається тільки AMP. І аміноацил-тРНК, і AMP у подальшому вивільняються активним центром. Обидві стадії активування амінокислот можна записати у вигляді наступних рівнянь:

$$\text{Амінокислота} + \text{ATP} \rightarrow \text{аміноацил-AMP} + \text{PPi};$$

$$\text{Аміноацил-AMP} + \text{тРНК} \rightarrow \text{аміноацил-тРНК} + \text{AMP}.$$

Сумарне рівняння двох реакцій має такий вигляд:

$$\text{Амінокислота} + \text{тРНК} + \text{ATP} \rightarrow \text{аміноацил-тРНК} + \text{AMP} + \text{PPi}$$

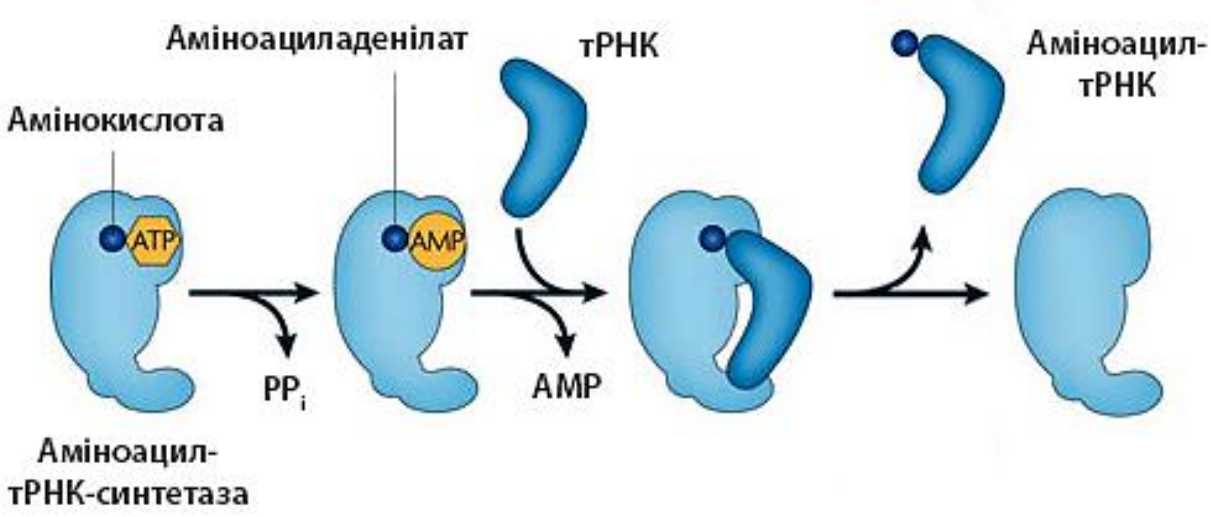


Рис. 55. **Схема активації амінокислот**

АРСази забезпечують відповідність нуклеотидним триплетам генетичного коду (антикодон тРНК), вбудовуються в білок амінокислот, і, таким чином, забезпечують правильність того, що

відбувається надалі зчитування генетичної інформації з мРНК при синтезі білків на рибосомах.

Амінокислота, приєднуючись до тРНК, надалі не визначає специфічних властивостей аа-тРНК, оскільки її структуру не розпізнає ні рибосома, ні мРНК. Участь у синтезі білку залежить тільки від структури тРНК, а точніше, від комплементарної взаємодії антикодону аміноацил-тРНК з кодоном мРНК. У ході кожного індивідуального акту трансляції рибосома розпізнає кодон мРНК і відповідно до нього підбирає аміноацитильовану тРНК, антикодон якої комплементарний даному кодону. Після цього відбувається приєднання чергової амінокислоти до білку за допомогою пептидного зв'язку.

Слід відмітити, що кожна з 20-ти аміноацил-тРНК-синтетаз повинна завжди прикріплювати до тРНК тільки «власну» амінокислоту з 20-ти протеїногенних амінокислот, що містяться в цитоплазмі клітини. Амінокислоти значно менші за розмірами і простіші за структурою, ніж тРНК, а тому їх впізнавання є більшою проблемою, ніж вибір потрібної тРНК. У дійсності, помилки мають місце, але їх рівень не перевищує однієї на 10000-100000 синтезованих аміноацил-тРНК.

Деякі амінокислоти відрізняються одна від одної дуже слабо, наприклад, лише однією метильною групою (ізолейцин і валін, аланін і гліцин). Для таких випадків у багатьох АРСаз еволюціонували механізми вибіркового розщеплення помилково синтезованих продуктів. Вибіркове розщеплення аміноацил-аденілатів називають *претрансферним редагуванням*, оскільки воно відбувається до перенесення амінокислотного залишку на тРНК. Тим часом, розщеплення готової аміноацил-тРНК – *посттрансферним редагуванням*. Претрансферне редагування, як правило, відбувається в тому ж активному центрі, що і аміноацетилювання. Посттрансферное редагування вимагає контакту 3'-кінця аміноацил-тРНК з іншим активним центром аміноацил-тРНК синтетази. Такий центр є не у всіх аміноацил-тРНК-синтетаз і міститься в окремому службовому домені глобули ферменту.

6.5. Ініціація біосинтезу білка

Ініціація трансляції у прокаріот. Біосинтез білка рибосомами починається з утворення ініціаційного комплексу (рис. 56). На першому етапі відбувається об'єднання вільної 30S субодиниці з

білковими факторами ініціації (англ. *Initiation Factors*, скорочено *IF*) – IF1, IF2 і IF3:

- IF1 підвищує спорідненість малої субодиниці до IF2 і IF3 і, напевно, є не обов'язковим фактором (у деяких видів він відсутній);
- IF2 взаємодіє з тРНК, а також володіє здатністю розщеплювати GTP;
- IF3 взаємодіє з 30S-субодиницею, запобігає асоціації з великою 50 S-субодиницею рибосоми, тим самим зберігаючи її вільний стан до зв'язування з матричною РНК. Цей білок також бере участь у скріпленні мРНК і тРНК, а також IF2.

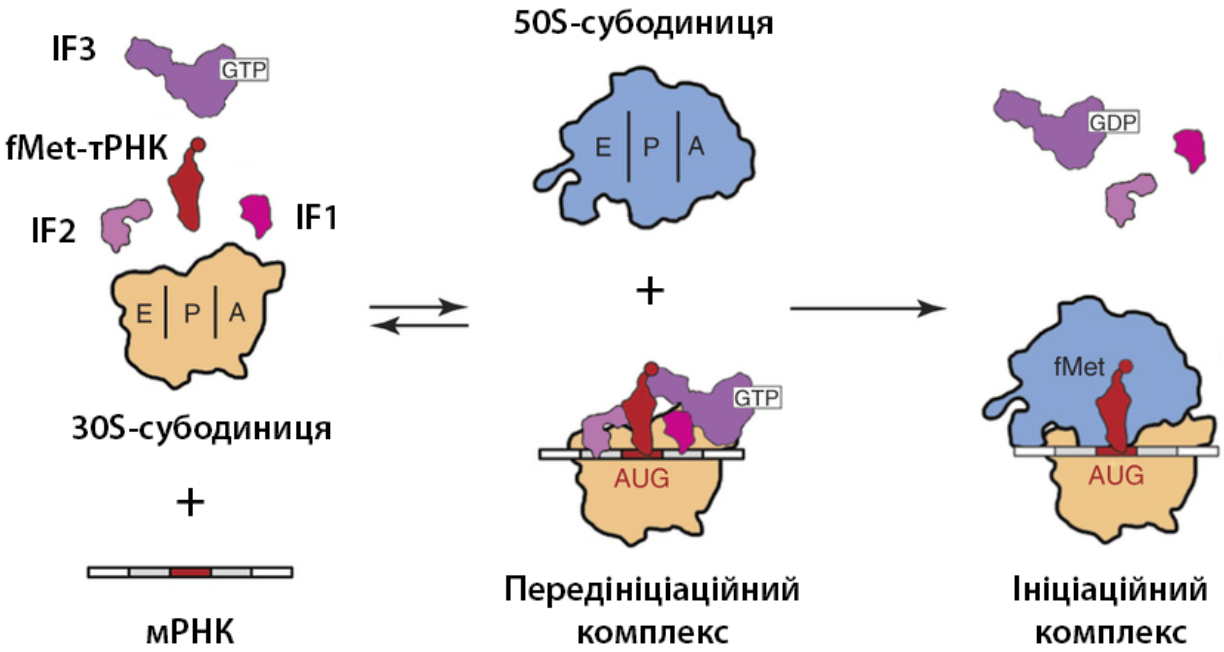


Рис. 56. **Схема утворення ініціаційного комплексу прокаріот**

У ході процесу приєднання факторів ініціації витрачається одна молекула GTP, яка взаємодіє з IF2 і змінює його конформацію.

Комплекс 30 S-субодиниці з факторами ініціації здатний розпізнавати спеціальні послідовності мРНК, так звані *ділянки зв'язування рибосоми* (англ. *Ribosom-Binding Site* або *RBS*). Ці ділянки містять, по-перше, ініціаторний кодон AUG і, по-друге, спеціальну *послідовність Шайн-Дальгарно* (*SD-послідовність*), з якою комплементарно зв'язується рибосомна 16S РНК. Послідовність Шайн-Дальгарно вирізняє ініціаторний AUG від внутрішніх кодонів, що кодують метіонін. Після того, як 30S-субодиниця зв'язалась з мРНК, до неї притягується ініціаторна аміноацил-тРНК.

Ініціаторна тРНК суворо специфічна для цієї стадії білкового синтезу. Спочатку вона звичайним шляхом приєднує метіонін з утворенням Met-тРНК, а потім спеціальна ферментна система формілює NH_2-групу залишку метіоніну з утворенням формілметіоніну-тРНК (fMet-тРНК).

Спершу антикодон fMet-тРНК ще не взаємодіє з ініціаторним AUG-кодоном. Така «продуктивна» взаємодія тРНК з мРНК відбувається в подальшому, і цей перехід є однією з лімітуючих стадій всього процесу утворення ініціаційного комплексу. Далі відбуваються конформаційні перебудови всіх компонентів даного комплексу. Після виходу з нього факторів ініціації IF1 і IF3 стає можливим приєднання великої 50S-субодиниці рибосом, що супроводжується подальшими конформаційними перебудовами всієї рибосоми. У ході цього процесу відбувається розщеплення молекули GTP до GDP і ортофосфату та звільнення з комплексу фактора IF2. Формілметіонін-тРНК разом з ініціюючим AUG-кодоном переміщаються в донорну (P) ділянку рибосоми, звільняючи акцепторний (A) сайт для наступної аміноацил-тРНК. У результаті ініціаційний комплекс стає повністю підготовленим для вступу в наступну фазу біосинтезу білка – елонгацію поліпептидних ланцюгів.

Кеп-залежна ініціація еукаріот. За допомогою цього механізму транслюється переважне число еукаріотичних мРНК. Остання поряд з основною (кодуючою) послідовністю нуклеотидів містить цілий ряд некодуючих регіонів, присутність яких винятково важлива для її ефективної і регульованої трансляції рибосомами.

Ділянка мРНК, розташована між кеп-групою і першим стартовим кодоном, отримала назву 5’-кінцевий нетранслюючий регіон (англ. 5’-*UnTranslated Region*, скорочено – 5’-UTR), або лідерна послідовність. Сегмент мРНК, розташований між останнім термінуючим кодоном і початком полі-А-послідовності, називають 3’-кінцевим нетранслюючим регіоном (3’-UTR). Послідовності 5’-UTR, як правило, здатні утворювати складні вторинні структури типу «стебло-петля» і містити короткі кодуючі послідовності або відкриті рамки зчитування (скорочено – ВРЗ), які здатні впливати на ефективність трансляції мРНК. Крім цього 5’-UTR можуть містити регуляторні послідовності, які розпізнаються білковими факторами трансляції. 3’-UTR та полі-А-послідовність впливають на стан рибосом після термінації синтезу поліпептидних ланцюгів. Крім того, принаймні, 3’-кінцева полі-А-послідовність бере участь в ініціації трансляції.

Білки, які беруть участь в ініціації трансляції в еукаріотів називають еукаріотичними факторами ініціації (англ. *Eukaryotic Initiation Factors*, скорочено – *eIF*). Крім факторів ініціації eIF1, eIF2 і eIF3, які зв'язуються з малою рибосомною субодиницею (40S), і за своїми функціями є приблизно аналогічними відповідним білкам прокаріот, еукаріоти мають ще додаткові фактори ініціації. Нижче наведений їх список із зазначенням функцій:

- eIF4A – фермент, який має РНК-хеліказну активність, що дозволяє розплітати вторинну структуру мРНК для того, щоб рибосома могла по ній рухатися;
- eIF4B – стимулює фактор eIF4A і спрямовую його до молекули мРНК;
- eIF4E – зв'язує кеп, розташований на 5'-кінці молекули мРНК;
- eIF4G – організовує компоненти, які беруть участь в ініціації трансляції, в єдиний комплекс. Містить ділянки приєднання для eIF4B, eIF4E, рибосоми;
- eIF5 – з'єднується з великою субодиницею рибосоми.

При формування ініціаційного комплексу спочатку 40S-субодиниця рибосоми асоціюється з власними факторами eIF1-3. При цьому білок eIF2 вже з'єднаний з ініціаторною Met-тРНК та молекулою GTP. Паралельно на мРНК формується білковий комплекс навколо її кеп-групи, до складу якого входять фактори eIF4B, eIF4E, eIF4G. Далі відбувається утворення передініціаційного комплексу, що містить мРНК, 40S-субодиницю рибосом, пов'язану з потрійним комплексом Met-тРНК-eIF2-GTP. Стабільний контакт мРНК з 40S-субодиницею можливий через взаємодію їх факторів eIF4G і eIF3 відповідно. У подальшому до білку eIF4B приєднується хеліказа eIF4A.

У такому вигляді передініціаційний комплекс здатний просуватись уздовж 5'-UTR мРНК до 3'-кінця і здійснювати пошук ініціюючого AUG-кодону. Така модель пошуку точки ініціації трансляції називається *моделлю сканування*. Цей процес супроводжується розплітанням мРНК за рахунок фактора eIF4A і витратами енергії у формі молекул ATP. За рахунок роботи цього фактора, 40S-субодиниця звільняється від білків eIF4G і eIF4E.

Після локалізації ініціюючого кодону 40S-субодиниця набуває здатність об'єднуватися з великою 60S-субодиницею рибосом за участю фактора eIF5, що в підсумку призводить до утворення повноцінного ініціаційного комплексу. У цей час відбувається

дисоціація від комплексу ряду факторів ініціації трансляції, що супроводжується гідролізом GTP. У такому вигляді за наявності відповідної аміноацил-тРНК ініціаційний комплекс здатний утворювати перший пептидний зв'язок нового пептидного ланцюга, тобто ініціювати синтез білка.

Кеп-незалежна ініціація еукаріот. Тоді як у більшості випадків еукаріотична трансляція вимагає наявності кепа на 5'-кінці мРНК, деякі вірусні і клітинні мРНК обходять кеп-залежний механізм за рахунок ініціації трансляції на спеціальних послідовностях всередині молекули мРНК.

Найкраще дослідженою (але далеко не єдиною) послідовністю характерною для кеп-незалежної трансляції є так звана «*внутрішня ділянка входу рибосоми*» (англ. *Internal Ribosome Entry Site*, скорочено *IRES*). Кеп-незалежний механізм не вимагає сканування рибосомою від 5'-кінця мРНК до стартового кодону. Рибосома може бути доставлена до стартової ділянки *IRES* за допомогою специфічних факторів – *ITAF* (англ. *IRES Trans-Acting Factors*).

Цей метод трансляції був відкритий відносно нещодавно, і є необхідним при трансляції певних мРНК у стресових умовах, коли загальна ефективність трансляції зменшена. Приклади включають синтез імуноглобулінів, факторів, які викликають апоптоз та деяких факторів росту. Крім того, цим механізмом інколи користуються віруси.

6.6. Елонгація поліпептидних ланцюгів

Елонгація трансляції у прокаріот. Після утворення потрійного комплексу, який включає 70S рибосому, мРНК та ініціаторну тРНК, завершується етап ініціації трансляції, і процес біосинтезу білка вступає у фазу елонгації, яка завершується звільненням поліпептидних ланцюгів з елонгуючих комплексів. Під час елонгації відбувається послідовне приєднання амінокислотних залишків до карбоксильних кінців поліпептидних ланцюгів, що будуються.

Перший етап першого циклу елонгації починається, коли fMet-тРНК зв'язується з ділянкою P рибосоми (рис. 57). Це приводить до конформаційної зміни елонгуючого комплексу, що дозволяє звільнити ділянку A для зв'язування наступної аміноацил-тРНК. Це зв'язування полегшується комплексом фактору елонгації *Tu* (*EF-Tu*) з GTP (англ. *Elongation Factors*, скорочено – *EF*). Входження нової аміноацил-тРНК

в А-ділянку рибосоми відбувається лише при комплементарній відповідності її антикодону з кодоном мРНК, який встановлений в цій А-ділянці.

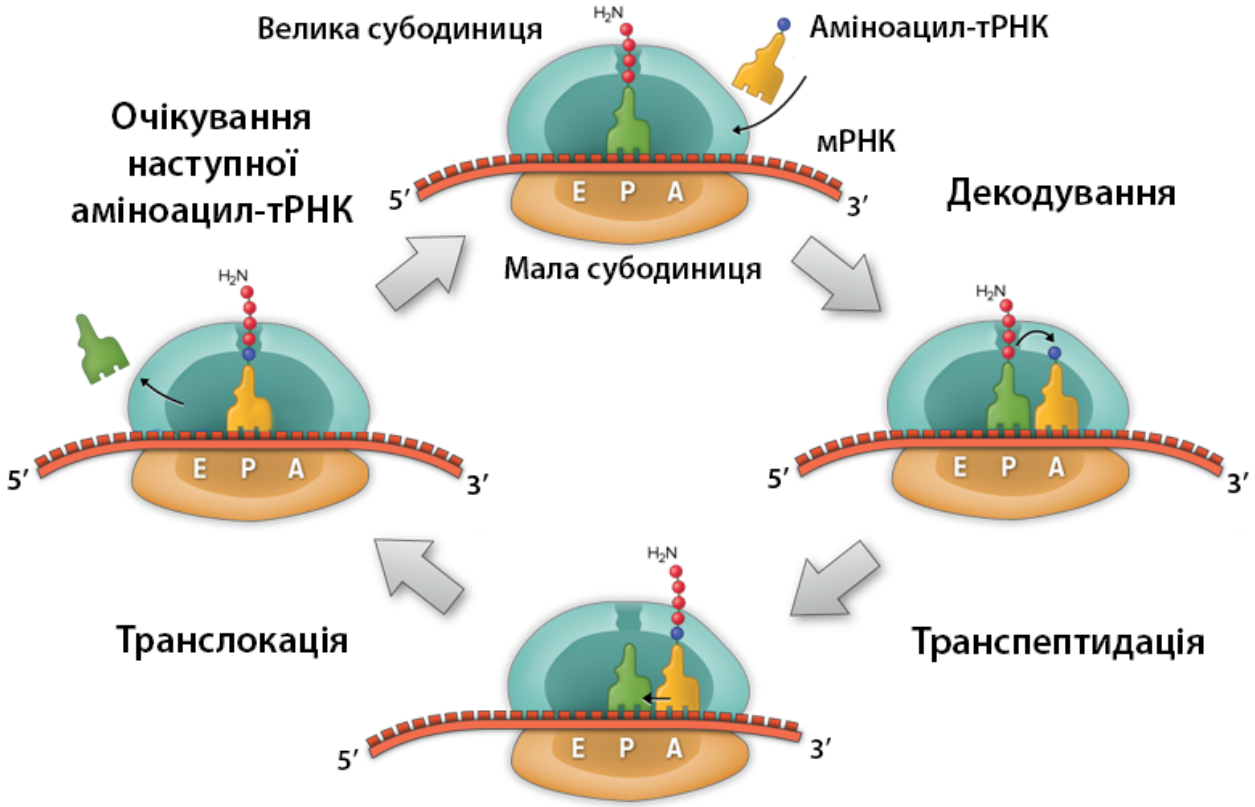


Рис. 57. **Схема циклу трансляції**

Після гідролізу GTP та вивільнення сполуки *EF-Tu*-GDP відбувається від'єднання формілметіоніну від ініціаторної тРНК на донорній ділянці і його перенесення до акцепторного сайту рибосоми. При цьому відбувається утворення пептидного зв'язку між карбоксильною групою формілметіоніну і аміно-групою наступного амінокислотного залишку. Утворений пептид утримується рибосомою через залишок тРНК, що знаходиться в А-ділянці, а вільна тРНК тимчасово зберігається. Поєднана з пептидом тРНК отримала назву *пептидил-тРНК*. Описана стадія, що отримала назву *транспептидації*, каталізується рибозимом пептидилтрансферазою, якою виступає 23S рРНК великої рибосомної субодиниці.

Обмін GDP на GTP у звільненому комплексі *EF-Tu*-GDP відбувається за участю фактора *EF-Ts*.

На кінцевій стадії елонгації, рибосома просувається («стрибає») на три нуклеотиди у напрямку до 3'-кінця мРНК. Через те, що тРНК зв'язані з мРНК за рахунок антикодон-кодонової взаємодії, пептидил-тРНК з акцепторної (А) ділянки рибосоми переміщається в донорну

(Р), а «незаряджена» тРНК розташовується в ділянці виходу (Е). Ця стадія елонгації відома під назвою *транслокації*. Вона каталізується фактором елонгації *EF-G*, який звільняється з елонгуючого комплексу після розщеплення молекули GTP.

Після завершення транслокації відбувається вивільнення фактора *EF-G* з елонгуючого комплексу. При цьому А-ділянка рибосоми залишається вільною. Наступний цикл елонгації починається із входження до акцепторного сайту чергової молекули тРНК у складі потрійного комплексу, що супроводжується звільненням fMet-тРНК з Е-ділянки. Після цього повторюються решта перерахованих вище стадій елонгації.

У фізіологічних умовах рибосома здійснює ~ 20 циклів елонгації за секунду. Відповідно, для синтезу білка довжиною в 200 амінокислотних залишків потрібно ~ 10 секунд.

Елонгація трансляції в еукаріот. Механізми елонгація поліпептидних ланцюгів у процесі еукаріотичної трансляції в основних рисах ідентичні таким у бактерій, хоча еукаріотична система трансляції володіє більш складним набором факторів елонгації.

Еукаріотичні клітини містять у великій кількості фактор елонгації eEF1. Його субодиниця α (*EF1A*) є функціональним гомологом бактеріального фактора *EF-Tu*. Так само як і у бактерій, цей фактор утворює потрійний комплекс з GTP і аміноацил-тРНК, забезпечуючи входження останньої в акцепторний сайт елонгуючої рибосоми. Два інших еукаріотичних фактори *eEF1B* (субодиниці *βγ* комплексу *eEF1*) та *eEF2* різко відрізняються за амінокислотним складом від функціональних аналогів прокаріот *EF-Ts* і *EF-G* відповідно. Фактор *eEF1B*, як і його бактеріальний аналог, каталізує обмін GDP на GTP в комплексі *eEF1A*-GDP. Фактор *eEF2*, за аналогією з бактеріальними системами, забезпечує транслокацію пептидил-тРНК в Р-ділянку рибосом і перенесення деацильованої тРНК в Е-ділянку.

Зростаючий поліпептид виводиться в цитоплазму через канал, початок якого розташований на поверхні рибосоми. Тут він взаємодіє з білками, що розпізнають сигнальну послідовність, або з іншими цитоплазматичними факторами, які забезпечують його спрямований транспорт всередині еукаріотичної клітини.

6.7. Термінація та реініціація синтезу білків

Термінація трансляції у прокаріот. Процес трансляції вступає у завершальну фазу після того, як до А-ділянки рибосоми потрапляє термінуючий (асенсовий) кодон мРНК, а пептидил-тРНК опиняється в Р-ділянці рибосоми (рис. 58). Білкові фактори термінації (англ. *Release Factors*, скорочено – *RF*) *RF1* і *RF2* беруть участь у розпізнаванні послідовностей нуклеотидів термінуючих кодонів, а саме *RF1* розпізнає стоп-кодони UAA і UAG, а *RF2* – UAA і UGA. Фактор *RF3*, так само як і *EF-G*, імітує структурні особливості фактора *EF-Tu*, що дає йому можливість взаємодіяти з А-ділянкою рибосоми. Але оскільки з ним не пов'язана аміноацил-тРНК, його присутність в А-ділянці призводить до розщеплення складноефірного зв'язку між поліпептидом і тРНК, тобто до обриву ланцюга поліпептиду. Після формування такого комплексу відбувається також звільнення *RF*-1 і *RF*-2 в кінці процесу термінації.

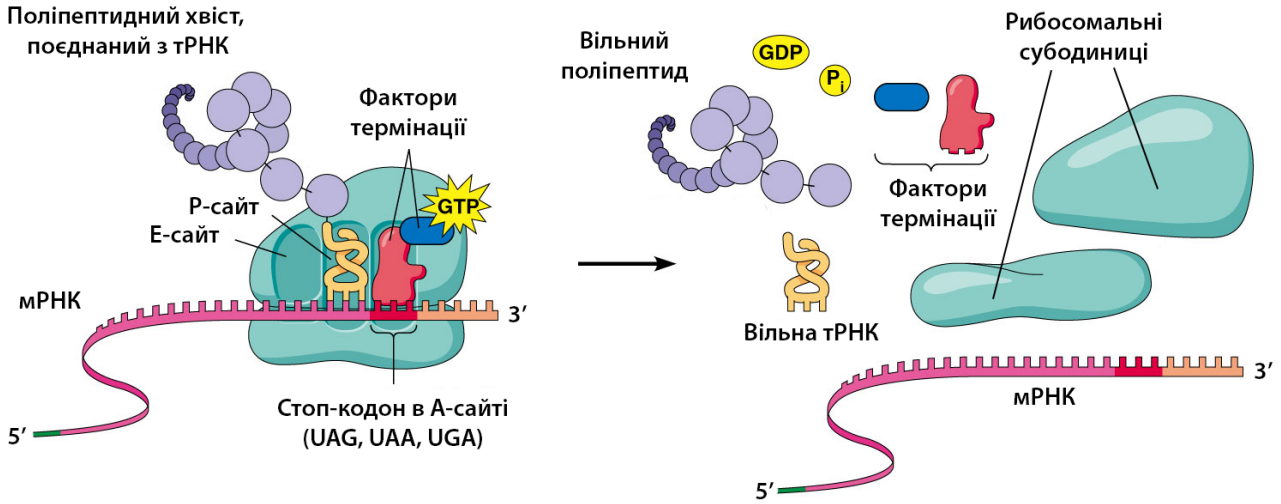


Рис. 58. **Схема термінації трансляції**

Встановлено, що вищезазначені рибосомні рилізинг-фактори (*RF*) спільно з фактором *EF-G* за участю молекули GTP забезпечують дисоціацію комплексу на складові компоненти, які потім вступають у новий раунд білкового синтезу. Фактор *RF*4, або *RRF* (англ. *Ribosome-Recycling Factor*), мабуть, стимулює переміщення молекули вільної тРНК з донорного сайту в Е-ділянку рибосоми і/або видалення решти *RF*-факторів з акцепторного сайту. Це сприяє повному звільненню рибосоми та її залученню до нового циклу трансляції в результаті ініціації або реініціації синтезу білка.

Відокремлена від мРНК рибосома перед вступом у новий цикл дисоціює на 30S і 50S субодиниці при участі *IF*-3, який запобігає повторному об'єднанню субодиниць за рахунок зв'язування із 30S-субодиницею. У тому випадку, якщо новий старт-кодон поліцистронної мРНК розміщується досить близько від стоп-кодону, синтез білка може бути реініційований.

Термінація трансляції вкорочених мРНК прокаріот. У тому випадку, якщо бактеріальна мРНК вкорочена у своїй 3'-кінцевій частині і, відповідно, рибосома не розпізнає стоп-кодон, закінчення трансляції за стандартним механізмом термінації є неможливим. Зіткнувшись з такою ситуацією, рибосома зупиняється на кінці мРНК і з нею взаємодіє нещодавно відкрита тмРНК (див. вище), яка запускає процес деградації частково синтезованого поліпептиду. Ця незвичайна РНК поєднує в собі властивості тРНК і мРНК. Вона на своєму 3'-кінці містить залишок аланіну, подібно стандартній акцепторній послідовності тРНК. Після взаємодії з рибосомою ця РНК вступає у стандартний цикл трансляції. Її залишок аланіну приєднується до недобудованого ланцюгу поліпептиду. Слідом за цим рибосома транслює коротку послідовність нуклеотидів тмРНК, яка тепер функціонує у якості матриці. Стандартно відбувається додавання десяти амінокислот – ANDENYALAA – до карбоксильного кінця укороченою поліпептидного ланцюга, після чого відбувається термінація трансляції на UAA-кодоні мтРНК. Далі С-кінцева олігопептидна послідовність такого білку розпізнається специфічної протеїназою, яка розщеплює цей поліпептид, забезпечуючи його утилізацію бактеріальної клітиною в процесі катаболізму.

Реініціація трансляції у прокаріот. *Реініціацією* трансляції називають повторний вступ рибосом у цикл трансляції без попереднього їх відокремлення від мРНК. Реініціація синтезу білка широко поширена у прокаріот і грає важливу роль у контролі експресії генів на рівні трансляції. Це пов'язано з тим, що значна частина бактеріальних мРНК поліцистронні, а, отже, за стоп-кодоном одного цистрону на невеликій відстані від нього розташовується старт-кодон наступного. Завдяки реініціації відбувається пов'язана трансляція декількох поліпептидів на поліцистронній матриці РНК.

Новий старт-кодон може розташовуватися вище або нижче стоп-кодону попереднього гена, а може і перекриватись з ним, наприклад, у послідовності AUGA. Реініціація може відбуватися з повною ефективністю, якщо в сайті реініціації є адекватна SD-послідовність, а

термінуючий і ініціюючий кодони розташовані досить близько один до одного (менше еквівалента довжини рибосоми).

Термінація трансляції в еукаріот. В еукаріотичних білоксинтезуючих системах термінація трансляції, як і у бактерій, контролюється специфічними рилізинг-факторами. Однак в еукаріот ці фактори менш різноманітні.

За сучасними уявленнями, елонгуюча еукаріотична рибосома розпізнає стоп-кодони після взаємодії з гетеродимерним комплексом рилізинг-факторів, до складу якого входять фактори *eRF1* і *eRF3*. Фактор *eRF1* необхідний для розпізнавання всіх трьох термінуючих кодонів (UAA, UAG і UGA) і звільнення синтезованого поліпептиду. Фактор *eRF3* володіє гомологією з eEF1A і гідролізує GTP, що стимулює термінацію незалежно від послідовності нуклеотидів у стоп-кодонах.

6.8. Полісоми

Мала і велика субодиниці рибосоми у процесі трансляції виконують різні функції: мала субодиниця приєднує мРНК, декодує записану в ній інформацію за допомогою механізму транслокації тРНК, а велика субодиниця відповідальна за утворення пептидних зв'язків нового білку.

У процесі синтезу білку рибосома приєднується до 5'-кінця мРНК і просувається у напрямі 3'-кінця. При цьому 5'-кінець мРНК звільняється, і до нього може приєднатися нова рибосома, на якій починається синтез ще одного поліпептидного ланцюга. Переважно багато рибосом одночасно приймають участь у синтезі білку на одній і тій же мРНК, утворюючи комплекс, який називають *полірибосомою*, або *полісомою* (рис. 59).

Утворення і кількість рибосом у полісомі залежить від швидкості ініціації, елонгації і термінації на даній конкретній мРНК. Кожна рибосома займає на мРНК ділянку завдовжки близько 80 нуклеотидів, тому рибосоми розташовуються на мРНК з інтервалом приблизно в 100 нуклеотидів. Чим довше поліпептидний ланцюг білку, що синтезується, тим більше рибосом може одночасно здійснювати синтез цього білку, значно збільшуючи таким чином ефективність використання матриці.

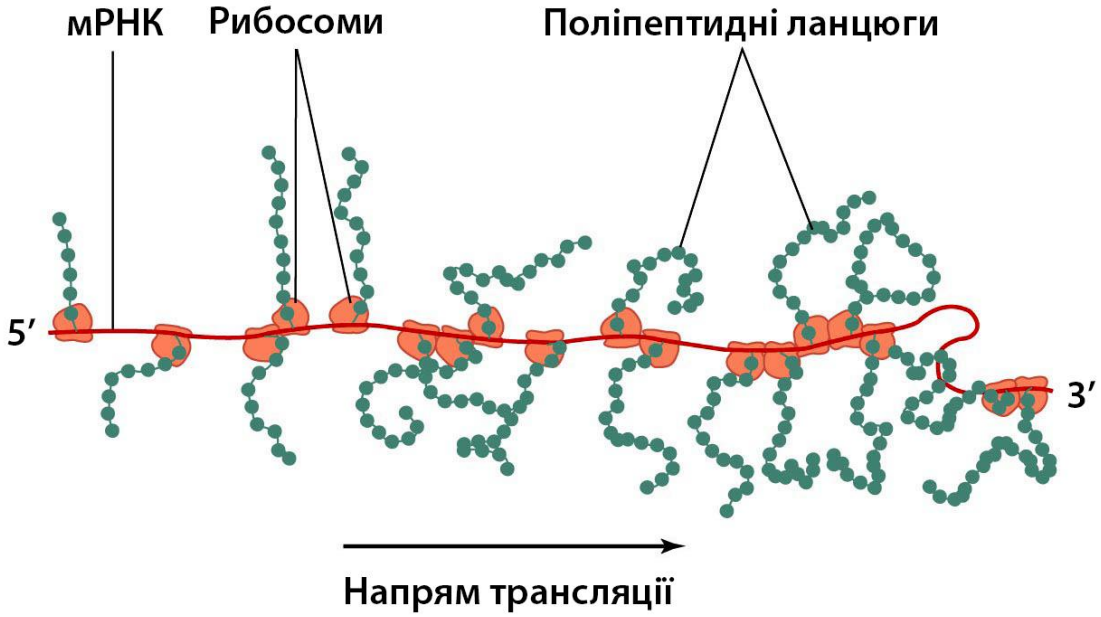


Рис. 59. **Схема переміщення рибосом на мРНК у складі полісоми**

Полірибосоми можуть існувати у вигляді часток, плаваючих у цитоплазмі клітин, або можуть бути пов'язані з ендоплазматичним ретикулумом (ЕПР). Рибосоми, які асоціюються з ЕПР, під електронним мікроскопом мають вигляд «шорсткої» поверхні. Білки, що синтезуються «шорстким» ЕПР, повинні транспортуватися через мембрану для того, щоб вони досягли місця остаточної локалізації. Для них характерна присутність на N-кінці сигнальної послідовності завдовжки від 15 до 30 амінокислотних залишків, яка містить більшість амінокислот з гідрофобними радикалами і забезпечує проходження білку через ліпідний бішар мембран. Деякі з цих білків для подальшого транспорту упаковуються апаратом Ґольджі в секреторні гранули.

6.9. Біосинтез мітохондріальних білків

Мітохондрії є органелами еукаріотів. Вони здатні накопичувати енергію хімічних зв'язків, яка звільняється в результаті окисного фосфорилювання, у вигляді енергії макроергічних зв'язків АТР. Ці органели володіють власним геномом у вигляді дволанцюгової ковалентно замкнутої мітохондріальної ДНК (мтДНК), довжина якої у людини становить 16569 п.о. мтДНК присутня в кожній мітохондрії у вигляді декількох ідентичних копій.

Нині найбільшого поширення набула гіпотеза про ендосимбіотичне походження мітохондрій, відповідно до якої сучасні

мітохондрії тварин беруть свій початок від α-протеобактерий (до яких належить сучасна *Rickettsia prowazekii*), які проникли в цитоплазму клітин-попередників. Вважається, що за час ендосимбіозу бактерії передали більшу частину своїх життєво важливих генів хромосомам клітини-господаря, зберігши у своєму геномі (у клітинах людини) інформацію лише про 13 поліпептидів, 22 тРНК і двох рРНК. Всі поліпептиди входять до складу ферментативних комплексів системи окисного фосфорилювання мітохондрій.

Реплікація і експресія їх геному залежать від білкових факторів, які кодуються ядерним геномом. Всі мітохондріальні тРНК акцептують амінокислотні залишки за участю аміноацил-тРНК-синтетаз, імпортованих до мітохондрій з цитоплазми клітин-господарів. У ній же синтезуються всі рибосомні білки мітохондрій, мРНК яких транскрибуються з ядерних генів. Навіть походження білків системи окисного фосфорилювання є змішаним – ядерно-мітохондріальним. Поліпептиди, які кодуються ядерним геномом і синтезуються рибосомами цитозоля, як правило, володіють N-кінцевою сигнальною послідовністю, яка забезпечує спрямований їх транспорт до мітохондрій.

Рибосоми мітохондрій, або *міторибосоми*, асоційовані з мітохондріальних матриксом. Було встановлено, що окрема мітохондрія містить до 100 міторибосом. Структурні дослідження міторибосом виявили їх суттєві відмінності від еукаріотичних і бактеріальних рибосом. Для міторибосом тварин характерний дуже низький вміст РНК і, як наслідок, більш низький коефіцієнт седиментації (~ 55S). Коефіцієнти седиментації великої і малої субодиниць міторибосом становлять відповідно ~ 39S і ~ 28S, які містять у своєму складі 16S і 12S рРНК. Невелика 5S рРНК, характерна для звичайних рибосом, в міторибосомах відсутня. Тим не менш, ділянка 3’-кінця 16S рРНК міторибосоми людини довжиною в 23 нуклеотиди виявляє 68%-ву гомологію з 5S рРНК *Bacillus subtilis*. Вважають, що ця частина 16S рРНК являє собою вкорочений функціональний аналог 5S рРНК бактеріальних рибосом.

Низька масова частка РНК в міторибосомах компенсується підвищеним вмістом білків. У результаті сумарна молекулярна маса міторібосом наближається до такої рибосом бактерій. Вважають, що частина білків міторибосом могла взяти на себе функції відсутніх послідовностей рРНК.

Трансляція в мітохондріях унікальна в багатьох аспектах. Як вже згадувалось, однією з особливостей біосинтезу білка в мітохондріях є мале число видів рРНК і тРНК, залучених у цей процес. Окрім того, для мітохондрій виявлено ряд особливостей генетичного коду. У мтДНК більшості філогенетичних груп триплет TGA кодує триптофан, хоча зазвичай на ньому відбувається термінация синтезу поліпептидних ланцюгів. Також, кодон AGR (де R = A або G) в мтДНК хребетних є термінуючим, у голкошкірих кодує серин, а у дріжджів, зазвичай, – аргінін.

Залишається незрозумілим, яким чином міторибосоми розпізнають ініціюючі кодони. Оскільки мітохондріальні мРНК позбавлені 5'-UTR, які характерні для бактеріальних і ядерних мРНК, взаємодія міторибосом з ініціюючими кодонами має визначатися іншими принципами. У безклітинних системах було показано, що 28S-субодиниця міторибосом має здатність міцно зв'язуватися з мРНК незалежно від послідовності нуклеотидів при відсутності додаткових факторів та ініціаторної тРНК, що відрізняє її від аналогічних про- і еукаріотичних субодиниць рибосом. Вважають, що після взаємодії з мРНК мала субодиниця за участю ще не ідентифікованих факторів трансляції просувається до старт-кодону на 5'-кінці матриці.

Нині єдиним охарактеризованим мітохондріальним фактором ініціації трансляції є *mtIF2*, який забезпечує GTP-залежне входження ініціаторної fMet-тРНК в комплекс, утворений малою субодиницею міторибосом та мРНК. Ймовірно, гідроліз GTP супроводжується звільненням *mtIF2* з потрійного комплексу з подальшим з'єднанням малої і великої (39S) субодиниць міторибосоми з утворенням комплексу, здатного до елонгації поліпептидних ланцюгів.

Також були виділено три фактори елонгації трансляції: *mtEF-Tu*, *mtEF-Ts* і *mtEF-G*, які мають високу гомологію з відповідними прокаріотичними факторами. Базуючись на цьому вважають, що механізм елонгації поліпептидних ланцюгів у мітохондріях в основних рисах відповідає прокаріотичному. На відміну від бактеріальних факторів *EF-Tu* і *EF-Ts* відповідні фактори мітохондрій утворюють один з одним більш міцний комплекс, для дисоціації якого недостатньо присутності тільки GTP, однак комплекс дисоціює при наявності в безклітинних системах GTP і аа-тРНК.

Встановлено, що для здійснення біосинтезу мітохондріального білка на достатньому рівні потрібна присутність мРНК у високих концентраціях, що і спостерігається в нативних мітохондріях.

6.10. Біосинтез білків хлоропластів

Хлоропласти є органелами клітин рослин, які здійснюють процес *фотосинтезу* – перетворення енергії квантів світла в енергію макроергічних зв'язків АТР. Так само як і мітохондрії, хлоропласти володіють власним геномом, представленим множинними копіями кільцевої ковалентно замкнутої ДНК (хпДНК), довжина якої зазвичай складає ~ 150 т.п.о. Геном хлоропластів містить в собі більше 100 різних генів.

У відповідності з теорією ендосимбіозу хлоропласти походять від цианобактерії *Anacystis nidulans*, яка в ході адаптації до внутрішньоклітинного існування передала основну частину своїх генів хромосомам ядра клітини-господаря. Як і мітохондрії, хлоропласти володіють власною системою транскрипції і трансляції, а також реплікації хпДНК.

На відміну від мітохондрій тварин, система трансляції хлоропластів високо гомологічна системі бактерій і представлена 70S рибосомами, власними тРНК, аміноацил-тРНК-синтетазами, численними факторами трансляції, тощо. Геном хлоропластів містить гени всіх рРНК (16S, 23S і 5S), які кластеризовані і транскрибуються поліцистронно. У великій субодиниці рибосом хлоропластів рРНК 23S-типу часто представлена двома або чотирма фрагментами. Вторинна структура цих фрагментів практично ідентична структурі відповідних ділянок 23S рРНК бактерій. У зв'язку з цим робиться висновок, що фізична безперервність молекули 23S рРНК не суттєва для її функціонування.

70S рибосоми хлоропластів містять ~ 60 рибосомних білків. Приблизно 1/3 з них кодується хпДНК, а решта – ядерним геномом. Рибосоми хлоропластів вищих рослин містять, принаймні, п'ять білків, які не мають гомологів у рибосомах бактерій.

Геноми хлоропластів, для яких визначена повна первинна структура, містять 27-35 потенційних генів тРНК.

Зрілі і функціонально активні мРНК хлоропластів не володіють кеп-групами і не поліаденільовані на 3'-кінцях. Поліцистронні попередники мРНК піддаються ендонуклеазному процесингу з утворенням моноцистронних матриць. Також генетична інформація хпДНК у багатьох випадках редагується на рівні мРНК. У цьому випадку в результаті запрограмованих замін нуклеотидів у мРНК

відбувається створення нових ініціюючих і термінуючих кодонів, а також зміна їх сенсу.

6.11. Котрансляційні і посттрансляційні модифікації білків

Більшість білків зазнають різні структурні зміни в результаті ко- і посттрансляційних модифікацій, тобто під час або після завершення їх синтезу рибосомами. Подібні модифікації суттєво впливають на функціональну активність білків і пептидів, значно розширюючи кодуючий потенціал при експресії їх генів.

Для багатьох білків посттрансляційна модифікація виявляється завершальним етапом біосинтезу. Поряд з альтернативним сплайсингом посттрансляційні модифікації збільшують різноманітність білків у клітині. Нині відомо більше двохсот варіантів посттрансляційної модифікації білків, які об'єднані в три групи: модифікації головного ланцюга і бокових груп амінокислот, а також приєднання різних білків і пептидів. Вони можуть бути як широко розповсюдженими, так і рідкісними, аж до унікальних. Найбільш розповсюдженими є фосфорилювання серину і треоніну, глікозилювання залишків аспарагіну, N-кінцеві ацилювання, циклізація N-кінцевого залишку глутамінової кислоти з утворенням піроглутамінової кислоти, С-кінцеве амідування послідовностей вивільнених пептидів, гідроксилювання залишків лізину і проліну, метилювання різних залишків амінокислот, тощо. Один і той же білок може піддаватися декільком різним модифікаціям.

Посттрансляційні модифікації по-різному впливають на білки: регулюють тривалість їх існування в клітині, ферментативну активність, взаємодії з іншими білками, тощо. У ряді випадків посттрансляційні модифікації є обов'язковим етапом дозрівання білка, в інших – вони виявляються функціонально неактивним. Розглянемо деякі з них.

Синтез білків, які містять залишки селеноцистеїну. За допомогою своєрідного механізму здійснюється передача генетичної інформації від генів до поліпептидних ланцюгів селенопротеїнів, які у своєму складі містять незвичайний амінокислотний залишок – селеноцистеїн. У бактерій і ссавців відомо більше десяти ферментів, до складу активних центрів яких входить залишок селеноцистеїну. Останній, на відміну від цистеїну, містить атом селену замість атома сірки.

Як виявилось, саме стоп-кодон UGA відповідає за приєднання селеноцистеїну до поліпептидного ланцюга за досить тонким механізмом. У прокаріот перенесення залишку селеноцистеїну до рибосом здійснюється за допомогою спеціальних молекул тРНК (тРНК^{Sec}), які на першому етапі з'єднуються із залишком серину за участю серил-тРНК-синтетази. Новоутворена серил-тРНК^{Sec} далі під дією селеноцистеїлсинтази перетворюється на селеноцистеїл-тРНК^{Sec}. Саме селеноцистеїл-тРНК^{Sec} у процесі трансляції розпізнає в мРНК кодон UGA, але тільки в певному контексті. Для «правильного» впізнавання UGA-кодону необхідна наявність послідовності довжиною в 45 нт., що розташована слідом за UGA-кодоном. Крім того, необхідна участь певного білка, який є гомологом фактора елонгації трансляції *EF-Tu* і володіє високою спорідненістю саме з селеноцистеїл-тРНК^{Sec}. До тих же результатів, хоча і з використанням іншого, не зовсім ще вивченого механізму, призводить вбудовування в поліпептидні ланцюги залишків селеноцистеїну у вищих організмів.

Розглянутий приклад показує, що у разі необхідності живий організм може змінювати зміст стандартного генетичного коду. У цьому випадку генетична інформація, укладена в генах, кодується більш складним чином. Такі факти змінюють наше традиційне уявлення про гени як первинні носії генетичної інформації.

Фолдинг поліпептидних ланцюгів. У процесі трансляції поліпептидні ланцюги починають високоспецифічно змінювати свою просторову структуру, яка формується повністю невдовзі після завершення їх біосинтезу. Процес згортання поліпептидного ланцюга в правильну просторову структуру отримав назву *фолдингу*. Внаслідок фолдингу у водних розчинах водорозчинні поліпептиди зменшують вільну енергію. Гідрофобні залишки амінокислот упаковуються переважно всередину молекули, а гідрофільні залишки розташовуються на поверхні білкової глобули. Гідрофобні області утворюються і на зовнішній поверхні молекул білків, формуючи порожнини активних центрів, а також місця контактів субодиниць мультимерних білків один з одним і біологічними мембранами.

Збільшення гідрофобності поверхні білків знижує їх внутрішньоклітинну стабільність, оскільки безліч протеолітичних ферментів швидко гідролізують пептидні зв'язки, які утворені гідрофобними амінокислотами або знаходяться поблизу від них.

Небезпека протеолітичної деградації для поліпептидного ланцюга, який ще синтезується, виникає відразу після його появи на поверхні

транслюючої рибосоми. Встановлено, що приблизно третина нових поліпептидних ланцюгів зазнає протеолітичного розпаду одразу ж після завершення їх синтезу рибосомами. Більшість щойно синтезованих білків уникає подібної участі завдяки утворенню так званого комплексу *NAC* (англ. *Nascent polypeptide Associated Complex*), асоційованого з поліпептидними ланцюгами, які ще синтезуються. До складу *NAC*-комплексу відноситься група білків з молекулярними масами 21-33 кДа. Коли ж гідрофобна сигнальна послідовність синтезованого білка досягає довжини в ~ 70 амінокислотних залишків та залишає *NAC*, з нею взаємодіє комплекс білків *SRP* (англ. *Signal Recognition Particle*), який не тільки оберігає гідрофобну частину поліпептиду від ранньої деградації протеїназами, але і направляє її до місця призначення – до мембран ЕПР.

Поліпептидні ланцюги, у яких відсутня сигнальна послідовність, залишаючи *NAC*, взаємодіють зі спеціальними білками-шаперонами. Така фолдинг система запобігає їх неспецифічній агрегації і деградації під дією внутрішньоклітинних протеїназ, сприяючи їх правильному фолдингу.

Участь специфічних протеїназ при модифікації білків. Одним з характерних прикладів специфічної дії протеїназ є активація попередників (*зимогенів*) протеолітичних ферментів (трипсину і хімотрипсину) після їх перенесення від місця синтезу (підшлункова залоза) до місця функціонування у травному тракті. Активація відбувається внаслідок протеолітичного відщеплення частини поліпептидного ланцюга зимогена, що призводить до появи в укороченого поліпептиду необхідної ферментативної активності. Необхідність такої посттрансляційної регуляції активності зимогенів очевидна – цим організм захищає клітини, які синтезують протеолітичні ферменти, від руйнування цими ж ферментами.

Аналогічний механізм посттрансляційної активації використовується під час біосинтезу інсуліну та інших пептидних гормонів. Попередник інсуліну синтезується у вигляді довгого поліпептиду з трьома дисульфідними містками. Поліпептид набуває гормональної активності тільки після протеолітичного відщеплення центральної частини поліпептиду-попередника і надлишкової N-кінцевої амінокислотної послідовності. Дві частини попередника, що залишилися, утримуються дисульфідними зв’язками і складають активну молекулу інсуліну.

У системах біосинтезу адренокортикотропного гормону (АКТГ) та ендорфіну декілька невеликих пептидних гормонів синтезуються у вигляді одного поліпептиду-попередника. Подальша участь попередника залежить від типу клітин, в яких він синтезується. У клітинах передньої долі гіпофізу цей поліпептид розщеплюється з утворенням АКТГ, γ-ліпотропіну і β-ендорфіну. При цьому АКТГ є кінцевим продуктом протеолізу і може секретуватись для стимуляції синтезу стероїдних гормонів в корі надниркових залоз. У клітинах середньої частки гіпофіза АКТГ розщеплюється з утворенням α-меланоцитстимулюючого гормону (α-МСГ).

Убіквітин-залежна система протеолізу білків. Убіквітин-залежна система протеолізу проводить пошук потенційної мішені для протеолітичної деградації серед величезного числа внутрішньоклітинних білків.

Розпізнані даною системою білки-субстрати маркеруються шляхом ковалентного приєднання до них молекул невеликого (76 амінокислот) стабільного білка – убіквітину. У результаті убіквітин з'єднується С-кінцем з боковими залишками лізину в субстраті. Наявність такої мітки в білку, мабуть, є первинним сигналом сортування, внаслідок якого створений кон'югат спрямовується до протеасоми. У більшості випадків до субстрату приєднується декілька молекул убіквітину, які організовані у вигляді намистинок на нитці. Молекули білків, які містять убіквітин, мабуть, є для протеасом переважними субстратами.

Білки, мічені ланцюгами убіквітину, після взаємодії з протеасомою розщеплюються до коротких пептидів і вільних амінокислот в результаті АТР-залежної реакції. В еукаріот протеасоми присутні в цитоплазмі та ядрах, але відсутні в інших клітинних органелах.

Протеасоми виділяють у вигляді індивідуальних субодиниць з коефіцієнтами седиментації 20S і 26S. 20S-субодиниця є коровою частиною 26S-субодиниці, яка володіє протеолітичної активністю. Коровий компонент являє собою білковий комплекс у вигляді циліндра, через центральний канал якого «протягується» молекула гідролізуючого білка.

Протеасоми забезпечують не тільки повну деградацію поліпептидів, а й беруть участь у процесингу попередників з утворенням зрілих, активних білків.

Сплайсинг білків. Феномен сплайсингу білків похитнув ще один постулат молекулярної біології, відповідно до якого послідовності нуклеотидів зрілих мРНК завжди колінеарні амінокислотним послідовностям кодованих ними поліпептидів. Видалення надлишкової генетичної інформації під час сплайсингу білків відбувається на рівні синтезованого поліпептиду шляхом вирізання з його внутрішньої частини короткої амінокислотної послідовності.

Внутрішня частина поліпептиду, яка видаляється в результаті білкового сплайсингу, отримала назву *інтеїнів*, а зовнішні N- і C-кінцеві частини – *екстеїнів*. В усіх випадках послідовності інтеїнів фланковані короткими консервативними послідовностями амінокислот. Зокрема N-екстеїн повинен закінчуватись серією амінокислот YSNSDAIIYVG, тим часом, C-екстеїн починається послідовністю CGER. У свою чергу інтеїн, як правило, починається з цистеїну або серину та закінчується парою гістидин-аспарагін.

Білковий сплайсинг є аутокаталітичним процесом і для свого здійснення не вимагає інших кофакторів. Подією, що запускає білковий сплайсинг є N-O-зсув у N-кінцевому сайті сплайсингу з подальшою атакою OH-групи C-кінцевого сайту і переетерифікацією. У результаті цього механізму утворюється розгалужене проміжне з'єднання, яке за участю залишку аспарагіну розпадається на інтеїн-сукцинімід і екстеїни, пов'язані один з одним етерним зв'язком. Цей зв'язок перетворюється на пептидний внаслідок N-O-зсуву (рис. 60).

Генетична мобільність послідовностей інтеїнів в ДНК є однією з найбільших несподіванок, виявлених після їх відкриття. Виявилося, що поліпептидний ланцюг інтеїнів володіє ендонуклеазною активністю, яка забезпечує транспозиції послідовностей інтеїнів у геномі. Цей процес отримав назву «хоумінга інтеїнів». У результаті хоумінга відбувається односпрямоване перенесення копії послідовності ДНК інтеїнів з гена, що містить цю послідовність, до аллельного йому, який її не містить. Даний ланцюг реакцій ініціюється ендонуклеазним розривом обох ланцюгів ДНК в алельному безінтеїновому гені, за допомогою власне ендонуклеази інтеїнів. Далі відбувається репарація дволанцюгового розриву з використанням послідовності ДНК інтеїнів у якості донора інформації.

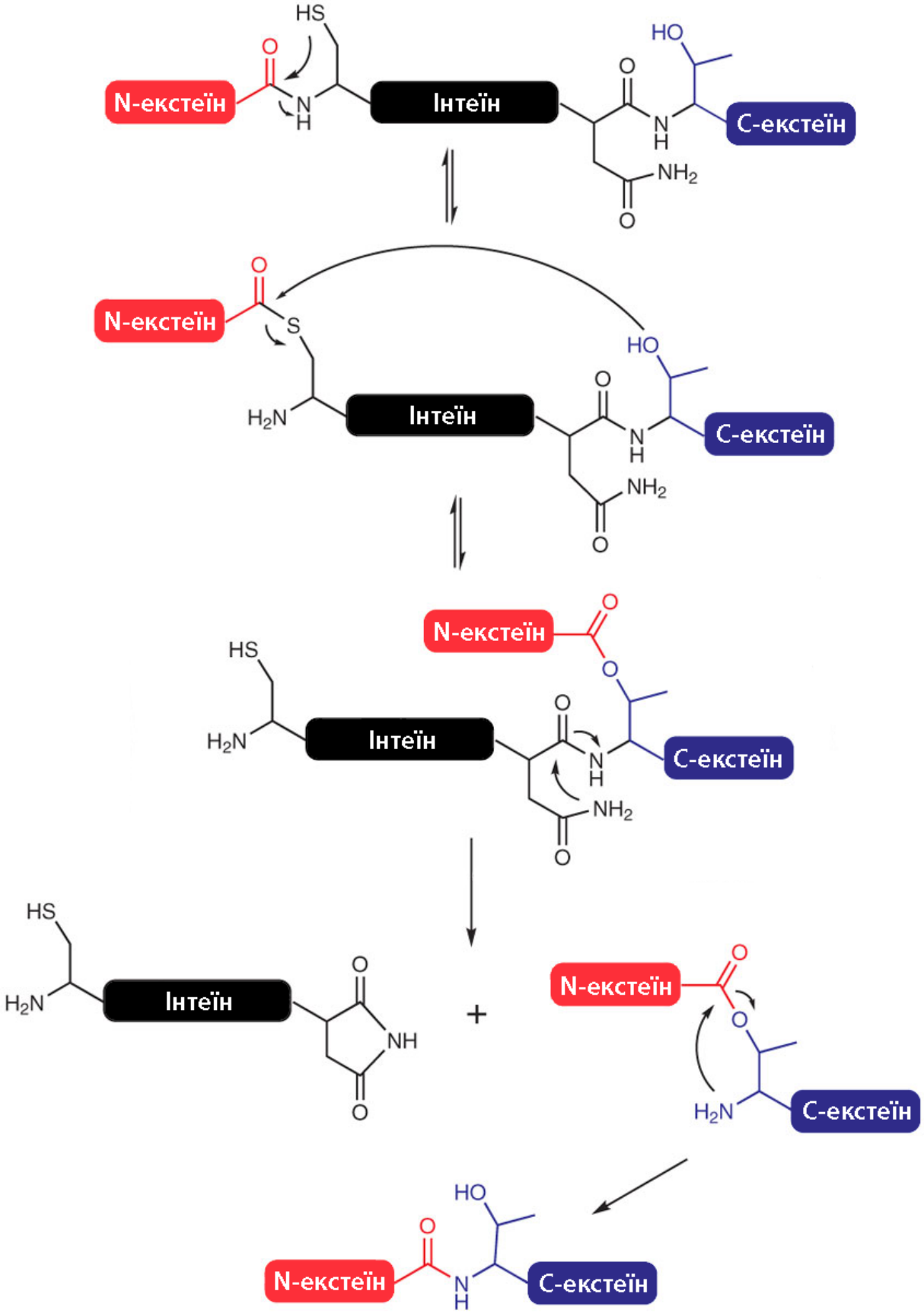


Рис. 60. **Механізм білкового сплайсингу**

Епімеризація L-амінокислотних залишків білків. Серед ковалентних посттрансляційних модифікацій пептидів особливе місце займає епімеризація L-амінокислотних залишків з утворенням D-енантіомерів, присутність яких принципово впливає на біологічну активність пептидів. Відомо, що тільки L-стереоізомери амінокислот беруть участь у синтезі білка рибосомами. У природних білках D-амінокислоти виявляються не часто, як правило, у складі антибіотиків пептидної природи, які синтезуються ферментативними комплексами мікроорганізмів без залучення рибосом. Іншим джерелом D-амінокислот у білках може бути спонтанна рацемізації їх L-стереоізомерів у складі поліпептидних ланцюгів у результаті старіння. Нещодавно виявлено, що у деяких природних пептидів, які володіють біологічною активністю, D-амінокислоти утворюються під час посттрансляційних модифікацій. Механізм утворення D-амінокислот у складі пептидів до кінця не зрозумілий, однак передбачається, що епімеризація супроводжується ферментативними реакціями, в результаті яких відбуваються послідовні дегідрогенізація та гідрогенізація L-ізомерів амінокислот.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. Яка існує кількість комбінацій кодонів; яка з них кодує амінокислоти?
2. Які існують відхилення від стандартного генетичного коду?
3. Вкажіть основні властивості генетичного коду?
4. Які дві функції здійснює рибосома в процесі синтезу білку?
5. Які існують сайти зв’язування тРНК і в чому полягають їх функції?
6. У чому полягає різниця транскрипції і трансляції у про- і еукаріот?
7. Вкажіть дві стадії активації амінокислот.
8. У чому полягає суть процесів претрансферного і посттрансферного редагування?
9. Які функції виконують фактори ініціації, що входять до складу ініціаційного комплексу?
10. Вкажіть стадії елонгації трансляції у прокаріот.
11. Вкажіть, з чим пов’язаний процес термінації трансляції у прокаріот?
12. Що розуміють під «реініціацією» трансляції у прокаріот?
13. Вкажіть особливості здійснення трансляції в мітохондріях.
14. Вкажіть фактори елонгації трансляції в мітохондріях.

15. Які три групи посттрансляційної модифікації білків існують?
16. У чому полягає особливість селенопротеїнів?
17. Що розуміють під поняттям «фолдинг поліпептидних ланцюгів»?
18. Яку функцію виконує комплекс *NAC* у процесі синтезу поліпептидних ланцюгів рибосомами?
19. У чому полягає особливість сплайсингу білків?
20. Що розуміють під поняттям «епімеризація» L-амінокислотних залишків білків?

7. Регуляція експресії генів

7.1. Загальні відомості про механізми регуляції експресії генів

Основною умовою існування будь-яких живих організмів є наявність тонкої, гнучкої, погоджено діючої системи регулювання, в якій усі елементи тісно пов'язані один з одним. У білковому синтезі не лише кількісний і якісний склад білків, але і час синтезу має пряме відношення до багатьох проявів життя. Зокрема, від цього залежить пристосування мікроорганізмів до умов поживного довкілля як біологічної необхідності або пристосування складного багатоклітинного організму до фізіологічних потреб при зміні внутрішніх і зовнішніх умов.

У цій главі буде розглянута лише невелика частина тієї майже неосяжної інформації, яка накопичена до нині щодо механізмів регуляції експресії генів і, як наслідок, метаболізму. *Регуляцією метаболізму* називається управління швидкістю біохімічних процесів шляхом оборотної зміни кількості білкових посередників, які беруть участь у цих процесах, або їх активності.

Кінцевим результатом експресії будь-якого відомого гена на молекулярному рівні є утворення молекул РНК або білка, інформація про первинну структуру яких закодована в цьому гені. Процес біосинтезу білка складається з багатьох взаємопов'язаних етапів. Як вже згадувалось вище, основними з них є транскрипція, трансляція, а також посттранскрипційні та посттрансляційні процесинг і модифікації РНК та білка. Тому зміна швидкості протікання кожного з даних етапів супроводжується, з рештою, зміною внутрішньоклітинного змісту функціонально активного продукту експресії гена. Отже, регуляторний вплив на будь-якому з цих етапів може призвести до зміни рівня експресії відповідного гена в клітинах.

Регульована експресія генів передбачає високоспецифічну зміну внутрішньоклітинного вмісту кодованих цими генами білків і нуклеїнових кислот у відповідь на дію продуктів експресії інших генів або регуляторних сигналів внутрішньо- і позаклітинного походження, наприклад, низькомолекулярних метаболітів, ксенобіотиків або фізичних факторів (температура, іонізуюче випромінювання тощо). Вибірковість таких впливів стає можливою завдяки утворенню високоспецифічних білок-білкових комплексів, комплексів ліганд-рецептор, розпізнаванню білками певних послідовностей нуклеотидів

ДНК або РНК, а також внаслідок комплементарних взаємодій нуклеїнових кислот одна з одною.

Вибіркова дія низькомолекулярних біорегуляторів на гени здійснюється опосередковано через відповідні рецептори білкової природи. При цьому, як правило, реалізується наступна схема: ефектор (ліганд) специфічно зв'язується з регуляторним білком-рецептором (наприклад репресором або активатором гена), змінюючи його конформацію таким чином, що він набуває здатність розпізнавати регуляторні послідовності нуклеїнових кислот або інших регуляторних білків. Подібні взаємодії, що відбуваються на одному з етапів біосинтезу білка, далі супроводжуються зміною ефективності експресії його гена. Очевидно, що найбільш продуктивно можна впливати на експресію гена через його транскрипцію. При такому способі регуляції повинен змінюватися внутрішньоклітинний рівень відповідних мРНК, який може лімітувати (обмежувати) біосинтез білків рибосомами. Крім того, припинення синтезу мРНК для зменшення внутрішньоклітинного вмісту непотрібних у даний момент білків економічно і з енергетичної точки зору, оскільки з припиненням транскрипції перестає витрачатися енергія на біосинтез непотрібних макромолекул – мРНК або їх попередників. Дійсно, регуляція експресії генів на рівні транскрипції широко поширена в природі.

Однак цей спосіб не є єдиним. У ряді випадків накопичення мРНК у вигляді внутрішньоклітинного пулу без негайної їх трансляції відбувається перед певними стадіями диференціювання клітин, наприклад у яйцеклітинах до запліднення. Ці неактивні мРНК можуть тривалий час зберігатися і використовуватись лише одразу після отримання клітинами відповідних сигналів. Крім того, альтернативний процесинг мРНК призводить до утворення з одного і того ж попередника декількох зрілих мРНК, трансляція яких супроводжується синтезом різних білкових продуктів. Спеціальні регуляторні механізми можуть змінювати співвідношення таких мРНК і, як наслідок, внутрішньоклітинний вміст кодованих ними поліпептидів. Використання регуляції даного типу дозволяє підвищити кодуючі можливості генів. Не меншу користь для клітини приносить і регуляція експресії генів на інших рівнях: трансляційному і посттрансляційному, які тільки в сукупності здатні забезпечувати підтримку життєво важливого гомеостазу організму.

7.2. Регуляція транскрипції генів у прокаріот

Регуляція транскрипції в клітинах здійснюється на рівні індивідуальних генів, їх блоків і навіть цілих хромосом. Можливість управління багатьма генами, як правило, забезпечується наявністю у них спільних регуляторних послідовностей нуклеотидів, з якими взаємодіють однотипні фактори транскрипції. У відповідь на дію специфічних ефекторів такі фактори набувають здатність з високою точністю зв'язуватись з регуляторними послідовностями генів. Наслідком цього є ослаблення (репресія) або посилення (активація) транскрипції відповідних генів.

Активність багатьох генів прокаріот регулюється за допомогою білкових факторів, взаємодіючих з регуляторними ділянками промоторів генів. При цьому відбуваються як посилення транскрипції генів – *позитивна регуляція (активація)*, так і пригнічення зчитування генетичної інформації РНК-полімеразами – *негативна регуляція (репресія)*. У першому випадку регуляторні фактори називають *активаторами*, а в другому – *репресорами*.

Послідовності нуклеотидів промоторних ділянок генів, з якими взаємодіють молекули репресора, називаються *операторами*. У багатьох випадках репресор зв'язується з оператором тільки в присутності низькомолекулярного ефектора, який специфічно взаємодіє з репресором. Такі ефектори отримали назву *корепресорів*. Вони часто потрібні й для функціонування білків-активаторів транскрипції. Найпростіший механізм репресії полягає у стеричному блокуванні зв'язування РНК-полімерази з промотором. Це відбувається в тому випадку, якщо послідовності нуклеотидів місць посадки РНК-полімерази на промотор і репресора на оператор перекриваються.

Деякі бактеріальні білки-репресори здатні негативно впливати на етапи ініціації транскрипції вже після зв'язування РНК-полімерази з промотором. Такі білки-репресори викликають утворення петлі на ділянці ДНК, яка містить промотор. При цьому взаємодія РНК-полімерази з промотором не послаблюється. У такому випадку блокуються наступні за ініціацією транскрипції етапи, які передують утворенню першого фосфодиефірного зв'язку.

Поширеним механізмом активації транскрипції за допомогою білків-активаторів є полегшення її ініціації РНК-полімеразою після контакту між ферментом і білком-активатором, пов'язаними з

регуляторною ділянкою промотора, що супроводжується конформаційними змінами РНК-полімерази.

Також, у бактерій виявлені білки-регулятори, які мають активність як репресора, так і активатора транскрипції. Такими «*амфотерними*» властивостями володіє, зокрема, білок-активатор катаболічних оперонів (англ. *Catabolite Activator Protein*, скорочено – *CAP*, або *CAMP Receptor Protein*, скорочено – *CRP*). Він активує транскрипцію бактеріальних генів, продукти яких беруть участь у розщепленні (катаболізмі) різних органічних сполук (переважно цукрів), які використовуються бактеріальною клітиною в якості джерела вуглецю. Свої властивості активатора *CRP*-білок набуває лише в комплексі з циклічним *AMP* (*cAMP*). Внутрішньоклітинна концентрація *cAMP* зростає у бактерій, які ростуть на бідних поживних середовищах, і знижується в умовах надлишку легко засвоюваних джерел вуглецю, наприклад глюкози. Тому система *CRP-cAMP* забезпечує активацію експресії катаболічних оперонів лише на бідних поживних середовищах.

CRP-білок може виступати, також, у ролі репресора транскрипції генів, зокрема галактозного оперону *E.coli*. Якщо всі гени катаболічних оперонов активуються *CRP*-білком у присутності *cAMP*, то негативна регуляція їх транскрипції відбувається індивідуально. Добре відомими прикладами такого роду регуляції є механізм регуляція транскрипції *Lac*-оперона *E.coli* під дією *Lac*-репресора, а також галактозного і арабінозного оперонів з їх специфічними білками-репресорами.

Деякі регуляторні елементи бактерій, які беруть участь в активації транскрипції, так само як і енхансери еукаріот (див. нижче), можуть розташовуватись на великій відстані (кількох сотень нуклеотидів) від промоторів, на які вони впливають. У цьому випадку контакт активатора з РНК-полімеразою забезпечується завдяки формуванню петлі з ділянки ДНК, розташованої між даними регуляторними елементами, що призводить до просторового зближення двох білків.

7.3. Модель регуляції експресії Lac-оперона E.coli за F.Jacob і J.Monod

Загальну теорію регуляції синтезу білку розробили François Jacob (1920-2013) і Jacques Lucien Monod (1910-1976). Ця теорія розглядає як процеси «вимкнення» або «ввімкнення» генів як функціонуючих

одиниць, так і можливість прояву їх здатності передавати закодовану в структурних генах ДНК генетичну інформацію для синтезу специфічних білків. Ця теорія, що доведена в дослідах на бактеріях, отримала широке визнання.

Відповідно до теорії F.Jacob і J.Monod в біосинтезі білку у бактерій беруть участь принаймні чотири типи генів: структурні гени, ген-промотор, ген-оператор і ген-регулятор (рис. 61). Структурні гени визначають первинну структуру білку, що синтезується. Саме ці гени в ланцюзі ДНК є основою для біосинтезу мРНК, яка потім поступає на рибосому і, як було вказано вище, служить матрицею для біосинтезу білку.

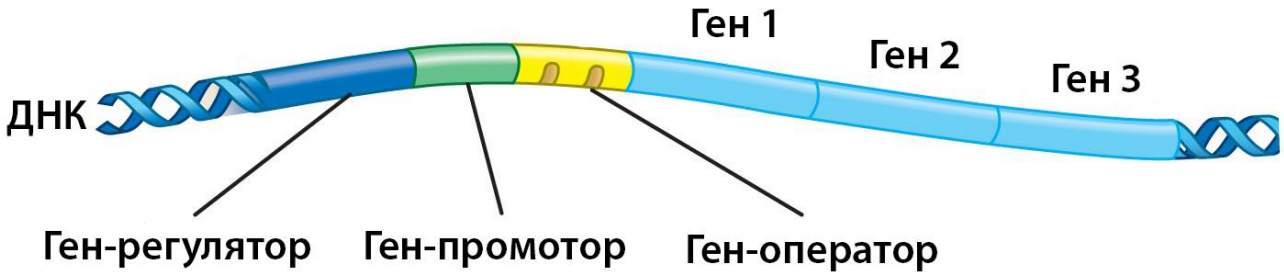


Рис. 61. **Загальна будова оперону прокаріот**

Синтез мРНК на структурних генах молекули ДНК безпосередньо контролюється певною ділянкою – геном-оператором. Він слугує наче пусковим механізмом для функціонування структурних генів. Ген-оператор локалізований на крайньому відрізку структурного гена або в межах гена-промотора. «Прочитування» генетичного коду, тобто формування мРНК, починається з промотора – ділянки ДНК, на якому розміщується РНК-полімераза, і далі поширюється послідовно уздовж оператора і структурних генів. Координований одним оператором поодинокий ген або група структурних генів утворює *оперон*.

У свою чергу діяльність оперону перебуває під контролюючим впливом іншої ділянки ланцюга ДНК – гена-регулятора. Оскільки структурні гени і ген-регулятор знаходяться в різних ділянках ланцюга ДНК, зв’язок між ними, як припускали F.Jacob і J.Monod, здійснюється за допомогою речовини-посередника, яким виявився білок, що названий *репресором*. Утворення репресора відбувається в рибосомах ядра на матриці специфічної мРНК, синтезованої на гені-регуляторі. Репресор має спорідненість з геном-оператором і, відповідно, здатний з’єднуватись з ним. Утворення такого комплексу призводить до блокування синтезу мРНК і, отже, синтезу білку. Тобто функція гена-

регулятора полягає в тому, що через білок-репресор він припиняє діяльність РНК-полімерази, яка у такому стані не синтезує мРНК на матриці структурних генів (рис. 62).

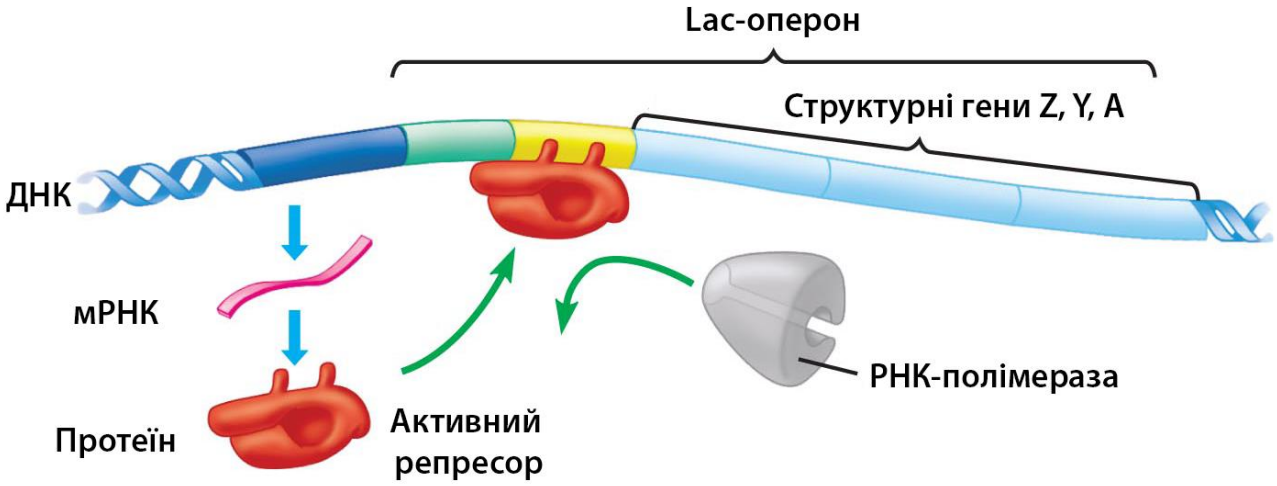


Рис. 62. ***Lac*-оперон у неактивносму стані**

Репресор, окрім того, має здатність суворо специфічно зв'язуватися з певними низькомолекулярними речовинами, які називаються *індукторами*, або *ефекторами*. Коли такий індуктор з'єднується з репресором, останній втрачає здатність зв'язуватися з геном-оператором, який таким чином виходить з-під контролю гена-регулятора, і починається синтез мРНК (рис. 63).

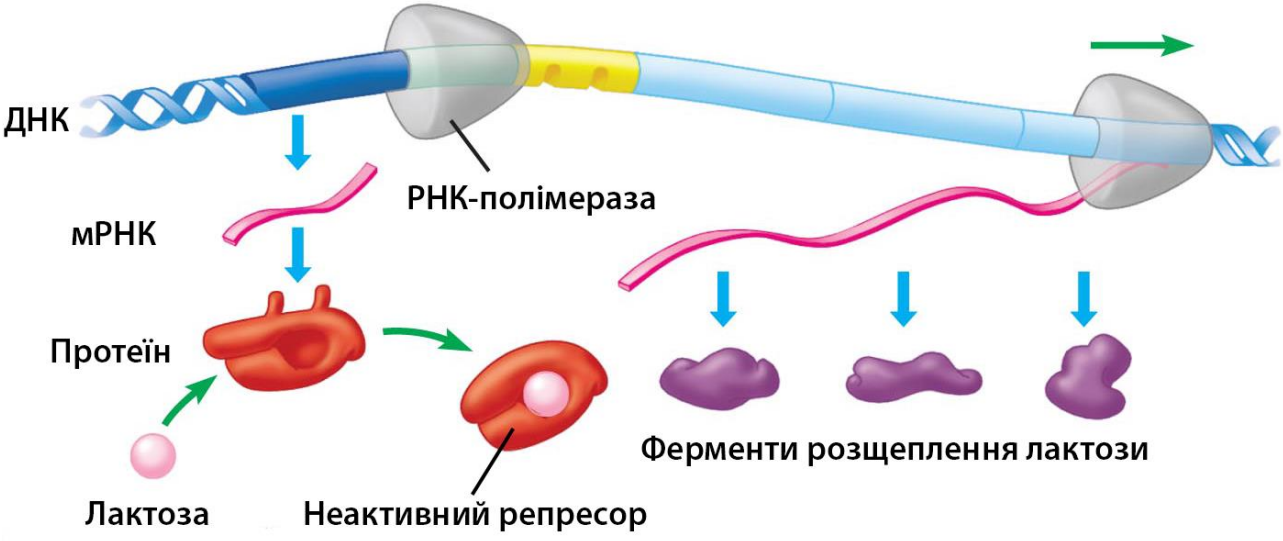


Рис. 63. **Активований *Lac*-оперон**

Механізм описаної регуляції синтезу білку і взаємовідношення репресора зі структурними генами було доведено в дослідах на *E.coli* на прикладі *Lac*-оперона, продуктом якого є фермент *β*-галактозидаза (лактаза), який гідролізує молочний цукор (лактозу) на глюкозу і

галактозу. Дикий штам *E.coli*, який зазвичай росте на глюкозі, не може розмножуватися, якщо замість глюкози в поживне середовище додати лактозу (нове джерело енергії і вуглецю) до тих пір, поки не будуть синтезовані відповідні ферменти (адаптивний синтез). При потраплянні до клітини лактози (індуктора), її молекули зв'язуються з білком-репресором і блокують контакт між репресором і геном-оператором. При цьому ген-оператор і структурні гени починають знову функціонувати і синтезувати необхідну мРНК, яка транслюється на рибосомах з утворенням трьох ферментів, залучених до розщеплення лактози. Одночасно, ген-регулятор продовжує виробляти репресор, але він блокується молекулами лактози, тому синтез ферментів триває. Як тільки молекули лактози будуть повністю розщеплені, репресор звільняється і, потрапивши на ДНК, зв'язує ген-оператор і блокує синтез мРНК, а отже, і синтез ферментів, які руйнують лактозу.

Таким чином, біосинтез мРНК, який контролює синтез білку на рибосомах, залежить від функціонального стану репресора. Якщо репресор знаходиться в активному стані, не пов'язаний з індуктором, то він, розміщується на гені-операторі і блокує синтез мРНК. При потраплянні метаболіта-індуктора до клітини його молекули зв'язують репресор, перетворюючи його на неактивну форму (чи, можливо, знижуючи його спорідненість до гену-оператору). Структурні гени виходять з-під блокуючого контролю і починають синтезувати потрібну мРНК. Такий механізм негативної форми контролю називається *позитивною індукцією*.

В інших випадках концентрація ряду ферментів у клітинах різко знижується при збільшенні концентрації кінцевих продуктів, які утворюються в ланцюзі послідовних ферментативних реакцій. Такий варіант негативної регуляції, що називається *негативною індукцією*, часто спостерігається в реакціях біосинтезу. У цих випадках молекули репресора, які також утворюються в рибосомах за «командою» гена-регулятора є неактивними і самі по собі не мають здатності пригнічувати діяльність гена-оператора, а отже і усього оперону. У даному випадку репресори набувають такої здатності після утворення комплексу з кінцевим або одним з кінцевих продуктів біосинтетичного процесу (рис. 64). Кінцевий продукт виступає, таким чином, як корепресор.

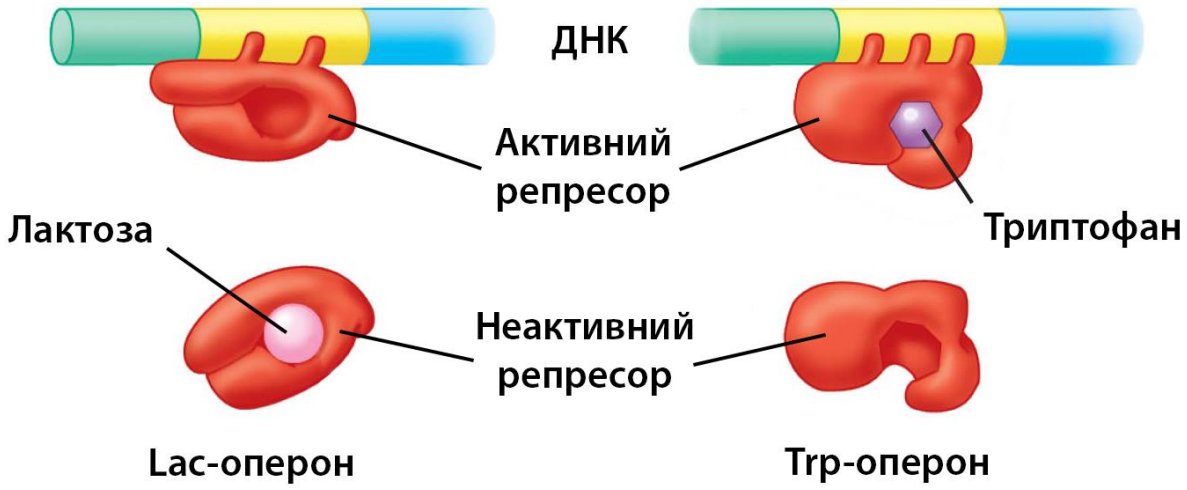


Рис. 64. **Позитивна (праворуч) і негативна (ліворуч) індукція експресії генів**

Є дані, які свідчать про те, що корепресором під час синтезу ферментів обміну амінокислот виступає не вільна амінокислота як кінцевий продукт біосинтетичної реакції, а її комплекс з тРНК – аа-тРНК.

7.4. Особливості регуляції експресії генів еукаріот

Незважаючи на те, що основні принципи регуляції транскрипції генів у про- і еукаріотичних організмів залишаються незмінними, даний процес у еукаріот характеризується низкою суттєвих особливостей. Це пов'язано, перш за все, з необхідністю підтримки координованої експресії еукаріотичних генів в більш складноорганізованній генетичній системі. Досить згадати, що в організмі людини гістологічно розрізняють, принаймні, 100 типів клітин, які формують його органи і тканини. Для будь-якого типу клітин характерний свій унікальний набір активних генів, які починають функціонувати під час диференціювання клітин-попередників. Крім того, сам процес формування органів і тканин супроводжується проліферацією (розмноженням) суворо певних груп клітин, а також упорядкованим у часі і просторі переміщенням клітин. Всі ці особливості життєдіяльності клітин вищих організмів забезпечуються функціонуванням їх генів.

Гени вищих організмів за функціональною ознакою поділяють на дві великі групи: «гени домашнього господарства» (англ. *Housekeeping Genes*) і «гени розкоші» (англ. *Luxury Genes*). До першої групи

належать гени, які функціонують практично в усіх тканинах і клітинах на відносно постійному рівні, на всіх стадіях життєвого циклу організму. Основними функціями даних генів є забезпечення процесів реплікації ДНК, транскрипції, трансляції, анаболізму і катаболізму (гліколіз, цикл Кребса, глюконеогенез, розщеплення білків, жирів і вуглеводів, біосинтез амінокислот і нуклеотидів, тощо). Гени, що відносяться до другої групи, експресуються лише у спеціалізованих клітинах і є маркерами диференційованих станів цих клітин.

Складність життєвого циклу багатоклітинних організмів накладає свої вимоги на особливості функціонування їх генів. Зокрема, велика кількість генів і навіть цілі їх блоки функціонують лише на певних стадіях ембріогенезу і не транскрибуються в клітинах дорослого організму.

Не менш унікальною здатністю еукаріот є здатність використовувати зміни структури хроматину для регуляції транскрипції своїх генів. За допомогою таких ефективних механізмів здійснюється репресія і дерепресія генів під час диференціювання клітин. Відповідний функціональний стан окремих генів, їх великих масивів і навіть цілих хромосом може підтримуватися протягом усього життя організму. Перебудови хроматину довкола регуляторних ділянок генів відбуваються і у зв’язку з більш тонкою регуляцією їх транскрипції.

Незважаючи на те, що зміна рівнів транскрипції генів є одним з найважливіших способів регулювання їх експресії, така стратегія – лише одна з багатьох, що використовуються еукаріотичними організмами для контролю біосинтезу, змісту і функціонування відповідних продуктів генів: білків або нуклеїнових кислот.

Механізми позитивної регуляції транскрипції. Первинна роль багатьох факторів транскрипції полягає в активації деяких груп генів у певних тканинах у відповідь на надходження специфічних сигналів, наприклад як наслідок дії стероїдних гормонів. Для досягнення даної мети конкретні фактори транскрипції повинні бути активні тільки в суворо детермінованих тканинах або у відповідь на появу відповідного сигналу. Включення фактора транскрипції до каскаду цих реакцій досягається двома шляхами: тканиноспецифічним синтезом відповідного білка або регуляцією активації білка-попередника в певному місці і в заданий час.

Регуляція транскрипції на рівні біосинтезу відповідних факторів, у багатьох випадках досягається шляхом відповідного управління

транскрипцією генів цих факторів. Очевидно, що такий спосіб контролю транскрипції не вирішує повністю проблеми регуляції експресії генів, оскільки передбачає необхідність наявності регуляторних генів, які впливають на транскрипцію генів факторів транскрипції, регульована експресія яких, у свою чергу, вимагає нових факторів, і так далі до нескінченності. У зв'язку з цим не є несподіваним, що регуляція експресії генів багатьох факторів транскрипції відбувається на посттранскрипційному рівні.

Білкові продукти генів багатьох специфічно діючих факторів транскрипції часто присутні в усіх тканинах, однак специфічний характер їх впливу досягається шляхом їх посттрансляційної активації у суворо визначеному місці або ж у відповідь на певний сигнал. Така регуляція активності факторів транскрипції передбачає три механізми (рис. 65):

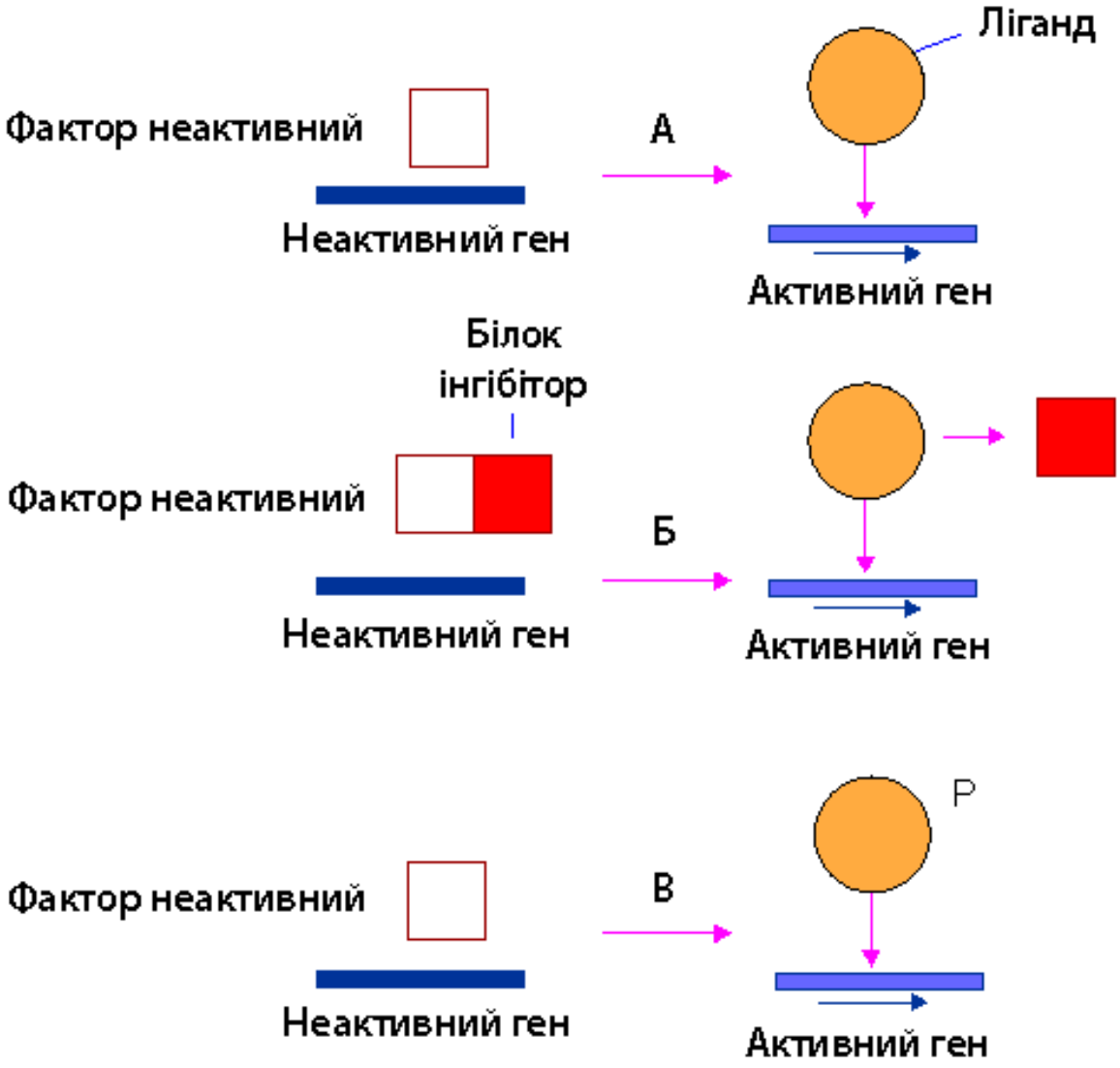


Рис. 65. **Механізми регуляції активності факторів транскрипції**

А) активація фактора транскрипції здійснюється після його зв’язування з лігандом. У цьому випадку ліганд, взаємодіючи з фактором, викликає конформаційні зміни його поліпептидного ланцюга, після чого цей фактор набуває здатність зв’язуватися з регуляторною ділянкою гена і активувати його транскрипцію;

Б) активація факторів транскрипції відбувається не в результаті конформаційної зміни їх просторової структури під дією лігандів, а, навпаки, шляхом руйнування лігандзалежної взаємодії між самим фактором і речовиною, яка його інактивує;

В) активація факторів транскрипції може здійснюватися під дією ковалентних модифікацій самих факторів у відповідь на появу специфічних сигналів.

До принципово іншого варіанту позитивного контролю транскрипції відносяться механізми функціонування регуляторних послідовностей нуклеотидів еукаріот – *енхансерів* – специфічних регуляторних послідовностей, які забезпечують високий рівень транскрипції певних генів після взаємодії з регуляторними білками. Енхансери представляють собою довгі послідовності нуклеотидів, які містять сайти зв’язування для декількох факторів транскрипції. Характерними властивостями енхансера, по-перше, є його здатність впливати на промотор на великих відстанях від нього (~ 60 т.п.н. і більше), по-друге, незалежність його активності від орієнтації відносно промотора, а також регульованого гена. Зокрема було встановлено, що енхансери можуть міститись перед промотором, між промотором і структурним геном, в інтронах самого гена, а також нижче гена.

Дослідження молекулярних взаємодій факторів транскрипції з енхансером призвело до розуміння того, що такі регуляторні послідовності є своєрідними матрицями для формування складних білкових комплексів, структура яких забезпечує високоспецифічні білок-білкові контакти і передачу регуляторних сигналів РНК-полімеразі II, яка знаходиться у складі ініціаційного комплексу. При цьому так звані *коактиватори транскрипції* є білками-адаптерами (медіаторами), які забезпечують перенесення регуляторного сигналу від тканиноспецифічних білків-активаторів транскрипції до РНК-полімерази II.

Наявність у еукаріот регуляторних білків-коактиваторів транскрипції пояснює одну зі сторін механізму дії енхансерів, розташованих дистально по відношенню до точки ініціації

транскрипції. У відповідності з цією концепцією дистальні і проксимальні регуляторні елементи промотора спочатку зближуються в результаті утворення петлі ДНК, яка їх розділяє, а потім утримуються разом коактиваторами транскрипції (рис. 66).

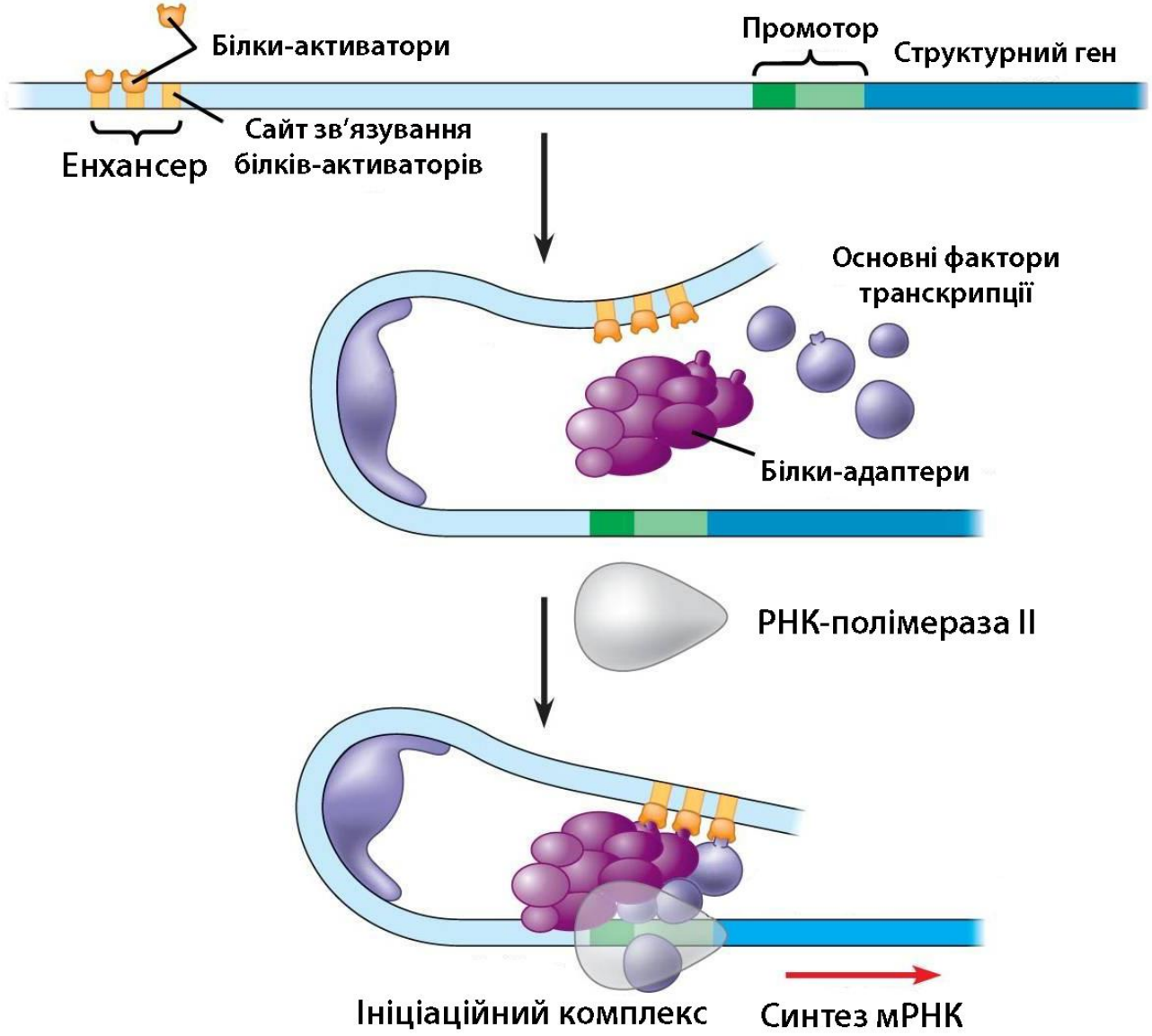


Рис. 66. **Механізм впливу енхансерів на транскрипцію генів**

Механізми негативної регуляції транскрипції. Негативна регуляція активності генів у еукаріот є настільки ж життєво важливим регуляторним механізмом, як і у бактерій. Припинення транскрипції окремих блоків генів необхідне при диференціюванні клітин в онтогенезі, а також при зміні рівнів синтезу РНК у відповідь на регуляторні зміни мікрооточення клітин.

Механізми негативної регуляції достатньо різноманітні. Пригнічення певних генів може досягатися за рахунок затримки в цитоплазмі відповідних факторів транскрипції. Активація факторів

транскрипції з пулу неактивних цитоплазматичних комплексів забезпечує швидку індукцію транскрипції у відповідь на зовнішні регуляторні сигнали.

Внутрішньоядерне блокування контакту активаторів транскрипції з відповідними регуляторними послідовностями на ДНК є ще одним широко поширеним механізмом негативної регуляції транскрипції в еукаріот. У деяких випадках негативно діючий фактор зв'язується з регуляторною послідовністю нуклеотидів, яка розташована по сусідству з позитивним регуляторним елементом або перекривається з ним. Це створює перешкоди для зв'язування активатора транскрипції зі своїм регуляторним елементом, що запобігає індукції синтезу РНК.

Деякі фактори транскрипції в процесі еволюційних перетворень набули здатності до білок-білкових взаємодій як в межах своєї родини, так і у перехресних реакціях з членами інших родин. Придушення транскрипції таким чином супроводжується утворенням специфічних комплексів між факторами транскрипції. При цьому в результаті утворення гетерогенних комплексів змінюються як ДНК-зв'язуюча активність факторів, так і їх здатність активувати транскрипцію шляхом маскування поверхонь для білок-білкових взаємодій.

Усі розглянуті вище способи негативної регуляції транскрипції по суті є пасивними, бо лише механічно втручаються в різні етапи її активації, порушуючи їх правильний хід. Тим часом, пригнічення транскрипції з використанням особливих регуляторних елементів, які називаються *сайленсери* – активний процес. У цьому випадку відбувається пряме пригнічення ініціації транскрипції шляхом руйнування транскрипційного комплексу на промоторі або за допомогою інактивації цього комплексу іншим способом.

Активність деяких сайленсерів, подібно з енхансерами, не залежить від орієнтації відносно певного промотора. Активність інших сайленсерів у різній мірі залежить від їх положення відносно регульованого промотора, орієнтації щодо нього, а також прямо пропорційна числу власних копій. Крім того, регуляторні білки, які зв'язуються із сайленсерами, крім ДНК-зв'язуючих доменів містять амінокислотні послідовності, що забезпечують білок-білкові взаємодії, які відповідають за здійснення негативної регуляції транскрипції.

7.5. Структура хроматину як регулятор експресії генів

Регуляція тканиноспецифічної експресії генів з використанням енхансерів і сайленсерів, а також деяких інших негативних регуляторних процесів, часто відбувається за механізмами, які принципово відрізняються від розглянутих вище. Йдеться про регуляторні ефекти, які реалізуються через зміну структури хроматину.

Інсулятори. Давно відомо, що перенесення гена або групи генів у гетерохроматинові (транскрипційно неактивні) ділянки хромосом часто супроводжується послабленням або припиненням його експресії (так званий ефект положення), і, навпаки, деякі гени після перенесення зберігають свою активність у гетерохроматиновому оточенні.

Дослідження цього явища привело до відкриття так званих прикордонних послідовностей нуклеотидів, які фланкують функціонально активні домени хроматину. Виявилося, що існують певні послідовності довжиною в кілька сотень пар нуклеотидів, які володіють здатністю пригнічувати позитивний або негативний вплив еухроматину і гетерохроматину на експресію генів. Фактично такі ділянки ДНК наче ізолюють ген, який знаходиться між ними, сприяючи збереженню його звичайної просторової структури, яка може відрізнятися від структури навколишнього хроматину. Ці послідовності відомі під назвою *інсуляторів* (англ. *Insulate* – ізолювати), а також як регуляторні області локусів (англ. *Locus Control Regions*, скорочено – *LCR*).

Дослідження інсуляторів виявили ще одну їх властивість – полярність дії. Інсулятори однонаправлено вимикають енхансери, розташовані дистально (на значній відстані) відносно регульованого промотора, але не поруч з ним (рис. 67). На додаток до цих функціональних властивостей інсуляторів показано, що вони здатні розділяти дві ділянки хроматину, які різко відрізняються за просторовою структурою. У цьому випадку з одного боку від прикордонної послідовності розташовується надкомпактизований хроматин, а за іншого – хроматин у відкритій конформації, яка характерна для транскрипційно активних генів.

До нині остаточно не вирішено питання щодо здатності SAR-послідовностей (див. вище), які поділяють функціональні домени хроматину, виконувати функції прикордонних послідовностей. Хоча вже відомо, що деякі із SAR-послідовностей не здатні пригнічувати

ефект положення, тим часом для інших аналогічних послідовностей така здатність була продемонстрована.

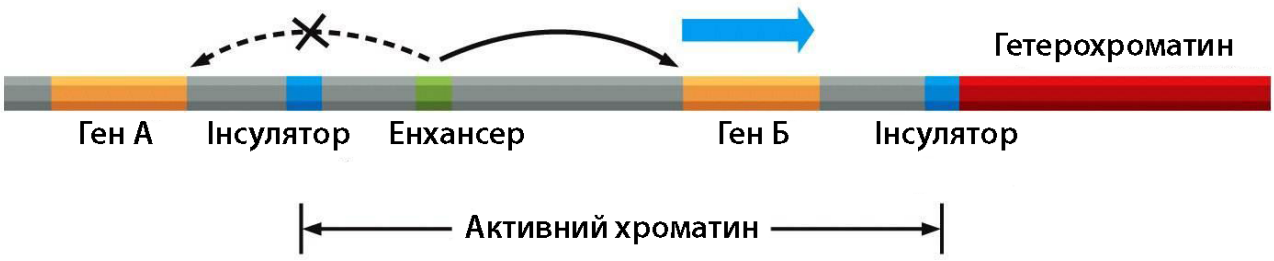


Рис. 67. **Механізм полярної дії інсулятора**

Інактивація Х-хромосом. Всі інактивовані Х-хромосоми володіють деякими загальними властивостями. Їх ДНК реплікується в пізній S-фазі клітинного циклу, а в інтерфазі вони присутні у вискоконденсованому стані у вигляді так званих тілець статевого хроматину (англ. *Sex Chromatin Bodies*), або тілець Барра. Все це відбувається на тлі низького рівня ацетилювання гістонів, а також участі нового гістона *macro H2A1*, що вказує на можливі зміни структури нуклеосом. В ембріональних соматичних клітинах плацентарних ссавців CpG-острівці (див. нижче) генів інактивованої Х-хромосоми метиловані. Велика частина перерахованих вище властивостей інактивованих Х-хромосом притаманна і звичайному гетерохроматину. Тому процес інактивації розглядають як гетерохроматизацію Х-хромосом.

Процес інактивації Х-хромосом починається на певній ділянці, яка називається *центром інактивації Х-хромосоми* (англ. X-*Inactivation Center*). У цій ділянці був ідентифікований ген *Xist* (англ. X *Inactive Specific Transcript*), транскрипція якого виключно необхідна для інактивації Х-хромосоми.

Незвичайною властивістю гена *Xist* є те, що він не кодує білки. У результаті його експресії утворюється велика РНК, довжина якої становить 15-17 т.нт. РНК після закінчення свого синтезу залишається в ядрі, а в клітинах, де Х-хромосома вже інактивована, ця РНК створює «оболонку» навколо неактивної хромосоми. Під час диференціювання клітин зона змісту *Xist*-РНК розширюється вздовж майбутньої неактивній хромосоми на тлі збільшення її кількості. Одночасно різко зменшується рівень експресії гена *Xist* на хромосомі, що залишається активною.

Механізм розповсюдження зони неактивного хроматину уздовж Х-хромосом від центру інактивації поки залишається незрозумілим. Вважають, що для Х-хромосом характерна наявність додаткових специфічних послідовностей, необхідних для їх ефективної гетерохроматізації при інактивації.

7.6. Метилування ДНК у регуляції експресії генів

Єдиною відомою генетично запрограмованою ковалентною модифікацією ДНК у вищих еукаріот є метилування залишків цитозину в положенні 5 з утворенням 5-метилцитозину (5-mC). Ця реакція каталізується ферментом (*цитозин*-5)-*ДНК-метилтрансферазою* (*Мтазою*), який виявлений у прокаріот і еукаріот (рис. 68).

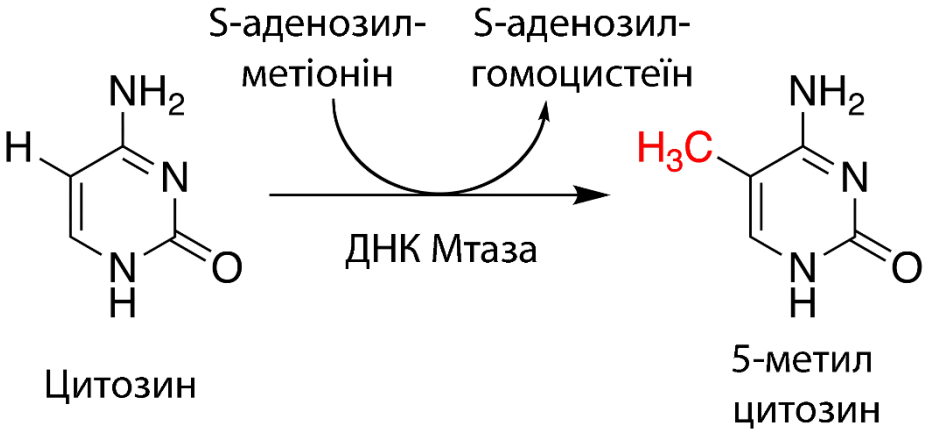


Рис. 68. **Метилування цитозину**

Більшість прокаріотичних Мтаз здатні метилувати ДНК *de novo*, розпізнаючи неметиловані паліндромні гексануклеотидні послідовності. Вони також метилують послідовності, у яких один ланцюг ДНК вже містить метильні групи. На відміну від цього еукаріотичні Мтази відносяться до «підтримуючих» ферментів, які метилують тільки напівметиловані послідовності, що формуються внаслідок реплікації ДНК, коли новий ланцюг неметилований. У ссавців залишки цитозину метилуються переважно у складі динуклеотидів CpG, проте останнім часом описані випадки метилування і послідовностей CpNpG (N – будь-який нуклеотид).

«Підтримуючі» Мтази тварин володіють слабкою здатністю здійснювати метилування ДНК *de novo*, а також штучних субстратів (олігонуклеотидів), які містять помилково спарені основи. Залишається незрозумілим, чи є зазначена властивість Мтаз

достатньою для здійснення метилування *de novo* великих ділянок геному в ембріогенезі або ж цей процес відбувається за участю інших ферментів.

Метилування залишків цитозину може впливати на транскрипцію як безпосередньо через зміну ефективності зв'язування позитивних і негативних факторів транскрипції зі своїми регуляторними ділянками на ДНК, так і опосередковано через формування неактивних в транскрипційному відношенні ділянок хроматину.

Активація генів, які входять до складу неактивного хроматину, вимагає зміни його структури і деметилування ДНК. Виявлено білкові комплекси, які здатні реактивувати неактивний хроматин. Деметилування може відбуватися пасивно через придушення функціонування «підтримуючих» Мтаз. У цьому випадку дочірні ланцюги ДНК, які утворюються в процесі реплікації, залишаються неметилованими, що призводить до повної деметилізації ДНК після двох раундів реплікації. Активне деметилування ДНК відбувається за участю специфічних ферментів – *деметилаз*.

Для різних органів і тканин організму характерні специфічні набори (патерни) метилованих послідовностей ДНК. Такий мозаїцизм в метилуванні послідовностей геному не є наслідком одних тільки помилок функціонування системи метилування, оскільки патерни метилування ДНК в гомологічних тканинах різних індивідуумів володіють великою схожістю. У зв'язку з цим можна говорити про тканиноспецифічний характер метилування ДНК, який забезпечується координованим функціонуванням системи метилаз і деметилаз в онтогенезі організму. Окрім того, вважають, що до цих процесів залучені гени-регулятори, які визначають диференційований стан клітин. Такі гени, у свою чергу, індукують експресію всіх інших генів, необхідних для підтримки певного диференційного стану клітин. Експресія конкретних домінантних генів, відповідальних за диференціювання окремих груп клітин в певному напрямку, повинна жорстко контролюватися і бути блокованою в клітинах інших типів. Метилування ДНК здатне забезпечувати такий неактивний стан генів диференціювання і підтримувати його у ряді клітинних поколінь, тобто контролювати стабільність диференційного стану соматичних клітин організму.

Окрім того, було висловлено припущення про те, що метилування ДНК в еукаріот може виконувати захисну функцію, оберігаючи організм від чужорідної ДНК і надлишку ендогенних повторюваних

послідовностей. Оскільки в еукаріот не знайдено ферменти рестрикції, специфічні до GpC-послідовностей, передбачається, що такі захисні механізми здійснюють інактивацію чужорідної ДНК, а не її деградацію, як у бактерій. Експериментально встановлено, що ДНК із зовнішніх джерел, наприклад вірусна ДНК або ендогенна ДНК ретротранспозонів і повторюваних послідовностей можуть бути об'єктом метилування *de novo*, що приводить до їх генетичної інактивації.

7.7. Інгібітори біосинтезу білка

Одним зі шляхів з'ясування механізмів синтезу нуклеїнових кислот і білків в клітинах є використання таких лікарських препаратів, які могли б вибірково гальмувати ці процеси у бактерій, не впливаючи на організм людини. Деякі препарати дійсно мають таку дію, проте багато з них виявляються токсичним і для людини. Нині в медичній практиці застосовуються багато антибіотиків, частина з яких буде розглянута нижче з метою з'ясування механізму їх дії на ключові хімічні реакції синтезу білку і нуклеїнових кислот (рис. 69).

Пуроміцин. Цей антибіотик є похідним нуклеозидів і є структурним аналогом 3'-кінцевої аміноацильної групи тРНК. Було показано, що пуроміцин на конкурентній основі заміщає чергову аміноацил-тРНК в А-сайті рибосом під час трансляції. Він бере участь в акті утворення пептидного зв'язку в рибосомі, підміняючи при цьому чергову аміноацил-тРНК. У ході реакції транспептидації відбувається перекидання С-кінця зростаючого пептиду від пептидил-тРНК на вільну аміногрупу аміноацильного залишку пуроміцину, що призводить до звільнення пептидил-пуроміцину з рибосом і припинення біосинтезу білка. Пуроміцин однаково добре пригнічує біосинтез білку у про- і еукаріот.

Хлорамфенікол. Ділянка лабільного зв'язування цього антибіотика локалізована на 50S-субодиниці рибосом. Хлорамфенікол повністю пригнічує реакцію пуроміцину з пептидил-тРНК, виступаючи його конкурентним інгібітором. При цьому синтез пептиду повністю припиняється, і він лишається зв'язаним з рибосомами. Місцем дії хлорамфеніколу є А-ділянка 50S-субодиниці рибосом, де антибіотик конкурує з аміноацильним кінцем молекули аміноацил-тРНК, перешкоджаючи її входженню в А-ділянку, що супроводжується пригніченням біосинтезу білка. На відміну від

пуроміцину хлорамфенікол пригнічує тільки бактеріальні рибосоми. Подібним механізмом дії характеризуються антибіотики лінкоміцин і спарсоміцін. Останній робить асоціацію пептидил-тРНК з Р-ділянкою рибосом більш міцною. При цьому хлорамфенікол і лінкоміцин здатні витісняти спарсоміцін з рибосоми.

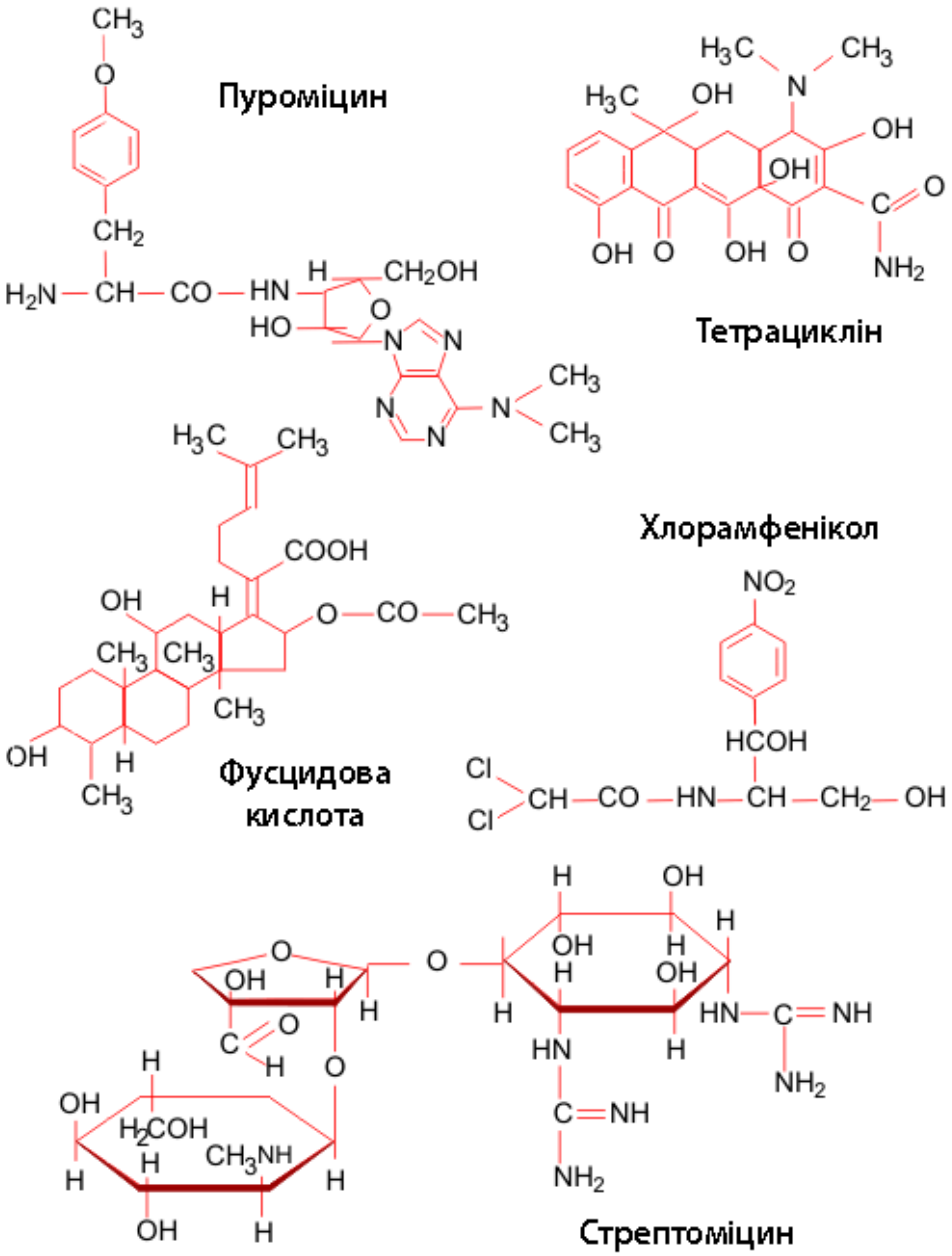


Рис. 69. **Антибіотики, які пригнічують синтез білку**

Фусидова кислота – антибіотик стероїдної природи, блокує біосинтез білка на стадії транслокації. Його мішенню є білковий фактор *EF2* (*EF-G*), який необхідний для GTP-залежної транслокації. Мабуть, антибіотик перешкоджає дисоціації зазначеного комплексу і, відповідно, транслокації. За тим же механізмом фусидова кислота пригнічує трансляцію еукаріотичними рибосомами.

Тетрацикліни. Антибіотики тетрациклінового ряду специфічно зв'язуються з 30S-субодиницею рибосом, пригнічуючи реакцію аміноацил-тРНК з рибосомами і вільними 30S-субодиницями у присутності матриці, але не порушуючи зв'язування самого матричного полінуклеотиду. Припускають, що тетрацикліни взаємодіють з акцепторним тРНК-зв'язуючим сайтом 30S-субодиниці рибосом.

Стрептоміцин та інші аміноглікозидні антибіотики специфічно взаємодіють з певним структурним білком 30S-субодиниці рибосом, блокуючи стадію ініціації трансляції. У присутності стрептоміцину спостерігається стимуляція зв'язування аміноацил-тРНК, які не відповідають кодонам мРНК, що розташовуються в даний момент в акцепторній А-ділянці рибосом. У результаті відбувається помилкове включення амінокислот у поліпептидні ланцюги, що будуються. Аміноглікозидні антибіотики також викликають неспецифічне зв'язування матричних полінуклеотидів рибосомами. Наслідком є, наприклад, трансляція одноланцюгових ДНК рибосомами в безклітинних системах у присутності аміноглікозидів.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. Чому регуляція експресії генів у більшості випадків відбувається на рівні транскрипції?
2. У яких випадках регуляція експресії генів здійснюється не на стадії транскрипції, а на інших рівнях?
3. Які види регуляторних білкових факторів існують у прокаріот?
4. У чому особливість прояву регуляторної активності *CPR*-білку?
5. Вкажіть типи генів, які беруть участь у біосинтезі білку в бактерій?
6. Вкажіть функції, які виконують кожна із складових оперону.
7. Вкажіть механізми регуляції активності факторів транскрипції еукаріот.
8. Яка роль енхансерів у процесі регулювання експресії еукаріот?
9. Вкажіть, які існують механізми негативної регуляції транскрипції еукаріот.
10. Яку функцію виконують сайленсери в процесах регуляції транскрипції еукаріот?

8. Захист і відновлення спадкового апарату

8.1. Загальні відомості

Існування біологічних видів цілком залежить від точності передачі генетичної інформації як по вертикалі – від батьків нащадкам, так і по горизонталі – від однієї соматичної клітини до іншої в процесі онтогенетичного розвитку багатоклітинних організмів. У попередніх розділах були розглянуті основні механізми функціонування головної генетичної системи, яка забезпечує відтворення генетичної інформації шляхом подвоєння молекул ДНК, – системи реплікації, точність функціонування якої вражає уяву. Для правильної передачі генетичної інформації виключно важливі і молекулярні механізми, які забезпечують розходження хромосом, які розділились, між дочірніми клітинами у про- і еукаріот, в останньому випадку при мітозі і мейозі. Проте жодна з існуючих генетичних систем не працює безпомилково. Тому не менш важливу роль у життєдіяльності організму відіграє його система *репарації* (виправлення) помилок, які випадково виникають при реплікації ДНК і після її завершення.

У проблеми точності передачі генетичної інформації в ряді поколінь клітин і організмів є й інша сторона. Надмірна консервація генетичної інформації, укладеної в окремих генетичних локусах, може бути шкідливою для організму і виду в цілому. Абсолютний консерватизм у передачі генетичної інформації по вертикалі зробив би неможливим філогенетичний розвиток організмів, їх еволюційні перетворення, які призвели, зрештою, до тієї різноманітності біологічних видів, які сьогодні спостерігається в природі. Еволюційно сформовані відносини між точністю функціонування вищезазначених генетичних систем і частотою помилок, що виникають при відтворенні генетичної інформації окремих генетичних локусів, чітко збалансовані між собою, і вже встановлено, що в ряді випадків є регульованими. Запрограмовані і випадкові успадковані зміни геному, які називають *мутаціями*, можуть супроводжуватися колосальними кількісними та якісними змінами в експресії генів.

Мутації – це успадковувані зміни структури генома. Оскільки основу будь-якого геному складають нуклеїнові кислоти – ДНК або РНК, то під дією мутацій відбувається, перш за все, зміна структури геномних нуклеїнових кислот. Процес виникнення мутацій, заснований на різних механізмах, називають *мутагенезом*. У

класифікації, заснованої на розмірах сегментів геному, які піддаються перетворенням, мутації поділяють на *геномні*, *хромосомні* і *генні*. Геномні мутації пов'язані зі зміною кількості хромосом в генотипі. Хромосомні мутації (аберації) характеризуються суттєвими перебудовами структури окремих хромосом. На генному рівні зміни первинної структури ДНК генів під дією мутацій менш значні, ніж при хромосомних мутаціях, однак генні мутації зустрічаються більш часто. Зупинимось на цій групі більш детально.

За впливом на експресію генів мутації поділяють на дві категорії: мутації типу *зсуву рамки зчитування* (англ. *Frameshift*) і типу *замін пар основ*. Перші являють собою делеції (випадіння) або інсерції (вставки) нуклеотидів, кількість яких не кратна трьом, що пов'язано з триплетністю генетичного коду. Друга група характеризується заміною одного нуклеотиду в ланцюзі ДНК на інший. У такому випадку, коли під дією мутації змінюється лише один нуклеотид, говорять про *точкову мутацію*. Оскільки до складу ДНК входять азотисті основи тільки двох типів – пуринів і піримідинів, всі точкові мутації із заміною основ поділяють на два класи: транзіції (заміна пурину на пурин або піримідину на піримідин) і трансверсії (заміна пурину на піримідин або навпаки). Через виродженість генетичного коду можуть бути три генетичних наслідки точкових мутацій: збереження сенсу кодону (сеймсенс-мутація), зміна сенсу кодону, що приводить до заміни амінокислоти у відповідному місці поліпептидного ланцюга (міссенс-мутація) або утворення безглуздого кодону з передчасною термінації (нонсенс-мутація).

Окрім того, в результаті генних мутацій також відбуваються заміни, делеції, інсерції декількох нуклеотидів, транслокації (зміна положення), дуплікації (подвоєння) та інверсії (зміна орієнтації) різних частин гена.

8.2. Основні мутагенні чинники

В основі мутацій на молекулярному рівні лежать дві основні причини: помилки реплікації і мутагенний вплив різної природи. Помилки реплікації виникають через те, що точність функціонування ДНК-полімерази не є абсолютною. Оскільки вибір чергового нуклеотиду для включення в зростаючий ланцюг ДНК визначається внаслідок взаємодії білків і ферментів системи реплікації і матричної ДНК, зміна властивостей цих білків або матриці як спонтанно, так і під

дією різних модифікуючих агентів може призводити до помилок у реплікації ДНК і мутацій.

Помилки реплікації. Синтез ДНК відбувається в результаті послідовного ферментативного приєднання дезоксирибонуклеозид-трифосфатів, комплементарних матричній ДНК, до 3’-кінцевого нуклеотиду ланцюга ДНК, що синтезується. Точність цього процесу визначається відмінностями у вільній енергії у канонічних або помилкових пар азотистих основ ДНК, що утворюються за правилами комплементарності. При цьому точність реплікації орієнтовно становить не більше одного помилково включеного нуклеотиду на кожні 100 нуклеотидів. Частота помилок реплікації збільшується через спонтанні ушкодження геномної ДНК, які виникають у результаті її депуринізації у фізіологічних умовах. Депуринізація є наслідком розриву N-глікозидного зв’язку, який з’єднує в молекулі ДНК пуринові основи із залишками дезоксирибози.

Більшість бактеріальних та еукаріотичних ДНК-полімераз, які здійснюють реплікацію ДНК, мають 3’→5’-екзонуклеазну корегуючу активністю, і тому помилково включені нуклеотиди, які некомплементарні матриці, видаляються з 3’-кінця ланцюга ДНК перед включенням наступного нуклеотиду при синтезі цього ж ланцюгу. Наявність у ДНК-полімеразних комплексів такої активності істотно підвищує точність функціонування систем реплікації.

Мутагенні впливи. Зусиль систем реплікації стає недостатньо в стресових ситуаціях, коли організм піддається масованому мутагенному впливу. Однак, навіть присутність незначної кількості мутагенів у навколишньому середовищі викликає безперервне накопичення мутацій у геномі соматичних клітин, хоча і з невеликою швидкістю. Процес накопичення мутацій, які уникли корекції системами репарації, є кумулятивним – до раніше існуючих мутацій неухильно додаються нові, і сумарна кількість мутацій у геномі (генетичний вантаж) зростає. Оскільки мутації часто є причиною спадкових і набутих захворювань, важливо робити статистичний прогноз частоти виникнення певних захворювань в популяціях, для яких відома мутагенна екологічна обстановка.

Мутагенне випромінювання. Яскраво вираженою мутагенною дією володіють короткохвильове електромагнітне випромінювання (УФ-світло, рентгенівські промені), а також елементарні частинки, що утворюються в процесі радіоактивного розпаду речовини.

Електромагнітне випромінювання або елементарні частинки, які проходять крізь речовину, передають свою енергію її атомам. У результаті зіткнень нейтральні атоми перетворюються в позитивно заряджені іони. Звільнені електрони при переміщенні викликають утворення нових іонів до тих пір, поки їх енергія не вичерпається і вони не втратять свою іонізуючу здатність. Одиницею дози випромінювання слугує *рентген* (Р) – кількість випромінювання, яке викликає утворення 2×10^9 пар іонов/см^3 повітря. На практиці часто користуються одиницею *рад*, який служить мірою поглинання енергії. У повітрі 1 Р еквівалентний 0,876 рад.

Хімічні мутагени. Багато хімічних сполук, які зустрічаються в навколишньому середовищі, мають здатність взаємодіяти з ДНК або з її низькомолекулярними попередниками і викликати мутації.

Одним з найбільш великих класів хімічних мутагенів екзогенного походження є алкілуючі агенти, під дією яких відбувається спонтанне (без участі ферментативних систем організму) перенесення алкільних груп цих хімічних сполук на біологічні макромолекули, в тому числі і ДНК.

Мутагенну дію також мають різні *органічні пероксиди*. Сам пероксид водню не зумовлює мутагенного ефекту, але стає сильним мутагеном у поєднанні з формальдегідом або ацетоном, у котрих індукує утворення вільних радикалів.

Барвники, які здатні з'єднуватись з основами ДНК, викликають мутації із зсувом рамки зчитування. До таких фарбників, зокрема відносяться добре відомі бромистий етидій і похідні акридину.

Існує безліч хімічних сполук, які самі по собі не проявляють мутагенної активності, але набувають її після серії біохімічних перетворень всередині організму під дією його ферментних систем. Такі хімічні сполуки отримали назву *промутагенів*, а процес їх ферментативного перетворення в мутагени – *метаболічною активацією*.

Список хімічних мутагенів екзогенного походження далеко не вичерпується перерахованими хімічними сполуками. У міру поглиблення досліджень число відомих мутагенів безперервно зростає. Відомо, що майже всі мутагени одночасно є *канцерогенами* – речовинами, які викликають виникнення злоякісних пухлин, хоча зворотне твердження не завжди вірно. Все це пояснює необхідність збереження чистоти довкілля людини, тварин і рослин.

На жаль, не тільки навколишнє середовище може бути джерелом генотоксичних хімічних сполук, які отруюють життя організму і порушують функціонування його геному. Вільні радикали, які утворюються в організмі під час нормального метаболізму, можуть бути додатковою і суттєвою причиною спонтанних мутацій.

Окрім того, молекули ДНК часто зазнають *in vivo* теплової депуринізації, яка може бути спонтанним внутрішнім джерелом змінених нуклеотидів. Іншим джерелом ендогенних мутацій слугує самовільне дезамінування цитозину у складі ДНК з утворенням урацилу. Також відомо, що 5-метилцитозин – одна з модифікованих основ ДНК, являє собою «гарячу точку», оскільки в результаті його спонтанного дезамінування, утворюється нормальна основа Т, яка не розпізнається системами репарації як мутантна.

Таким чином, численні мутагени екзогенного і ендогенного походження створюють навколо і всередині будь-якого багатоклітинного організму той мутагенний фон, до якого він змушений пристосовуватися в процесі еволюції. Мутагенний фон «середовища існування» інформаційних макромолекул і, перш за все, ДНК унікальний для кожного виду живих організмів у силу особливостей їх метаболізму та умов життя. Відповідно до цього кожен біологічний вид для того щоб вижити, тобто знизити частоту мутацій в конкретних генах до прийнятного рівня, володіє системами захисту від мутацій певної ефективності.

Механізми захисту геному від мутацій. Незважаючи на те що іноді мутації допомагають організму вижити, виступаючи однією із рушійних сил еволюції, переважна більшість мутаційних змін геному є небажаною і супроводжується розвитком різних патологічних станів мутантної особини або окремої соматичної клітини.

Жорстко діючий природний відбір, зокрема, через систему імунного нагляду елімінує (знищує) мутантні соматичні клітини, небезпечні для існування багатоклітинного організму, наприклад іноді запобігаючи розвитку онкологічних або аутоімунних захворювань. Однак, до набагато більш плачевних наслідків призводить елімінація природним відбором цілої мутантної особини, осільки це супроводжується непродуктивною загибеллю великої кількості соматичних клітин і є марнотратним з точки зору енергетичних витрат на їх біосинтез. Генетична інформація будь-якого організму ретельно захищена від мутаційних ушкоджень, що робить мутації в життєво

важливих локусах геному дуже рідкісними. Захист здійснюється на декількох рівнях:

1. По-перше, організм намагається не допустити потрапляння хімічних мутагенів у життєво важливі локуси свого геному. Це досягається двома шляхами:
   - надлишкові послідовності нуклеотидів ДНК, екрануючи кодуючі послідовності нуклеотидів у геномі еукаріот, приймають удар більшої частини хімічних мутагенів на себе, не допускаючи тим самим їх потрапляння на структурні гени;
   - такі ж результати можуть бути досягнуті за рахунок особливої просторової організації ДНК у конкретних ділянках геному.
2. По-друге, в клітинах є численні високо- і низькомолекулярні пастки мутагенів, найважливішими з яких є: маніт, енкефаліни, індоли, жовчні кислоти і їх похідні, α-токоферол, аскорбінова кислота, тирозин, серотонін, а також ряд інших сполук екзогенного та ендогенного походження.

На жаль, обидві системи захисту не володіють 100%-ю ефективністю. Те ж можна сказати і про точність функціонування ферментних систем, які здійснюють відтворення генетичної інформації. Тому численні порушення первинної структури ДНК неминучі. Тим не менш, більшість первинних пошкоджень не перетворюється на мутації завдяки функціонуванню високоефективних систем репарації ДНК, які складаються з багатьох ферментних компонентів.

8.3. Особливості репарації ДНК після пошкоджень

Велика група молекулярно-генетичних явищ, відома нині під загальною назвою «репарація пошкоджень ДНК», була усвідомлена як окремий і дуже важливий біологічний феномен лише наприкінці 1950-х років. *Репарація* (лат. *Reparatio* – відновлення) – особлива функція клітин, яка полягає в здатності виправляти хімічні пошкодження і розриви в молекулах ДНК, які виникають при нормальному біосинтезі ДНК у клітині або в результаті впливу фізичних чи хімічних агентів.

До основних типів пошкодження ДНК належать наступні групи:

- помилкове включення або випадіння нуклеотидів, що призводить до утворення неправильно спарених основ і петель різних розмірів;
- пошкодження одиничних нуклеотидів або пари нуклеотидів, які

виникають через хімічні модифікації нуклеотидів, включаючи їх руйнування і утворення поперечних зшивок між основами одного або різних ланцюгів;

- одно- або дволанцюгові розриви ДНК.

Окрім того, що пошкодження ДНК часто є причиною мутацій, вони ще можуть призводити до затримки та повного блокування реплікації і транскрипції.

Нині описано багато реакцій репарації. Одні більш прості і відбуваються одразу після мутагенного впливу, інші вимагають індукції синтезу нових ферментів і тому тривалі в часі. Деякі реакції йдуть до того, як клітини вступлять в нову фазу поділу, інші можуть здійснюватися і після того, як клітина закінчила поділ (при цьому частина пошкоджень в геномі зберігається невідрепарованою). Є абсолютно кардинальні реакції, коли клітини «намагаються» врятувати своє життя ціною введення нових мутацій. Систематизація наявних даних про репарацію дозволила всі відомі системи об'єднати в три групи:

Пряма репарація – найбільш простий шлях усунення пошкоджень у ДНК, у якому зазвичай задіяні специфічні ферменти, що здатні швидко (як правило, в одну стадію) усувати відповідне пошкодження, відновлюючи вихідну структуру нуклеотидів. До цієї групи відносять фотореактивацію піримідинових димерів; репарацію ДНК за рахунок 3'-5'-екзонуклеазної активності ДНК-полімераз; репарацію одноланцюгових розривів ДНК за допомогою полінуклеотидлігази; репарація АР-сайтів; генетична репарація пошкоджень, викликаних алкільними групами, шляхом видалення цих груп специфічними ферментами.

Ексцизійна репарація (англ. *Excision* – вирізання) включає видалення пошкоджених азотистих основ або цілих нуклеотидів з ДНК і подальше відновлення нормальної структури молекули.

Постреплікативна репарація – тип репарації, який має місце в тих випадках, коли процес ексцизійної репарації недостатній для повного виправлення пошкоджень: після реплікації з утворенням ДНК, що містить пошкоджені ділянки, утворюються одноланцюгові проломи, які заповнюються в процесі гомологичної рекомбінації. Це єдиний тип репарації, який не має етапу розпізнавання ушкодження, тобто відбувається конститутивно.

Варто відмітити, що різні механізми репарації характеризуються здатністю корегувати однакові пошкодження ДНК.

8.4. Механізми прямої репарації ДНК

Фотореактивація (англ. *Photoreactivation* – *PHR*). У 1949 р. Albert Kellner і в 1950 р. Renato Dulbecco (1914-2012) встановили, що життєздатність актиноміцетів і бактерій, опромінених летальними дозами ультрафіолету, відновлюється, якщо потім впливати на них видимим світлом. У зв'язку з цим таке явище було названо фотореактивацією. Її ефективність залежить від рівня pH, температури і фізіологічного стану клітини. Відновлювальний ефект при фотореактивації пов'язаний з дією ферменту – *дезоксирибозидпіримідинфотоліази* (*фотоліази*), який являє собою поліпептид, асоційований з невеликою молекулою РНК (10-15 нуклеотидів), яка зумовлює його активність.

При вивченні хімії процесу пошкодження нуклеїнових кислот УФ-світлом виявилось, що подвійний зв'язок між п'ятим і шостим атомами вуглецю в складі піримідинових може руйнуватись при цьому атоми залишаються пов'язаними одиночним зв'язком і утворюються дві вільні валентності. Якщо відбувається аналогічний процес на сусідньому піримідині, то можлива реакція їх об'єднання з утворенням або циклобутанового димеру, або піримідин-(6-4)-піримідинових фотопродуктів (рис. 70). Залежно від того, які основи з'єднані в димер, їх називають димерами тиміну, димерами цитозину або тимін-цитозинових димерами.

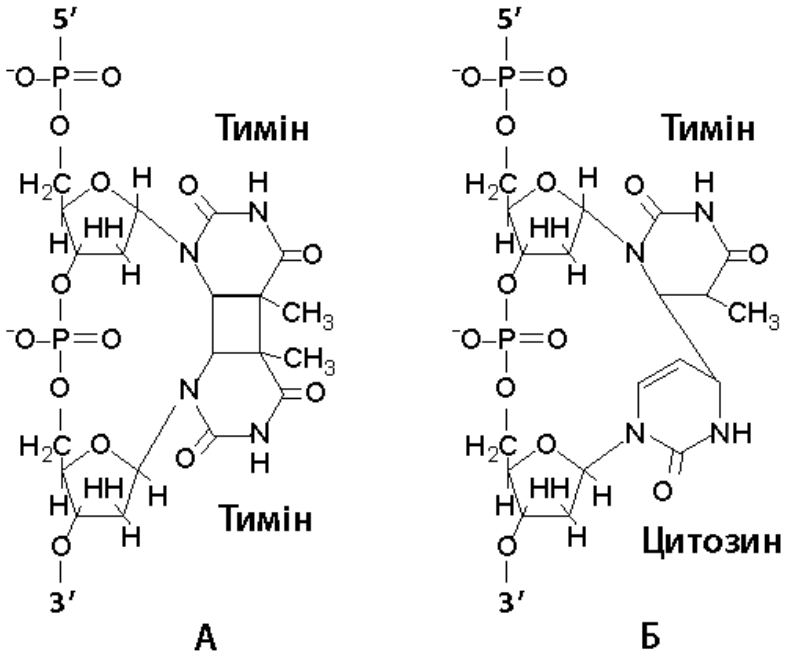


Рис. 70. **Ділянка ДНК з піримідиновими фотопродуктами**
А – тиміновий димер циклобутанового типу; Б – тимін-цитозиновий 6-4-димер

Суть фотореактивації полягає в тому, що фотоліаза розщеплює знову створений зв'язок між сусідніми піримідиновими основами і відновлює нативну структуру ДНК. При цьому фермент здатний приєднуватись до піримідинових димерів і в темряві, і на світлі, але реакція розщеплення зв'язків енергетично залежить від дії видимого світла (рис. 71). Було з'ясовано, що фотоліаза має світлочутливий центр, який здатний адсорбувати кванти світла, причому найбільша ефективність фотореактивації відзначена для блакитної частини видимого спектру. Після активації фотоліази світлом відбувається розрив ковалентних зв'язків між піримідиновими димерами і, таким чином, відновлюється первинна структура ДНК. Після цього фермент від'єднується від ДНК. Пряме відновлення структури ДНК на цьому завершено. За 1 хвилину молекула фотоліази може розщепити 2-4 димери.

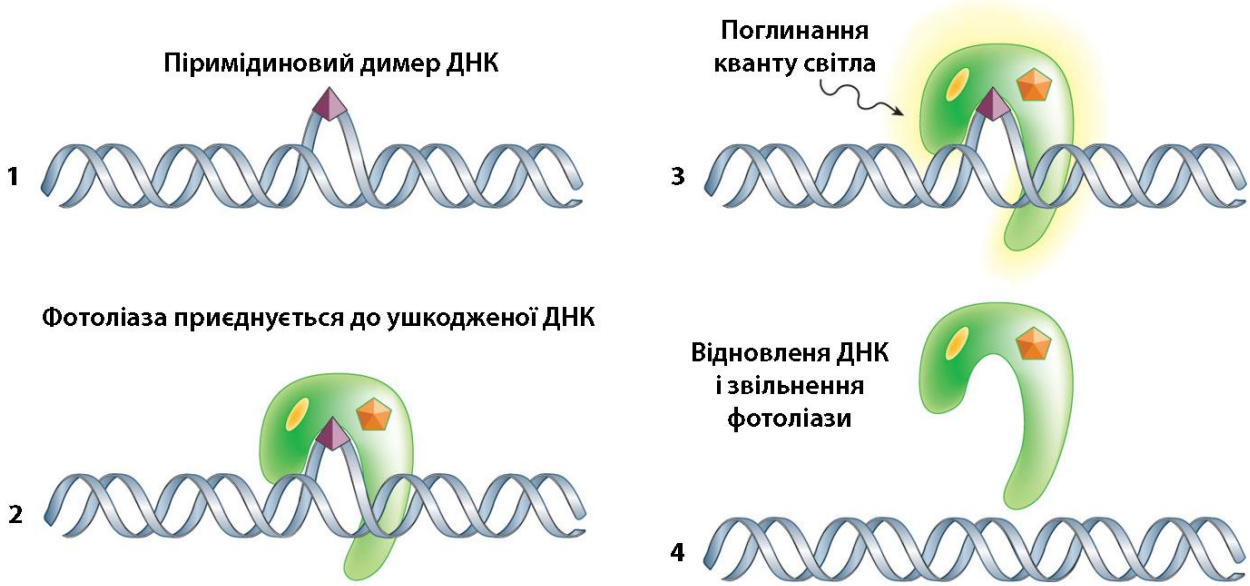


Рис. 71. **Механізм фотореактивації піримідинового димеру**

Фотореактивація поки єдина відома ферментна реакція, в якій фактором активації слугує не хімічна енергія, а енергія видимого світла. Всі інші типи репарації не вимагають активації світлом і тому спочатку носили спільну назву «темнова репарація». Зараз цей термін практично не використовується.

Аутокорекція ДНК-полімеразами (кореплікативна репарація). Для запобігання помилкового парування більшість ДНК-полімераз володіють здатністю до самокорекції. Коригувальний механізм полягає в тому, що перед приєднанням кожного наступного нуклеотиду до зростаючого ланцюгу ДНК, фермент «перевіряє» правильність парування попереднього нуклеотиду. Якщо нуклеотиди

спаровані вірно (відповідно до принципу комплементарності), полімераза приєднує наступний нуклеотид, який згодом також буде перевірений. Якщо все ж таки приєднується неправильний нуклеотид, то він не спроможний формувати водневі зв'язки з комплементарною основою матричного ланцюга, що деформує подвійну спіраль. Це в більшості випадків дозволяє ДНК-полімеразі розпізнати дефект. При цьому фермент призупиняє реплікацію і відщеплює «невірний» нуклеотид від ланцюгу ДНК. Потім перевіряється попередній перед вирізаним нуклеотид і так далі. Вирізання нуклеотидів здійснюється завдяки тому, що ДНК-полімераза володіє крім полімеразної ще й 3'→5'-екзонуклеазної активністю. Коли полімераза відщепить неспарений нуклеотид або декілька нуклеотидів і дійде до нормально спарених нуклеотидів, відновлюється її полімеразна активність, й синтез ДНК подовжується до виявлення чергової дефектної пари.

Репарація одноланцюгових розривів ДНК. Ще один тип прямої репарації був виявлений для одноланцюгових розривів ДНК, індукованих, наприклад, іонізуючим випромінюванням. При цьому за допомогою ферменту ДНК полінуклеотидлігази (англ. *Ligase* – з'єднувати, зв'язувати) відбувається пряме відновлення розірваних кінців в молекулі ДНК.

Репарація АР-сайтів. При деяких типах ушкоджень нуклеотидів, ковалентний зв'язок між основою і цукром (глікозидний зв'язок) може розриватися. Тоді в молекулі ДНК на місці цих основ утворюється пролом, який називають АР-сайтом (англ. *APurine* та *APyrimidine sites* – апуринові та апіримідинові сайти). Було відкрито ферменти – *інсертази* (англ. *Insert* – вставляти), які в АР-сайтах здатні приєднувати до молекули цукру таку ж основу, яку було видалено мутагенним фактором. Після цього структура ДНК відновлюється.

Репарація пошкоджень, викликаних алкільними групами. Алкілюючі агенти, здатні приєднувати до взаємодіючих з ними молекул алкільні (метилові, етилові, пропилові, бутилові) бокові групи. Наприкінці 60-х років XX століття стало ясно, що ці мутагени алкілюють пуринові і піримідинові основи в ДНК. Один з найбільш потужних алкілюючих мутагенів – метил-нітро-нітрозогуанідин – може алкілювати гуанін, приєднуючи метильну групу до кисню, з'єднаному з шостим атомом вуглецю, при цьому утворюється O^6-метилгуанозин.

У випадку прямої репарації реалізуються два способи: репарація *алкілтрасферазами* або *оксиредуктазами*. Для обох випадків

характерне відновлення непошкоджених основ. Під час репарації алкілтрасферазами відбувається перенесення алкільної групи на один з власних залишків цистеїну. Таке ковалентне приєднання алкільної групи до цистеїну інактивує фермент. Тому алкілтрасферази ще називають суїцидальними ферментами, які після однієї реакції трансалкілювання піддаються деградації. Тим самим у прямому сенсі ці білки не є ферментами, оскільки останні не змінюються в ході реакцій. Такий механізм відновлення основ характерних зокрема для O^6-метилгуанін і O^4-метилтиміну. Якщо для кожного акту прямої репарації потрібна окрема молекула білка, клітина змушена запустити синтез нових його порцій. Як правило, всередині клітини їх накопичується декілька тисяч, щоб забезпечити потреби репарації. Якщо процес виникнення нових пошкоджень у ДНК йде повільніше, ніж синтез нових порцій білків, то останніх вистачає на охоплення всіх метильних груп гуаніну і мутації не виникають. Якщо ж швидкість внесення нових пошкоджень перевищує швидкість синтезу білків, то останні перестають справлятися з усіма пошкодженнями і в клітинах накопичуються мутації.

Ще один шлях прямої репарації алкілованих основ – окислення алкільної групи *оксиредуктазами* з подальшою регенерацією неушкодженої азотистої основи. Ферменти *AlkB* у прокаріот і *hABH2* і *hABH3* деяких еукаріот спрямовано деметилюють 1-метиладенін і 3-метилцитозин у ДНК. Але на відміну від *алкілтрасфераз*, ці ферменти мають субстратну специфічність, яка орієнтована на поверхню пар основ G:C і A:T.

8.5. Механізми ексцизійної репарації ДНК

Ексцизійна репарація ДНК шляхом видалення пошкоджених азотистих основ (англ. *Base Excision Repair – BER*). Система *BER* зумовлює захист геномної ДНК від пошкоджень, які викликаються головним чином алкілюючими агентами, а також ендогенними генотоксичними сполуками, включаючи внутрішньоклітинні радикали кисню та інші реакційноздатні метаболіти. *BER* починає функціонувати з відщеплення помилково включених або модифікованих основ від дезоксирибози під дією ключового ферменту – ДНК-глікозилази, яка володіє здатністю відщеплювати велике число модифікованих основ ДНК. Окрім цих модифікованих основ під час *BER* може відбуватися видалення й інших похідних, які утворюються

під дією хімічних мутагенів. Більшість ДНК-глікозилаз характеризуються різною субстратною специфічністю тому здійснюють видалення конкретних модифікованих основ (рис. 72).

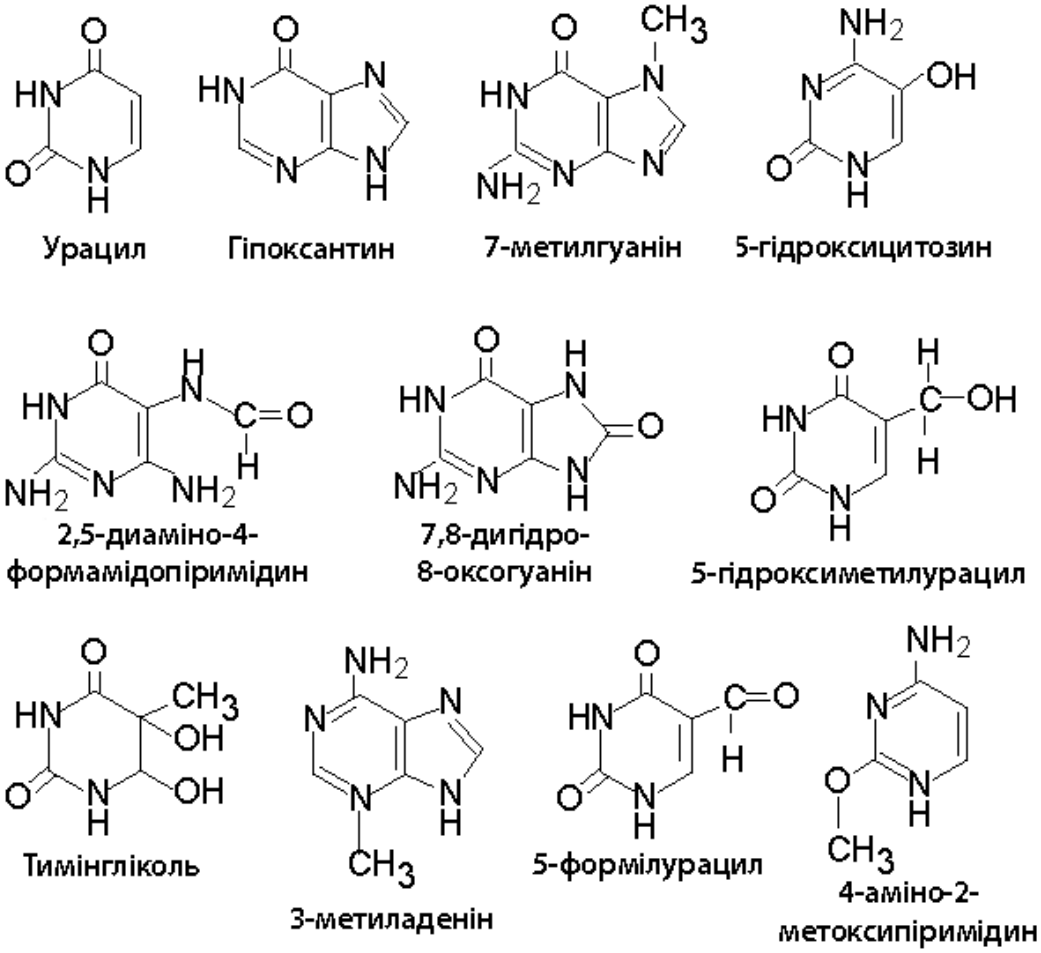


Рис. 72. **Деякі модифіковані основи ДНК, що видаляються під час *BER***

АР-сайти, які утворюються в результаті видалення модифікованих азотистих основ, далі вирізаються за допомогою АР-ендонуклеази, яка звільняє його 3’-кінець, та АР-ліази, яка потім гідролізує її 5’-кінцевий фосфодиефірний зв’язок. Однонуклеотидний пролом потім заповнюється за допомогою ДНК-полімерази, а фосфодиефірний зв’язок відновлюється в реакції лігування (рис. 73). У прокаріот репаративний синтез ДНК виконує ДНК-полімераза I, в еукаріот – ДНК-полімерази *β*, *ι* та *λ*.

Четвертою ДНК-полімеразою в клітинах еукаріот, яка володіє АР-ліазною активністю, є мітохондріальна ДНК-полімераза *γ*. *Pol γ* – єдина ДНК-полімераза, виявлена в мітохондріях, отже, вона відповідальна за всі перетвореннях ДНК, які відбуваються в цій органелі. Мітохондрія є об’єктом інтенсивного ушкодження ДНК активними формами

кисню, які генеруються під час окисного фосфорилювання. Ці ушкодження ефективно репаруються набором мітохондріальних білків, які включають в себе АР-ендонуклеази, Pol γ, мтДНК-лігази. Сам процес репарації подібний з процесом *BER* у ядерній ДНК.

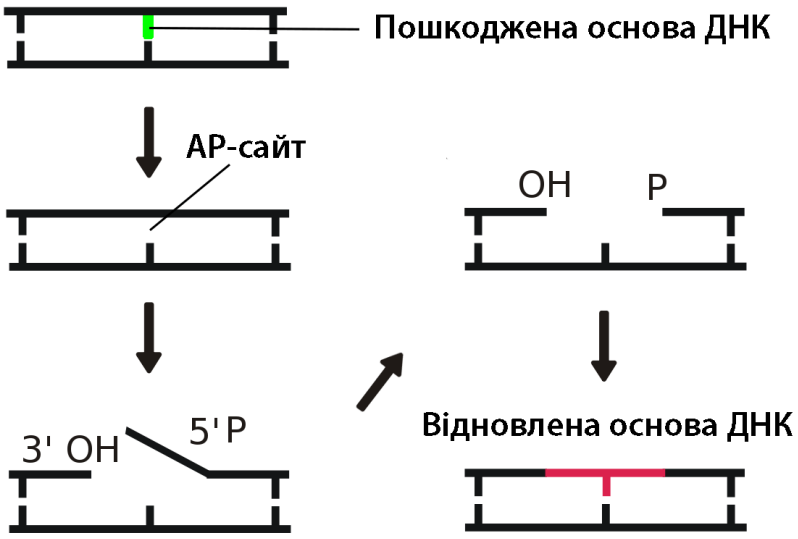


Рис. 73. **Схема механізму *BER***

Ексцизійна репарація ДНК шляхом видалення нуклеотидів (англ. *Nucleotide Excision Repair – NER*). Якщо в системі *BER* відбувається видалення окремих пошкоджених азотистих основ ДНК шляхом розриву відповідних N-глікозидних зв'язків між азотистими основами і залишками дезоксирибози, то в системі *NER* пошкоджені азотисті основи вирізаються у складі олігонуклеотидів. NER може здійснюватися двома шляхами:

1) Перша схема передбачає гідроліз фосфодиефірних зв'язків 3'- або 5'- кінців на деякій відстані від пошкодженого нуклеотиду. Далі під дією 5'→3'- (або 3'→5'-) екзонуклеази, яка гідролізує ланцюг ДНК, видаляється нуклеотид за нуклеотидом у відповідному напрямку від внесеного одноланцюгового розриву. Пролом, що утворюється, далі заповнюється ДНК-полімеразою. Такий механізм репарації не завжди використовується для видалення пошкоджених (змінених) нуклеотидів. Це пов'язано, мабуть, з тим, що деякі модифіковані нуклеотиди часто є інгібіторами нуклеаз;
2) Другий механізм ексцизійної репарації дозволяє вирішити вищеозначену проблему через використання ферментної системи, яка утворює одноланцюгові розриви по обидві сторони від пошкодженого нуклеотиду на деякій відстані від нього з

подальшим видаленням одноланцюгового фрагменту ДНК, який містить змінений нуклеотид.

Другий механізм *NER* є універсальним як для прокаріот, так і для еукаріот. Його умовно можна розділити на чотири етапи:

а) розпізнавання пошкодженої ділянки ДНК;
б) подвійне надрізання (інцизія) ланцюга ДНК по обидва боки від пошкодженої ділянки і її видалення (ексцизія);
в) заповнення пролому в процесі репаративного синтезу;
г) лігування одноланцюгового розриву ДНК, що лишився.

Слід зауважити, що система здатна розпізнавати пошкодження які і сильно, і слабо деформують вторинну структуру ДНК.

Молекулярний механізм розпізнавання модифікованих нуклеотидів остаточно не вивчений, проте відомо, що на цьому етапі задіяний комплекс *XPC-HR23B*. У процесі розпізнавання також приймають участь білкові комплекси *XPA-RPA*, які переважно зв'язуються з пошкодженою ДНК. До останніх приєднується фактор транскрипції *TFIIH* у комплексі з білками *XPB-XPD*, які за участю АТР локально розкручують ДНК, створюючи основний *преінцизійний комплекс* з пошкодженою ДНК. Далі білок *XPG* вносить одноланцюговий розрив з 3'-кінця на відстані 3-5 нуклеотидів від ушкодження. Аналогічно комплекс *ERCC1-XPF* створює одноланцюговий розрив з 5'-кінця ушкодження. При цьому прокаріоти гідролізують 8-ий зв'язок від 5'-кінця зміненого нуклеотиду, тим часом в еукаріотичних організмах робиться одноланцюговий розрив на відстані 21-25 нуклеотидів від пошкодження з боку його 5'-кінця. Таким чином, прокаріоти видаляють змінений нуклеотид у складі 12-13-членних олігомерів, проте як еукаріоти – у складі одноланцюгових фрагментів ДНК довжиною 27-29 нуклеотидів. Ферментна система, яка вносить такі подвійні одноланцюгові розриви, отримала назву *ексцизійної нуклеази* (*ексцинуклеази*). Утворений пролом далі заповнюється за допомогою ДНК-полімерази, а фосфодиефірний зв'язок в одноланцюговому розриві відновлюється за допомогою ДНК-лігази (рис. 74).

Дослідження механізму *NER* показали, що пошкоджені (модифіковані) основи – не єдиний субстрат для цієї ферментної системи. *NER* людини розпізнає і видаляє поодинокі помилково спарені нуклеотиди, а також петлі довжиною 1-3 нуклеотиди. Однак, *NER* не може ідентифікувати, нуклеотид з будь-якого ланцюга ДНК виявляється правильним. У результаті відбувається вирізання

неспарених нуклеотидів з будь-якого ланцюга випадковим чином. На відміну від щойно розглянутої ситуації система *NER* здатна розрізняти ланцюги ДНК у разі наявності в ДНК димерів тиміну циклобутанового типу. При цьому вирізання нуклеотидів відбувається виключно з пошкодженого ланцюга.

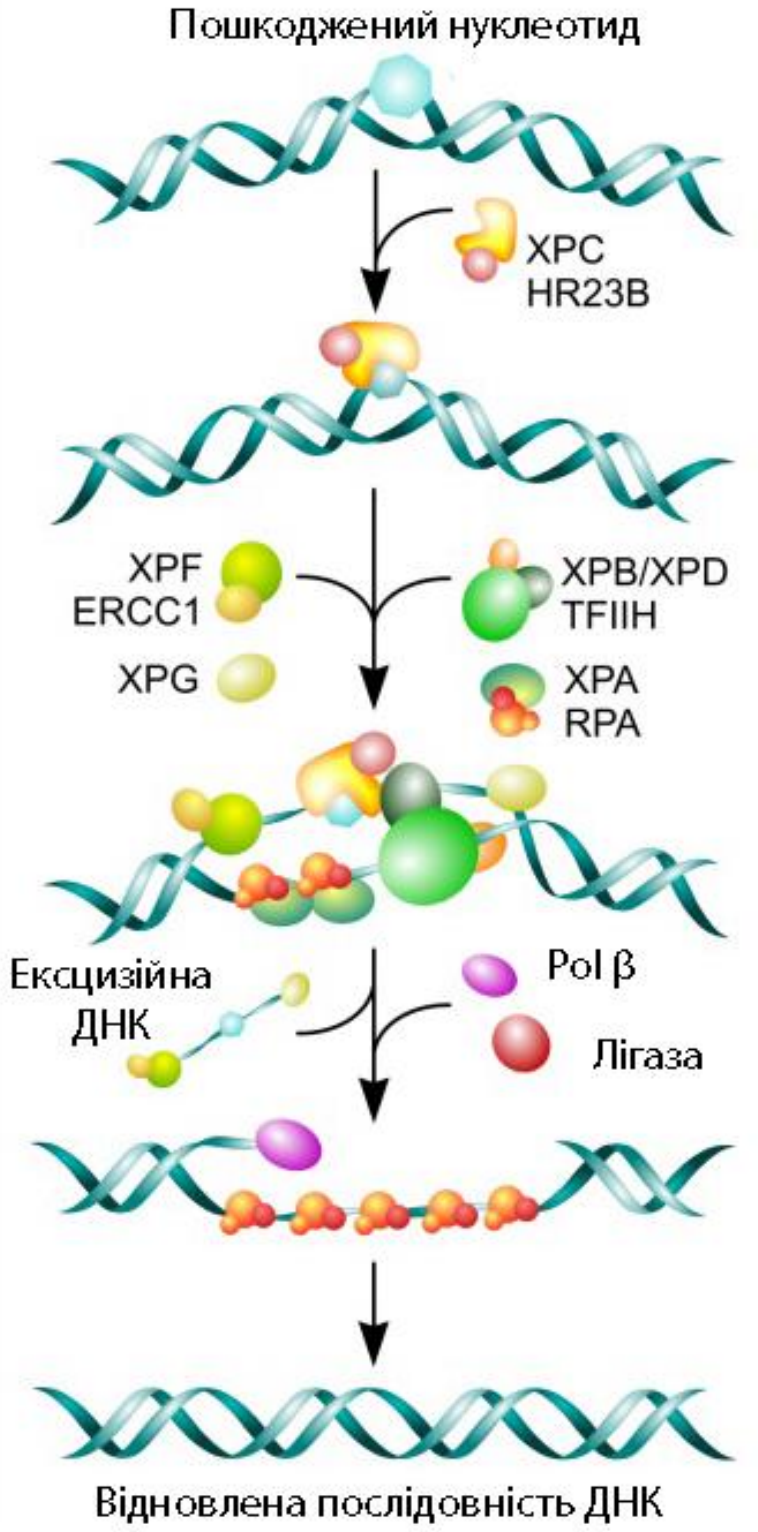


Рис. 74. **Механізм *NER***

8.6. Механізми постреплікативної репарації ДНК

Гомологічна рекомбінація у репарації ДНК. Давно відомо, що бактеріальні клітини з високою швидкістю поділу містять декілька репліконів і більш стійкі до дії іонізуючої радіації, яка індукує дволанцюгові розриви ДНК, ніж клітини стаціонарної фази з невеликим числом репліконів. Гаплоїдні клітини дріжджів у фазі G_1 перед початком синтезу ДНК надзвичайно чутливі до дії іонізуючої радіації. Тим часом ті ж клітини у фазі G_2 перед мітозом більш стійкі до іонізуючого випромінювання як і диплоїдні клітини. Ці факти вказують на те, що для ефективного виправлення пошкоджень, які викликаються іонізуючою радіацією, необхідна одночасна присутність у клітині мінімум двох гомологічних молекул ДНК.

Найчастіший механізм репарації дволанцюгових розривів ДНК умовно поділяють на три фази:

1) під час пресинаптичної фази репарації відбувається внесення дволанцюгового розриву в ДНК або, за його наявності, відразу здійснюється нуклеазне розщеплення 3’-ОН- виступаючих кінців розриву. Білок *RecBCD*, який володіє як хеліказною, так і екзонуклеазною активностями розплітає дволанцюгову молекулу ДНК у місці розриву і гідролізує один з ланцюгів в напрямку 5’→3’, залишаючи виступаючий одноланцюговий 3’-ОН-кінець;
2) у другій фазі спостерігається синапсис (об’єднання) гомологічних ділянок двох молекул ДНК з входженням комплементарної одноланцюгової ділянки в ДНК-дуплекс і наступним репаративним синтезом ДНК. Пошук гомологічних ділянок та обмін ланцюгами, які необхідні для рекомбінації, відбуваються за участю білка *RecA*;
3) протягом постсинаптичної фази репарації утворена структура розділяється (рис. 75).
4) Схожі механізми використовуються клітинами для рекомбінаційної репарації одноланцюгових проломів, що залишаються в молекулах ДНК через блокування реплікативного синтезу ДНК модифікованими нуклеотидами.
5) Ключовою особливістю еукаріотичної рекомбінації і репарації є участь відповідних білків у інших молекулярних механізмах, зокрема, у складі транскриптосоми і реплісоми, що вказує на їх важливу роль в матричному біосинтезі нуклеїнових кислот еукаріотичних клітин.

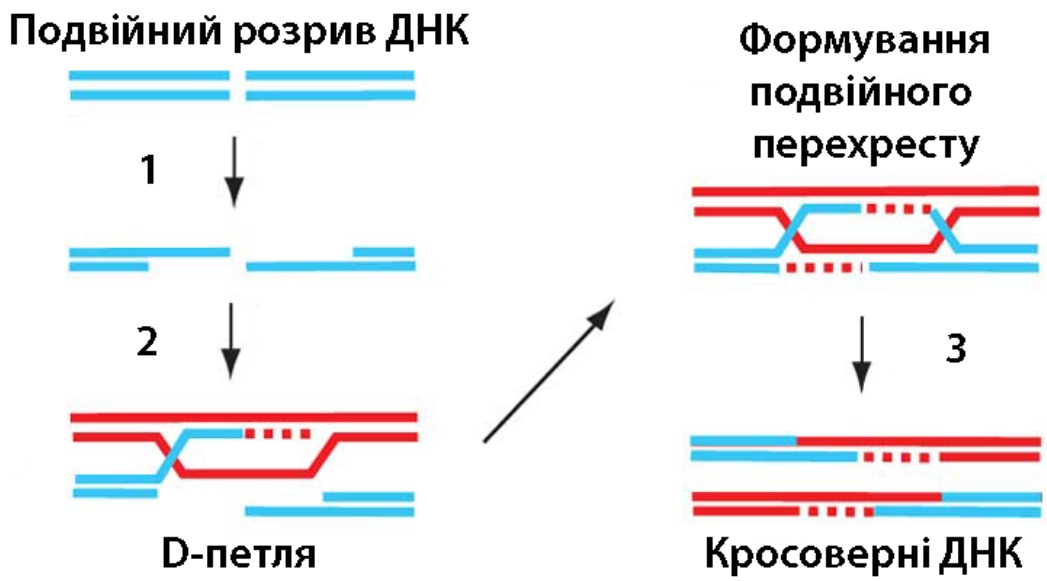


Рис. 75. **Фази гомологічної рекомбінації при репарації ДНК:**
1 – пресинаптична; 2 – синаптична; 3 – постсинаптична

Репарація помилково спарених нуклеотидів. Система, яка здійснює репарацію помилково спарених нуклеотидів або *місмач репарація* (англ. *Mismatch Repair*), виконує в клітині кілька важливих функцій. Перш за все вона виправляє помилки реплікації ДНК, змінюючи помилково включені нуклеотиди. Крім того, за участю цієї системи відбувається процесинг проміжних продуктів рекомбінації, що приводить до утворення нових поєднань генетичних маркерів.

Система репарації помилково спарених нуклеотидів у прокаріот, яка використовує білки *MutHLS*, розпізнає і репарує всі некомплементарні пари основ за винятком С-С. Крім того, ця система репарує невеликі вставки в один з ланцюгів ДНК, які утворюються в результаті помилок реплікації. Довжина таких вставок не перевищує чотирьох нуклеотидів.

Зазвичай в *E.coli* вся ДНК метилована *Dam*-метилазою в сайтах GATC. Проте після завершення реплікації дочірній ланцюг ДНК деякий час залишається неметилованим. Система *MutHLS* вибірково репарує дочірній ланцюг ДНК, тим самим значно підвищуючи точність реплікації.

Даний механізм реплікації починається з приєднання білку *MutS* до ділянки ДНК з помилково спареними нуклеотидами. Далі прикріплюється білок *MutL*, який необхідний для активації *MutH* – ендонуклеази, що здійснює одноланцюговий розрив ДНК. Таким чином, комплекс *MutS-MutL*, зібраний на ділянці ДНК з помилково спареним нуклеотидом, стимулює ендонуклеазную активність *MutH*.

MutHLS-система репарації може використовувати частково метиловані послідовності GATC, які розташовані вище і нижче пошкодженої ділянки ДНК. При цьому у вирізання помилково включеного нуклеотиду крім хелікази II (*UvrD*) бере участь одна з екзонуклеаз: *ExoI* (3'-екзо), *ExoVII* (3'-і 5'-екзо) або *RecJ* (5'-екзо) залежно від розташування GATC-сайту по відношенню до некоректно спарених нуклеотидів. Слідом за вирізанням нуклеотиду утворюється одноланцюговий пролом, який заповнюється холоферментом ДНК-полімерази III у присутності SSB-білків і ДНК-лігази.

Слід відмітити, що в даному випадку метилування ланцюгів ДНК слугує в цілях маркування материнського (оригінального) ланцюга. Якщо сайти GATC повністю метиловані в обох ланцюгах ДНК, то *MutHLS*-система репарації *E.coli* змінює помилково спарені нуклеотиди в кожному з них з однаковою ефективністю.

Разом з тим у прокаріот існують, принаймні, ще два специфічних шляхи репарації помилково спарених нуклеотидів. Система *VSP* (англ. *Very Short Patch repair pathway*) репарує некомплементарні пари G-T, замінюючи їх на G-C. Вважається, що такі пари утворюються в результаті дезамінування 5-метилцитозину в сайтах, де залишки C метиловані *Dam*-метилазою. З більш низькою ефективністю ця ж система замінює пари G-U на G-C.

Інша *MutY*-залежна система репарації специфічно ліквідує наслідки окисних ушкоджень гуаніну. Якщо dGTP окислюється з утворенням 8-оксо-dGTP, білок MutT розщеплює останній, запобігаючи його включенню до ДНК. Якщо він все ж таки включається навпроти залишку C, то *Fpg*-глікозилаза (*MutM*) видаляє цю модифіковану основу. У тому випадку, коли 8-оксо-G залишається в складі ДНК, у наступному раунді реплікації з ним зпаровується A. Така ситуація в підсумку може призвести до трансверсії G-C → T-A. У цьому випадку білок *MutY* діє як ДНК-глікозилаза, яка видаляє залишок A з некоректною пари, і як AP-ліаза, що вносить одноланцюговий розрив поруч з AP-сайтом. Далі починає функціонувти система репарації *BER*. Послідовність реакцій за участю MutY також репарує некомплементарні пари A-G і A-C з утворенням відповідно пар C-G і G-C.

Репарація помилково спарених основ у еукаріот відбувається за участю комплексу білків, подібного системі *MutHLS* бактерій.

Розглянуті у цій главі механізми утворення мутацій вказують на велику різноманітність шляхів ушкодження генетичної інформації,

укладеної в активних і тимчасово мовчазних генах. Еволюційний розвиток тваринного і рослинного світу протиставило мутагенним впливам потужну «протиотруту» у вигляді ефективних систем репарації ДНК. Тим не менш, через помилки цих систем та їх пошкодження відбувається необоротне накопичення мутацій, які призводять до порушень метаболізму та розвитку різних патологічних станів організму.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. На які види поділяються мутації залежно від розмірів сегментів геному?
2. У чому полягає особливість двох категорій генних мутацій?
3. Вкажіть причини виникнення мутацій на молекулярному рівні.
4. У чому полягає значення 3’→5’-екзонуклеазної активності ДНК-полімераз?
5. Які існують види мутагенних впливів?
6. Вкажіть рівні, на яких здійснюється захист генетичної інформації від мутаційних ушкоджень.
7. На які групи розподіляють основні типи пошкоджень ДНК?
8. Вкажіть, які групи репарації пошкоджень ДНК розрізняють.
9. У чому полягає сутність процесу фотореактивації ДНК?
10. У чому полягає корегувальний механізм аутокорекції ДНК-полімеразами?
11. За рахунок якого ферменту і як здійснюється репарація АР-сайтів?
12. У чому полягає особливість репарації пошкоджень, викликаних алкільними групами, за допомогою алкілтрансфераз?
13. Вкажіть ДНК-полімерази еукаріот, які володіють АР-ліазною активністю.
14. Опишіть етапи другого механізму ексцизійної репарації ДНК.
15. Вкажіть етапи механізму репарації дволанцюгових розривів ДНК.
16. Який чином працює *MutHLS*-система при репарації помилково спарених нуклеотидів?

9. Генетична інженерія та геноміка

9.1. Значення генетичної інженерії

Сучасний рівень знань біохімії, молекулярної біології і генетики дозволяє розраховувати на успішний розвиток нової біотехнології – *генетичної інженерії*, тобто сукупності методів, що дозволяють шляхом операцій *in vitro* (у пробірці) переносити генетичну інформацію з одного організму в інший. Перенесення генів дає можливість долати міжвидові бар'єри і передавати окремі спадкові ознаки одних організмів іншим. Мета генної інженерії – не втілення в реальність міфів про кентаврів (людино-конях) і русалок (людино-рибах), а отримання клітин (в першу чергу бактеріальних), здатних у промислових масштабах напрацьовувати деякі важливі білки.

Необхідність маніпулювання генами диктується конкретними завданнями фундаментальних і прикладних досліджень. Для розуміння молекулярних механізмів функціонування окремих генів і взаємопов'язаних генетичних систем велике значення має робота з ізольованими генами. Такі дослідження дозволяють визначити межі генів, виділити їх у чистому вигляді та ідентифікувати елементи структури, істотні для функціонування. Доказом функціональної значущості виділеної ділянки геному може бути тільки його нормальна експресія в модельній генетичній системі. Тому наступним етапом дослідження виділеного гена завжди є переміщення його в таку генетичну систему, де експресія гена легко виявляється. Результати експресії оцінюють або за появою білкового продукту, що кодується досліджуваним геном, або за зміною функцій біологічної системи внаслідок появи в ній нової ферментативної або іншої активності. Таким чином, в результаті дослідження структури конкретного гена і моделювання його експресії в штучній генетичній системі можна зрозуміти особливості його функціонування в живому організмі.

У наш час за допомогою методів генної інженерії отримано дані про структуру і функціонування генів різноманітних організмів, що дало можливість перейти на якісно новий рівень генетичних досліджень, а саме:

- можливість перенесення гена в нове для нього генетичне оточення з подальшою його експресією, що веде до зміни властивостей організму, в геном якого вводиться новий ген (наприклад створення продуцентів біологічно активних речовин або

трансгенних тварин), а також здійснення генотерапії спадкових і набутих захворювань шляхом штучного заміщення мутантних алелів;

- стало реальним конструювання нових генів шляхом об'єднання *in vitro* як відомих, так і нових, штучно синтезованих послідовностей нуклеотидів. Цей підхід використовується в білковій інженерії для дослідження функціональної значущості окремих амінокислот і доменів у поліпептидних ланцюгах ферментів, а також для створення нових білків;
- в сучасній біотехнології з'явилася можливість застосовувати ізольовані гени у складі генно-інженерних конструкцій для отримання харчових продуктів і біологічно активних речовин білкової природи.

Оскільки в експериментальних умовах неможливо працювати з однією копією гена, отримання необхідного числа ідентичних копій гена або його частин є першим і одним з основних завдань генної інженерії. Для її вирішення використовують метод *молекулярного клонування*. Суть методу полягає в тому, що нуклеотидна послідовність, яку необхідно виділити або розмножити, ковалентно вбудовується в молекули нуклеїнової кислоти, які здатні до самореплікації, так звані *вектори*. Далі така послідовність нуклеотидів у складі вектора вводиться в клітини про- або еукаріотичного організму, і ці гібридні клітини в *селективних умовах*, що забезпечують збереження вектора всередині клітин, вирощують на поживному середовищі. У результаті утворюються клони клітин, які теоретично містять ідентичні векторні молекули з однією і тією ж вставкою чужорідної послідовності нуклеотидів. Оскільки об'єднання молекул клонованої послідовності нуклеотидів і вектора є не чим іншим, як рекомбінацією *in vitro*, такі гібридні молекули називають *рекомбінантними молекулами*. У даний час розроблені численні методи, що дозволяють виділяти певні послідовності нуклеотидів зі складної суміші фрагментів хромосомної ДНК, а також здійснювати обмін між чітко визначеними фрагментами генів і іншими послідовностями нуклеїнових кислот. У всіх цих реакціях, як правило, використовуються високоочищені препарати нуклеїнових кислот і ферментів нуклеїнового обміну. Більшість ферментів, які застосовуються для молекулярного клонування нуклеїнових кислот, беруть участь у метаболізмі нуклеїнових кислот *in vivo*. Це означає, що генна інженерія в своєму розвитку спирається на досягнення

досліджень ферментних систем метаболізму нуклеїнових кислот та існує завдяки можливості отримання таких ферментів у високоочищеному стані. У той же час сам процес клонування і дослідження клонованих послідовностей нуклеотидів зводиться в основному до послідовного проведення *in vitro* певних ферментативних реакцій з використанням очищених ферментів та їх субстратів – нуклеїнових кислот.

9.2. Ферменти генетичної інженерії

Серед ферментів, що використовуються в генетичної інженерії для клонування, велике значення мають ендонуклеази рестрикції – *рестриктази*. Ці ферменти, вперше відкриті як частина системи рестрикції-модифікації ДНК у бактерій, специфічно гідролізують молекули дволанцюгових ДНК за наявності в них певних послідовностей нуклеотидів, так званих *сайтів рестрикції*.

За механізмом дії та молекулярною структурою розрізняють три типи рестриктаз. Ферменти рестрикції типу I – складні мультимірні комплекси, побудовані з трьох субодиниць з молекулярною масою до 300 кДа, які володіють рестриктазною, ДНК-метилазною і АТРазною активністю. Рестриктази типу I для прояву своєї активності вимагають присутності АТР, *S*-аденозилметіоніну та іонів Mg^{2+}. Вони не розпізнають специфічні послідовності нуклеотидів і в силу цього не знаходять широкого застосування в генній інженерії.

Рестриктази типу II розпізнають специфічні послідовності нуклеотидів в точці розщеплення ДНК, вимагають для прояву активності наявності в реакційній суміші АТР та іонів Mg^{2+} і найчастіше використовуються при молекулярному клонуванні.

Рестриктази типу III також розпізнають специфічні послідовності нуклеотидів, а розрізають на певній відстані від них. Вони не виявляють абсолютної залежності від *S*-аденозилметіоніна і активні тільки в присутності АТР та іонів Mg^{2+}.

Рестриктази типу II – основний інструмент генетичної інженерії. Більшість рестриктаз типу II специфічно впізнають на ДНК тетра- і гексануклеотидні послідовності, а принаймні три з них – октануклеотидні. Чим коротше олігонуклеотидна послідовність сайту рестрикції, що розпізнається рестриктазою, тим частіше вона зустрічається у довільній послідовності нуклеотидів, у якій кожен з чотирьох нуклеотидів представлений з однаковою частотою (50% А-

Т-пар і 50% G-C-пар). Так, випадкова тетрануклеотидна послідовність зустрічається в середньому через кожні 256 п.н. (4^4), а гексануклеотидна – через кожні 4096 п.о. (4^6). Однак, у природних ДНК розподілення нуклеотидів може помітно відрізнятися від випадкового.

Для більшості сайтів, що розпізнаються рестриктазами типу II, характерна наявність у них симетрії другого порядку, тобто послідовності, які розпізнаються ними являють собою *паліндроми* (грец. *πάλιν* – «назад, знову» и *δρόμος* – «біг»), або перевертні – послідовності знаків, які і в прямому, і в зворотному порядку читаються однаково). Наприклад, у рестриктази *EcoRI* - 5’-GAATTC-3’. Це означає, що нуклеотиди, розташовані в кожному з ланцюгів на рівній відстані від осі симетрії, комплементарні один одному. Якщо точки розщеплення протилежних ланцюгів ДНК зміщені один відносно одного в сайті рестрикції, то в результаті рестрикції утворюються кінці ДНК, що містять виступаючі одноланцюгові ділянки. Оскільки такі ділянки комплементарні самі собі й одна одної і можуть між собою взаємодіяти, їх часто називають «липкими» кінцями. В «липких» кінцях виступаючою одноланцюговою ділянкою може бути як 5’-, так і 3’-кінець (рис. 76: 1, 2).

У деяких рестриктаз точки розщеплення обох ланцюгів ДНК розташовані безпосередньо одна під одною в сайті рестрикції. У цьому випадку після розщеплення ДНК «липких» кінців не утворюється, а виходять так звані «тупі» кінці, в яких немає виступаючих одноланцюгових ділянок ДНК (рис. 76: 3). Існує одна принципова функціональна відмінність між 5’- і 3’-виступаючими «липкими» кінцями. Останні неможливо помітити шляхом їх добудови ДНК-полімеразою. Цю особливість слід мати на увазі при виборі рестриктаз для отримання рестрикційних фрагментів ДНК, які передбачається використовувати в якості зондів.

Створення фосфодіефірних зв’язків у одноланцюгових розривах дволанцюгової ДНК за допомогою *ДНК-лігази* є разом з рестриктазами одним з найважливіших етапів отримання рекомбінантних ДНК *in vitro*. Найбільше застосування в генно-інженерних дослідженнях знаходить ДНК-лігаза бактеріофага Т4. Реакція лігування здійснюється в два етапи (рис. 77). Спочатку утворюється проміжний комплекс фермент-АМР (етап 1), після чого залишок АМР переноситься на 5’-фосфатну групу кінцевого нуклеотиду в точці розриву ДНК (етап 2). Новоутворений фосфодиефірний зв’язок

гідролізується під час нуклеофільної атаки 3’-ОН групи сусіднього нуклеотиду, що призводить до утворення нового фосфодиефірного зв’язку, який відновлює цілісність цукрово-фосфатного остову ДНК. Т4-ДНК-лігаза здійснює з’єднання фрагментів дволанцюгової ДНК, які володіють комплементарними «липкими» або «тупими» кінцями. Як випливає з механізму реакції, необхідною умовою протікання лігування є наявність 5’-кінцевого фосфату і 3’-кінцевого гідроксилу в точках розриву ланцюгів ДНК.

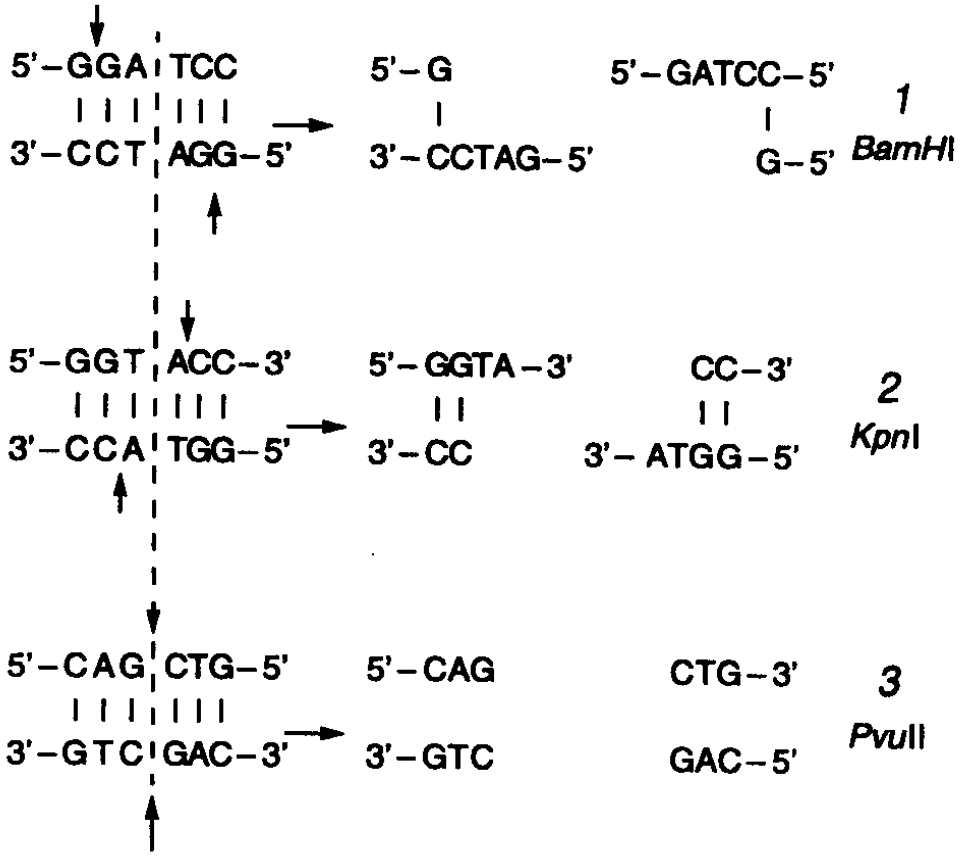


Рис. 76. **Форми розривів дволанцюгових ДНК, що утворюються під дією рестриктаз:**

5’-виступаючі (1), 3’-виступаючі «липкі» (2) і «тупі» (3) кінці ДНК, що утворюються під дією рестриктаз *BamHI*, *KpnI* і *PvuII* відповідно. Стрілками позначені місця розривів ланцюгів ДНК, пунктирною лінією - вісь симетрії сайтів рестрикції;

До ферментів матричного синтезу нуклеїнових кислот відносяться численні *ДНК- і РНК-залежні ДНК- і РНК-полімерази*, що здійснюють залежний від матричних ДНК або РНК синтез нуклеїнових кислот. Ці ферменти зазвичай використовуються в генетичної інженерії для отримання дволанцюгових молекул ДНК з одноланцюгових, а також для зворотної транскрипції, тобто синтезу

дволанцюгових ДНК, комплементарних мРНК, які називають комплементарними ДНК (кДНК).

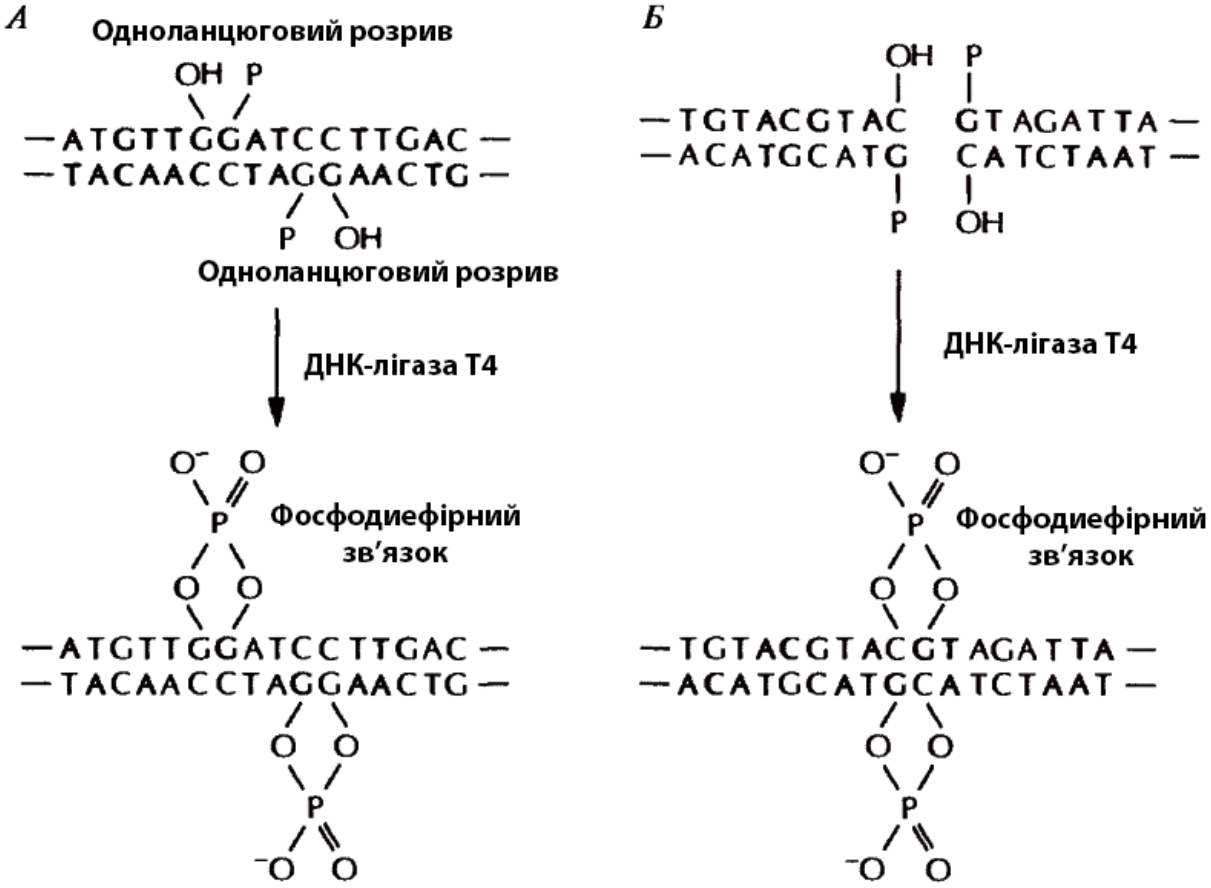


Рис. 77. **Механізм лігування ДНК**

ДНК-лігаза Т4 утворює фосфодиефірний зв'язок між 5'-фосфатними і 3'-гідроксільними групами в місці розриву в остові дволанцюгової ДНК (А. Лігування липких кінців; Б. Лігування тупих кінців)

ДНК-залежні ДНК-полімерази. Серед ДНК-залежних ДНК-полімераз найбільше застосування в генній інженерії знаходять ДНК-полімерази I *E. coli* і її великий фрагмент (фрагмент Кленова), Т4-ДНК-полімераза і останнім часом термостабільні ДНК-полімерази, особливо ДНК-полімераза *Thermus aquaticus* (*Taq*-полімераза). Всі ці ферменти в присутності іонів Mg^{2+} з чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів (dATP, dCTP, dGTP і dTTP) здійснюють синтез ДНК, комплементарної матричної ДНК, і для функціонування вимагають наявності праймера на одноланцюговій матричній ДНК.

ДНК-залежні РНК-полімерази. Незважаючи на високу ферментативну активність ДНК-полімераз, вони не здатні ініціювати синтез дочірніх полінуклеотидних ланцюгів. Цю роль виконують РНК-полімерази. Фермент РНК-полімераза знаходить промотори, активує

матрицю ДНК і відбувається локальне розплітання подвійної спіралі ДНК. Однак, основна роль РНК-полімераз полягає у каталізі процесу транскрипції (тобто створенні РНК на підставі ланцюгу ДНК). У прокаріот процес транскрипції каталізує одна РНК-полімераза, а у еукаріот – три: РНК-полімераза I бере участь у біосинтезі високомолекулярних рибосомних РНК, РНК-полімераза II – в процесі транскрипції генів, що кодують білки, а РНК-полімераза III – у синтезі низькомолекулярних РНК.

РНК-залежні ДНК-полімерази (*зворотні транскриптази*, або *ревертази*). Зворотні транскриптази здатні здійснювати синтез ДНК на матриці РНК, за рахунок полімеризації чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, як це має місце у випадку ДНК-залежних ДНК-полімераз. Зворотні транскриптази, так само як і ДНК-полімерази функціонують тільки за наявністю праймера. Зворотні транскриптази знаходять застосування в синтезі дволанцюгових ДНК, комплементарних РНК (особливо мРНК), для подальшого її клонування в плазмідних векторах при отриманні бібліотек (клонотек) кДНК. Зворотні транскриптази, подібно ДНК-полімеразам, можуть бути використані для введення радіоактивної або флуоресцентної мітки в ДНК-зонди в складі відповідним чином мічених дезоксирибонуклеозидтрифосфатів.

9.3. Методи отримання генів

Виділення генів із ДНК. Ізольовану ДНК піддають фрагментації. Для цього використовують рестрикційні ендонуклеази (рестриктази).

Проте цей метод виділення генів з ДНК має недоліки:

① Досить важко підібрати рестриктази, які дозволяють вирізати з ДНК саме ту ділянку, яка відповідає певному гену. Разом із геном, яким цікавляться, як правило, включають зайві нуклеотидні послідовності, що заважають подальшому використанню виділеного гена. З іншого боку рестриктаза може відщепнути частину нуклеотидної послідовності гена, в результаті чого ген втрачає функціональну повноцінність.

② Гени еукаріот мають складну будову: включають екзони та інтрони. Первинна РНК, синтезована на такій ДНК-матриці, піддається модифікації (*сплайсингу*), в результаті ділянки, що відповідають інтронам, відокремлюються, а ділянки, що відповідають екзонам, з’єднуючись, утворюють *зрілу матричну*

РНК (*мРНК*). Наявність інтронів є перешкодою для нормального функціонування трансплантованих генів.

③ При обробці ДНК рестриктазами утворюється суміш фрагментів. Виділити з неї ті фрагменти, що несуть потрібний ген – складне завдання. Бактеріальна клітина містить близько 5 тис. генів, тим часом еукаріотична клітина – від 10 до 200 тис. генів.

Хіміко-ферментативний синтез генів. Цей метод є альтернативою «вирізанню» генів за допомогою рестриктаз із нативної ДНК. Метод включає хімічний синтез коротких (8-16 нуклеотидів) одноланюгових фрагментів ДНК (олігонуклеотидів) за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами і подальше зшивання отриманих олігонуклеотидів між собою за допомогою ДНК-лігази з утворенням повноцінних дволанцюгових полінуклеотидів. Хіміко-ферментативний синтез дозволяє точно відтворити мінімально необхідну послідовність нуклеотидів. Крім того, існує можливість введення в такі гени різноманітних регуляторних послідовностей, а також ділянок розпізнавання для різних рестриктаз II типу. Застосування цього методу обмежене можливостями отримання інформації про нуклеотидну послідовність гена. Ця послідовність може бути відтворена на основі первинної структури відповідного білку. Методом хіміко-ферментативного синтезу отримано гени соматостатіну, А- і В-ланцюги інсуліну, проінсуліну та ін.

Ферментативний синтез генів на основі виділеної з клітини мРНК. Це найбільш поширений метод синтезу генів. *Зворотна транскриптаза* (*ревертаза*) каталізує синтез ланцюгу ДНК, комплементарного мРНК. Отриману одноланцюгову ДНК (кДНК) використовують як матрицю для синтезу іншого ланцюга ДНК із застосуванням ДНК-полімерази. Цінністю цього методу є те, що ген виходить без інтронів та інших послідовностей, що не транскрибуються. Окрім того, легше створити умови, коли клітина акумулює необхідний вид мРНК, ніж відбирати ген із суміші фрагментів ДНК. За допомогою цього методу в 1979 р. було отримано ген соматотропіну (гормону росту) людини.

9.4. Розподілення фрагментів ДНК і будова рестрикційних карт (фізичне картування)

Ферменти рестрикції стали ефективним інструментом досліджень. Вони дозволяють перетворювати молекули ДНК великих

розмірів у набір фрагментів (*рестриктів*) довжиною від декількох сотень до декількох тисяч основ. За допомогою методу *електрофорезу* фрагменти ДНК, що відрізняються за розмірами, можна розділити, а потім досліджувати кожен рестрикт окремо. Сили електричного поля, що прикладаються до зразків, змушують фрагменти ДНК мігрувати крізь гель. Для електрофоретичного аналізу ДНК зазвичай використовують агарозний (для відносно довгих молекул ДНК) і поліакриламідний (для високого дозволу коротких молекул ДНК, наприклад, у випадку секвенування) гелі. Цукрофосфатний остов молекул ДНК заряджений негативно і тому ланцюги ДНК рухаються від катода, зарядженого негативно, до позитивного анода (рис. 78). Більш довгі молекули мігрують повільніше, оскільки затримуються в гелі, більш короткі молекули рухаються швидше. У рідкому розчині здійснити процедуру відокремлення фрагментів ДНК не можливо, тому в якості носія використовують гель-концентрований розчин полімеру.

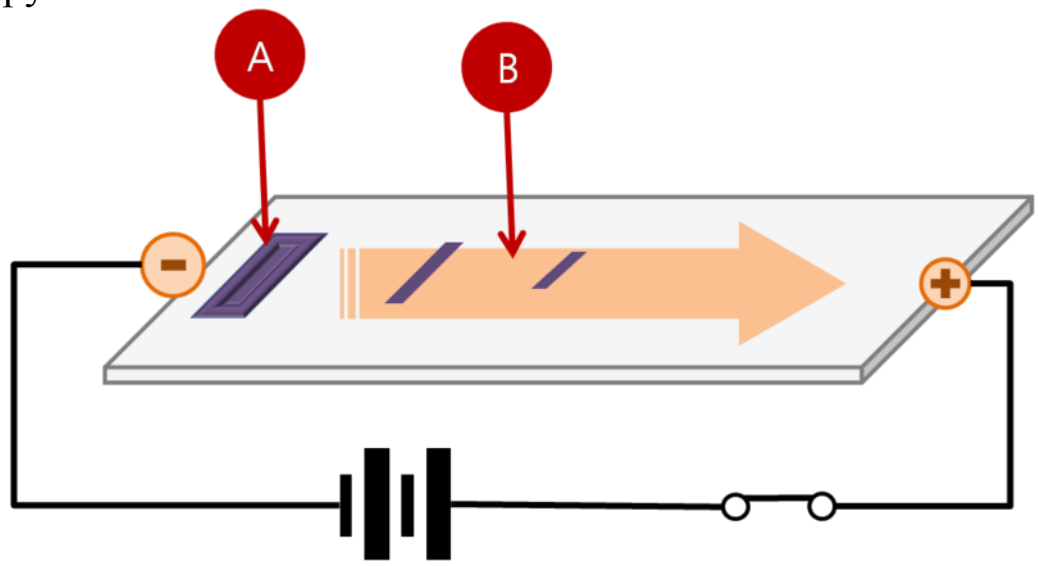
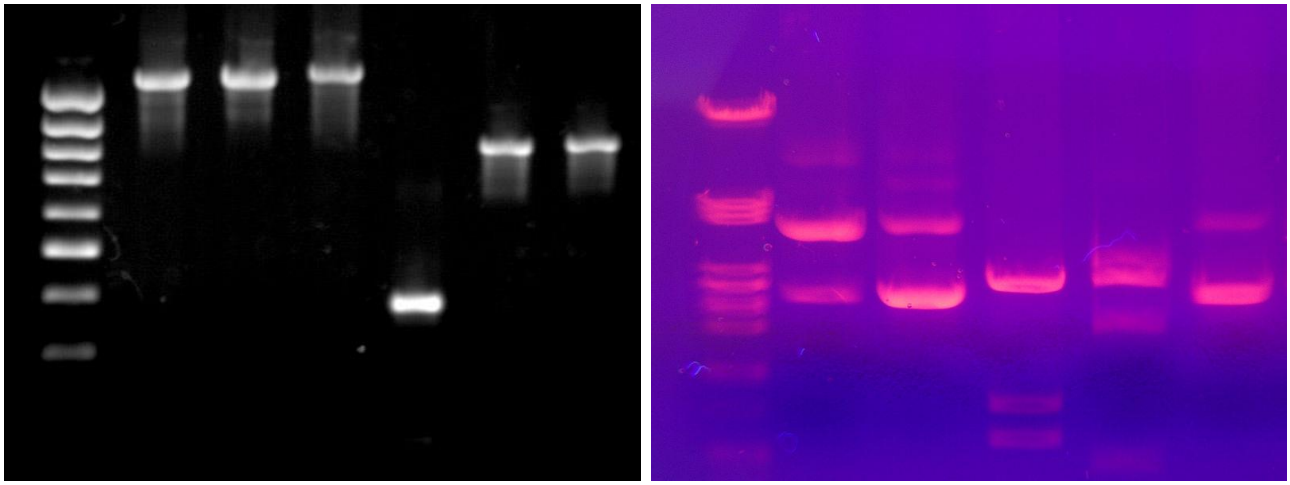


Рис. 78. **Принципова схема електрофорезу**
(А – чарунка, куди поміщають зразок ДНК; В – напрям руху фрагментів ДНК)

Короткі рестрикти мігрують значно швидше, ніж довгі. При відносно високій концентрації агарози великі фрагменти зовсім не здатні проникати у гель. Під час міграції рестрикційні фрагменти не деградують, їх можна *елюювати* (вимивати) у вигляді біологічно активних дволанцюгових молекул. При забарвленні гелів барвниками, що здатні зв’язуватися із ДНК, створюється набір смуг, кожна з яких відповідає певному рестрикту. Визначення розмірів відбувається шляхом порівняння зі стандартними фрагментами ДНК відомої

довжини, які при електрофорезі формують так звану калібровану лінійку (*DNA ladder*) (рис. 79).



А Б

Рис. 79. **Результати гель-електрофорезу фрагментів ДНК**
А – електрофореграма ДНК без барвника; Б – агарозный гель пофарбований бромистим етидієм (візуалізація за допомогою опромінення ультрафіолетом із довжиною хвилі 312 нм). В обох випадках ліворуч калібровочна лінійка.

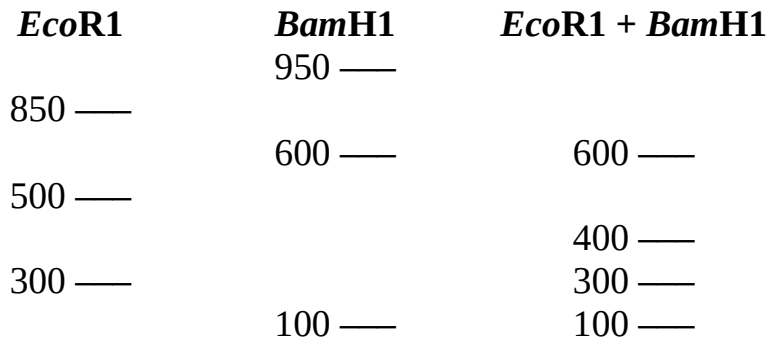
Використання електрофорезу для розділення рестрикційних фрагментів надає можливість будувати *рестрикційні карти*. Перша карта була отримана для вірусу *SW 40* (вірус мавпи, який викликає злоякісну трансформацію), що містив 5423 пари основ. Використовували рестриктазу ***Hind II***, яка розрізає кільцеву ДНК вірусу на 11 фрагментів. Проведення аналогічних маніпуляцій при використання іншої рестриктази та подальше зіставлення отриманих результатів дозволили створити рестрикційну карту, в якій вказаний порядок розташування сайтів рестрикції.

Обробка зразка ДНК певною рестриктазою II класу завжди дає один той самий набір фрагментів – за умовою, що розщеплення відбувається по всіх сайтах розпізнавання. Якщо використовувати декілька ферментів рестрикції і спочатку обробляти ДНК кожною з рестриктаз окремо, а потім їх комбінаціями, можна побудувати фізичну карту даної ДНК. Тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції уздовж молекули. Визначивши розмір отриманих фрагментів за допомогою гель-електорофезу можна знайти положення сайтів рестрикції (здійснити *картування*).

Для побудови рестрикційних карт, необхідно порівняти розміри фрагментів, отриманих при роздільній рестрикції, тобто рестрикції, що відбулася під впливом кожної з рестриктаз окремо, і при рестрикції

сумішшю ферментів. На рисунку 80 а вказані розміри фрагментів, отриманих в результаті розщеплення ДНК даними рестриктазами та їх сумішшю. З отриманих даних випливає, що вказана ділянка ДНК має по два сайти для ***EcoR1*** **і** ***BamH1*** (рис. 80 б).

А



Б

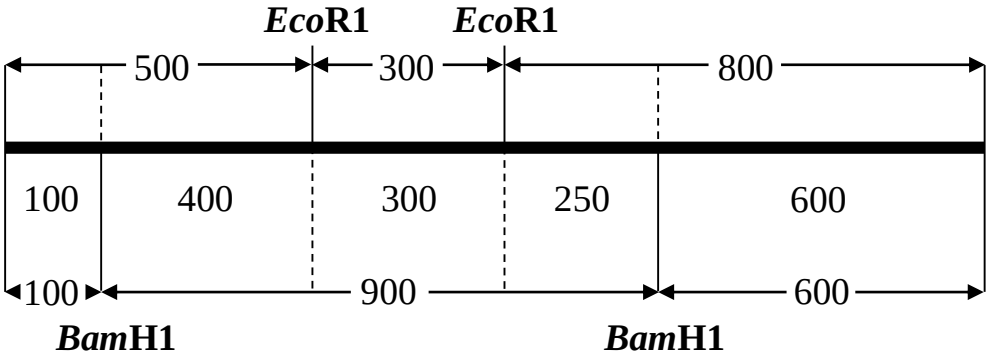


Рис. 80. **Картування сайтів рестрикції**
А – електрофореграма рестриктів;
Б – рестрикційна карта, побудована на основі результатів електрофорезу

9.5. Методи конструювання рекомбінантних ДНК

Рекомбінантні ДНК – це ДНК, які створені поєднанням *in vitro* (у пробірці) двох, або більш фрагментів ДНК, отриманих з різних біологічних джерел.

Певні фрагменти ДНК, у тому числі і фрагменти, що містять структурні гени, отримують з використанням ферментів рестрикції. Рестриктази можуть створювати фрагменти як з тупими, так й з липкими кінцями. Методи з'єднання фрагментів залежать від того, які кінці у фрагментів ДНК, що поєднуються.

З'єднання по однойменних «липких» кінцях. Деякі рестриктази, наприклад *Eco R1*, розрізають дволанцюгову ДНК таким чином, що протилежні ланцюги розміщуються із зсувом один від одного на рівної

відстані від центру сайта узнавання. Ці комплементарні одна до одної ділянки мають тенденцію до асоціації за рахунок парування основ.

Парування основ здійснюється лише між комплементарними послідовностями, тому AATT-кінці, що створені *Eco R1*, не будуть поєднуватися із AGCT-кінцями, що створені *Hind III*. Але будь-які два фрагменти (незалежно від походження), що створилися під дією однакової рестриктази, можуть об'єднатися за рахунок утворення водневих зв'язків між одноланцюговими ділянками комплементарних нуклеотидів (рис. 81)

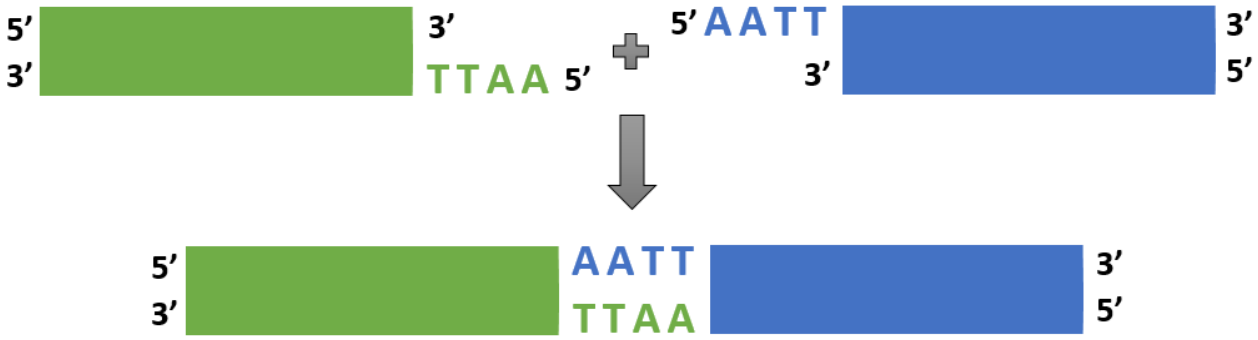


Рис. 81. **Схема з'єднання ділянок ДНК по липких кінцях**

Однак після такого з'єднання цілісність подвійної спіралі не відновлюється, оскільки залишається два розриви у фосфодиефірному остові. Для їх відновлення, тобто зшивання (лігування) ланцюгів використовують фермент ДНК-лігазу. Цей фермент у живій клітині виконує таку саму функцію – зшивання фрагментів ДНК, що синтезуються при реплікації. Таким чином, ДНК-лігаза завершує утворення рекомбінантної ДНК. Вперше такі експерименти були здійснено у 1972 р. (Paul Naim Berg, нар. 1926), і було показано, що використання рестриктази, яка створює «липкі» кінці, у сполученні із ДНК-лігізою може слугувати основою для створення загального методу рекомбінації.

З'єднання фрагментів з «тупими» кінцями. У цьому випадку реакція лігування має власні особливості. ДНК-лігаза, що кодується фагом Т4, здатна з'єднувати дволанцюгові фрагменти з тупими кінцями, але для ефективного перебігу реакції необхідна висока концентрації цих фрагментів і майже в 10 разів більша концентрація ферменту (рис. 82). Однак, все одно ефективність цієї реакції на порядок нижча за ефективність зшивки по «липких» кінцях.

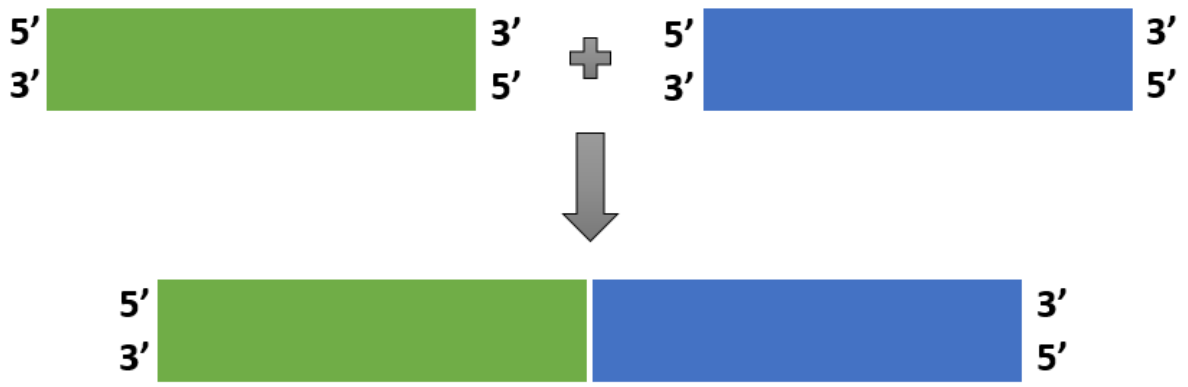


Рис. 82. **Схема з’єднання ділянок ДНК по тупих кінцях**

З’єднання фрагментів з різнойменними кінцями. «Липкі» кінці одних фрагментів можна ферментативним шляхом з’єднати з молекулою ДНК, яка має «тупі» кінці. Для цього «затуплюють» «липкі» кінці. Це досягається або відщепленням нуклеотидів «липких» кінців за допомогою ферменту – нуклеази *S1*, яка руйнує лише одноланцюгову ДНК, або за допомогою ДНК-полімерази на основі одноланцюгового «липкого» кінця синтезують комплементарний до нього ланцюг, а потім проводять зшивання фрагментів за допомогою ДНК-лігази (рис. 83).

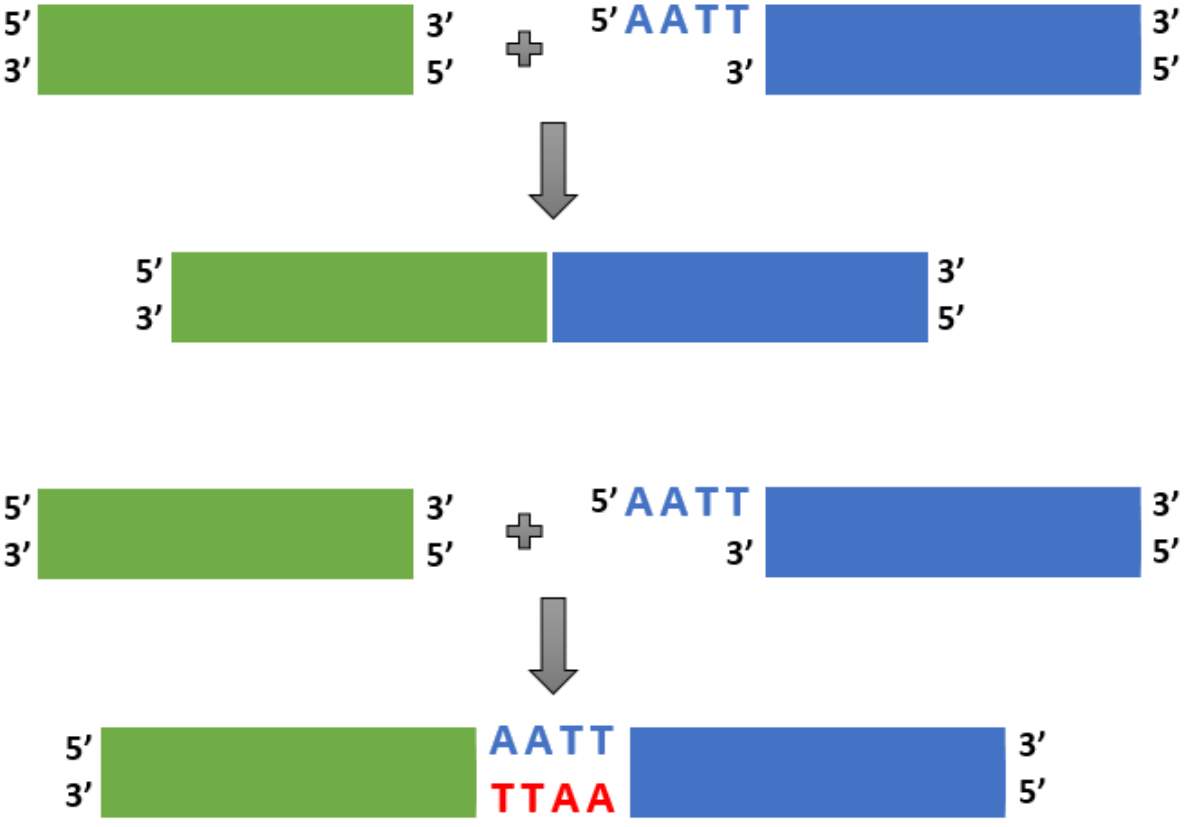


Рис. 83. **Схема з’єднання ділянок ДНК по різнойменним кінцям**

Коннекторний метод з'єднання фрагментів ДНК. Суть методу полягає у приєднанні до кінців одного з фрагментів ДНК одноланцюгового полінуклеотиду, наприклад, полі-А (dA), а до іншого – комплементарного до нього, наприклад, полі-Т (dT) (рис. 84). Процес приєднання ділянок полі-А і полі-Т здійснюється за допомогою ферменту – кінцевої трансферази. Фрагменти, що добудовані таким чином потім змішують і обробляють ДНК-лігазою. При цьому між фрагментами вбудовуються ділянки dA/dT. Такі додаткові послідовності можуть впливати на функції молекул, що з'єднуються, і тому бажано для отримання рекомбінантних молекул ДНК використовувати «липкі» кінці, створені внаслідок дії рестриктаз.

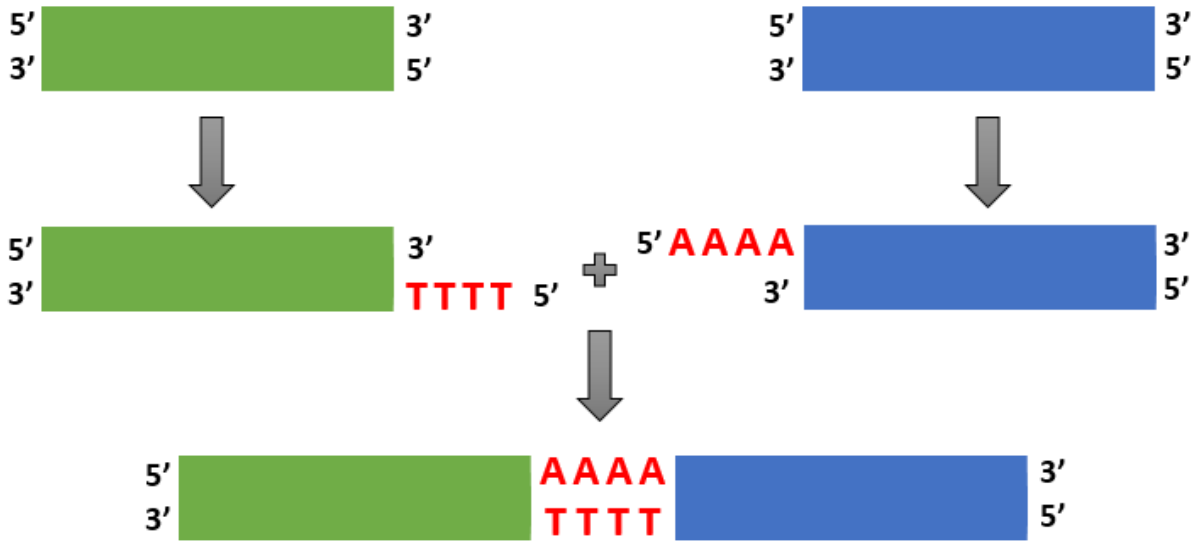


Рис. 84. **Схема з'єднання ділянок ДНК конекторним способом**

Лінкерний метод з'єднання фрагментів ДНК. У тому випадку, коли необхідно зшити фрагменти, що створені різними рестриктазами, які мають різні, тобто не комплементарні один до одного кінці, використовують так звані *лінкери* (або «перехідники»). *Лінкери* – хімічно синтезовані олігонуклеотиди, що являють собою сайти рестрикції або їх комбінацію. Існує велика кількість таких генних «перехідників». Часто усередину лінкеру розташовують який-небудь регуляторний генетичний елемент, наприклад, промотор або ділянку пов'язану із рибосомою. В цьому випадку лінкери не лише забезпечують поєднання генів, але й зумовлюють їх експресію. Існують лінкери «тупий кінець – липкий кінець».

Розроблений підхід включає наступні операції (рис. 85):

- по тупих або липких кінцях фрагменту ДНК, який необхідно рекомбінувати, за допомогою лігази фага Т4 приєднують короткі

синтетичні дволанцюгові сегменти, що містять сайти розпізнавання для певної рестриктази II;
- отриманий фрагмент обробляють обраною рестриктазою II, внаслідок чого створюються липкі кінці;
- отримані фрагменти рекомбінують *in vitro* з іншими молекулами ДНК звичайним методом.

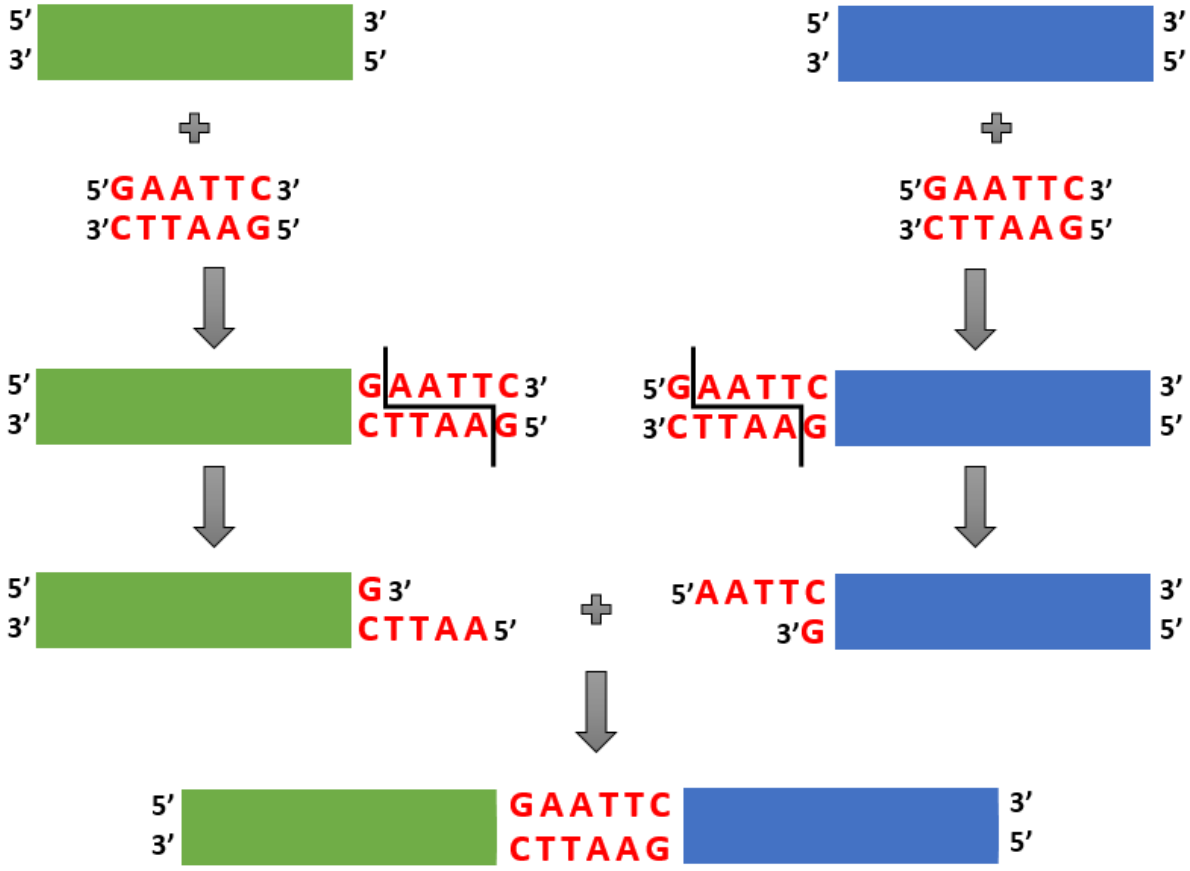


Рис. 85. **Схема з'єднання ділянок ДНК лінкерним способом**

Використання лінкерів робить цей метод рекомбінації фрагментів ДНК *in vitro* універсальним, оскільки початкові фрагменти можна отримувати різними способами.

Лінкерний метод у порівнянні із коннекторним більш використовується у генно-інженерних модифікаціях, оскільки він простіший й, крім того, дає можливість легко вилучати вбудований фрагмент із гібридної молекули ДНК, що буває важливим при перенесенні фрагмента в інше генетичне оточення.

9.6. Види векторів

Гени, які можна отримати одним з вище описаних способів, містять інформацію про структуру білку, але самі по собі не здатні

реалізувати цю інформацію. Для цього необхідні додаткові механізми, які керують експресією, тому перенесення генетичної інформації в клітину здійснюється у складі векторів. *Векторами* називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і/або трансформацію (переніс у інші організми). Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення у клітину додаткову генетичну інформацію. У наш час створено значну кількість векторів, які розрізняють за профілем їх використання на декілька типів.

У цілому до векторних молекул надають наступні основні вимоги:

- вектор повинен мати унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз (в найкращому випадку по одному для кожної), що надає можливість вбудувати в нього фрагмент чужорідної ДНК;
- вектор повинен володіти певною ємністю і не виключати вбудований фрагмент;
- вектор повинен бути репліконом, тобто здатним до реплікації, в певних клітинах за рахунок послідовності початку реплікації або власної, або клітини-господаря;
- вектор повинен містити послідовність маркерного гену, за допомогою якої можливо здійснити селекцію клітин на наявність векторної конструкції.

Для конструювання векторів у генній інженерії використовують хромосоми вірусів, фрагменти хромосом еукаріотичних клітин, а також невеликі молекули нуклеїнових кислот, здатних до автономної реплікації в бактеріальних і еукаріотичних клітинах – *плазміди*. Найбільшого застосування в генетичній інженерії знайшли *бактеріальні плазміди*, особливо плазміди *E.coli*. Бактеріальні плазміди підрозділяються на *кон'югативні*, тобто здатні до перенесення генетичної інформації від клітини до клітини шляхом кон'югації бактерій, і *некон'югативні*, що передаються від однієї клітини до іншої за допомогою механізму *трансформації*. Деякі плазміди здатні до ампліфікації, тобто утворюють у клітині велике число копій, що різко підвищує рівень фенотипового вираження їх генів.

При використанні в якості генетичних векторів *вірусів* виникає проблема – послаблення їх патогенності для господаря. Велике значення для біотехнології має здатність вірусів швидко транспортуватися із клітини в клітину, поширюючись по рослинній або тваринній тканині так, що в короткі терміни розвивається

генералізована інфекція по усьому організму. Така властивість вірусів дає можливість генетичної модифікації соматичних клітин дорослого організму, що є перспективним при лікуванні спадкових захворювань людини шляхом введення вірусів, що розносять бракуючі гени по усіх ~10^{11} клітинам людського тіла.

За допомогою плазмідних векторів можна клонувати фрагменти ДНК довжиною до 10 т.п.н. Однак, при створенні геномних бібліотек часто доводиться працювати з більшими фрагментами. Для цього розроблено вектори на основі *бактеріофага* λ *E.coli.* ДНК фага λ – це лінійна дволанцюгова молекула довжиною 50 т.п.н. з одноланцюговими 5'-«хвостами» з 12 нуклеотидів, Їх називають липкими (*cos*) кінцями, оскільки вони взаємно комплементарні й можуть спаровуватися один з одним. Після того як фагова ДНК проходить через відросток і потрапляє в *E. coli, cos*-кінці з'єднуються з утворенням кільцевої молекули.

Розмір ДНК фага λ становить приблизно 50 т.п.н., причому значна її частина (близько 20 т.п.н.) несуттєва для розмноження фага й відповідає за його вбудовування в ДНК господаря. У зв'язку із цим виникла ідея, що її можна замінити фрагментом іншої ДНК еквівалентного розміру. Рекомбінантна молекула, що створюється, буде реплікуватися у клітині як ДНК рекомбінантного фага λ, що встав на літичний шлях розвитку.

У результаті досліджень по вивченню збірки фага λ була розроблена система пакування молекул ДНК *in vitro* з утворенням інфекційних фагових часточок. Змішавши в пробірці очищені порожні головки, фагову ДНК і зібрані відростки, можна отримати інфекційні фагові часточки.

Фагові вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК довжиною 15-25 т.п.н. Однак цього явно недостатньо, щоб клонувати багато генів тварин і рослин, довжина яких найчастіше перевищує 35-40 т.п.н. Необхідною місткістю володіють векторні молекули, які називаються *космідами* (*cosmid*). Космід являють собою невеликі плазміди, у які *in vitro* введені *cos*-сайти ДНК фага λ. Звідси і назва всього типу векторів.

Таким чином, наявність *cos*-сайтів у ДНК є, власне кажучи, єдиною необхідною умовою для упакування ДНК у фагові часточки. Це означає, що послідовність нуклеотидів λ-ДНК, що розташована між двома *cos*-сайтами, містить у собі весь фаговий геном (35-45 т.п.н.), може бути заміщена *in vitro* на аналогічний за довжиною (38-52 т.п.н.)

фрагмент чужорідної ДНК і ефективно впакована у фагові частки (така максимальна місткість головки фага). Природно, що така штучна фагова часточка виявляється нежиттєздатною.

Однак, після адсорбції химерної фагової часточки, на поверхні бактеріальної клітини укладена в ній ДНК проникає (уводиться фаговою часточкою) усередину бактерії й починає автономно реплікуватися як плазміда, розмір якої становить 30-40 т.п.н. Оскільки така плазміда (косміда) містить у своєму складі селективні маркери у вигляді генів стійкості до антибіотиків, її підтримують у бактеріальних клітинах шляхом вирощування бактерій на середовищі з відповідними антибіотиками.

У випадку космід подібність між їхнім проникненням у бактеріальні клітини й фаговою інфекцією на цьому закінчується. Однак подібність є більш глибокою у випадку векторів, називаних *фазмідами*. Вони являють собою векторні молекули ДНК, які містять у собі генетичні елементи плазмід і хромосом бактеріофагів. Фазміди можуть мати місткість у відношенні клонуємої ДНК, характерну для λ-векторів, та існувати в певних умовах у бактеріальних клітинах у вигляді плазміди або ж упаковуватися у фагові часточки *in vivo* при зміні цих умов.

Дослідження генів вищих рослин і тварин зажадало створення векторів для клонування фрагментів ДНК довжиною в кілька сотень тисяч пар основ. Цим завданням відповідає система, створена для клонування наддовгих молекул ДНК на основі штучно отриманої міні-хромосоми дріжджів *YAC* (англ. *Yeast Artificial Chromosome)*. *YAC*-вектор являє собою кільцеву молекулу ДНК, що містить ряд генетичних елементів, які дозволяють їй існувати у позахромосомному стані в клітинах дріжджів.

Сучасні *BAC*-вектори, що засновані на *штучних хромосомах бактерій – BAC* (англ. *Bacterial Artificial Chromosome*), дозволяють клонувати фрагменти ДНК довжиною до 300 т.п.н. і вище. Рекомбінантні молекули вводяться в клітини *E. coli* за допомогою електропорації, причому ефективність утворення трансформантів в 10-100 разів вище, ніж при звичайній трансформації *сферопластів* (клітини, оболонка яких зруйнована лише частково) дріжджів векторами сімейства *YAC*. Це дозволяє зменшити вихідну кількість ДНК, необхідну для конструювання репрезентативних клонотек генів.

9.7. Геномна бібліотека (банк генів)

Джерелом ДНК для генно-інженерних операцій є геноми різних організмів. Геном може бути перетворений на бібліотеку генів шляхом ферментативного гідролізу ДНК або РНК і включення отриманих фрагментів у відповідні вектори.

Розрізняють два основні різновиди бібліотек генів:

- бібліотеки геномів;
- бібліотеки кДНК.

Бібліотеки геномів отримують шляхом розщеплювання ДНК генома з допомогою гідролаз рестриктазного типу з наступним включенням отриманих фрагментів у циклічні генетичні конфігурації типу плазмід, фагових векторів та ін. (рис. 86).

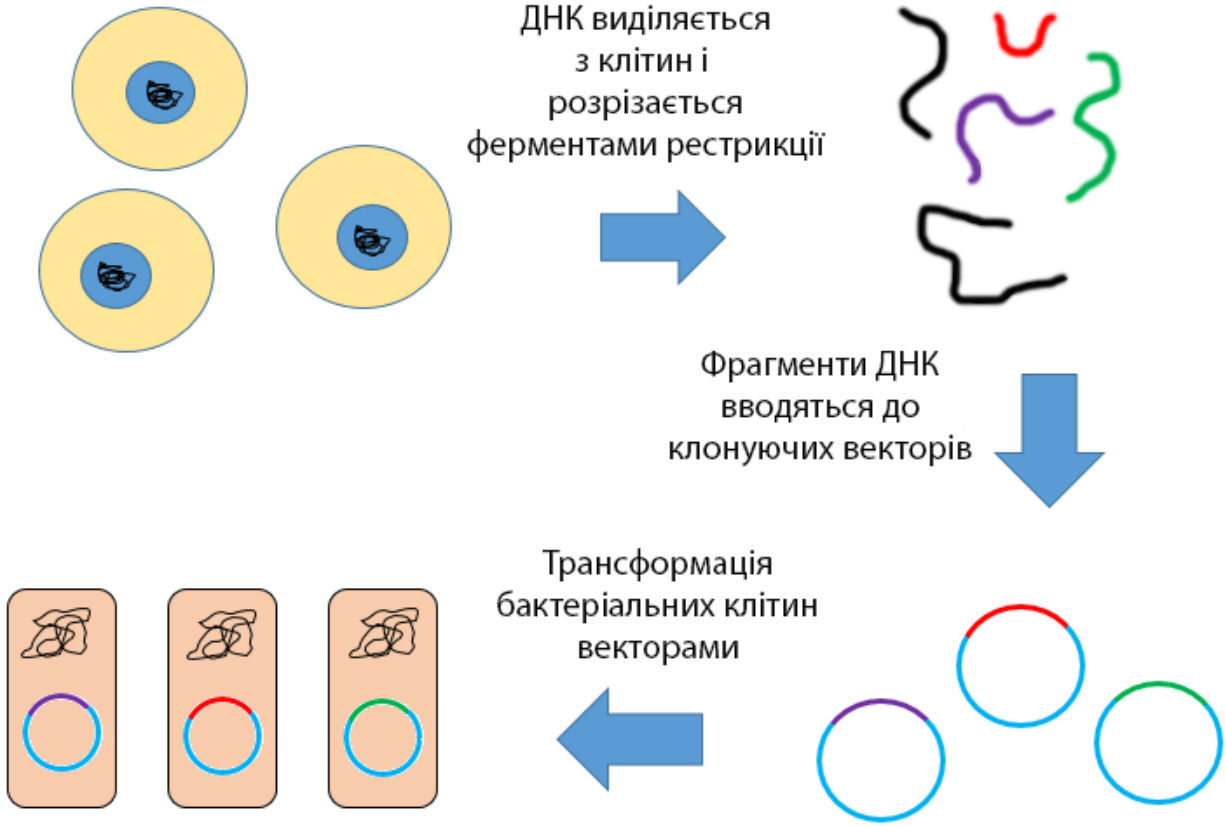


Рис. 86. **Створення банку генів за допомогою плазмід**

Оскільки у прокаріот кодуючи домени (ділянки) структурних генів безперервні, а у еукаріот кодуючи області (екзони) розділені не кодуючими (інтронами), то при їх клонуванні використовуються різні методи. У прокаріот сумарну ДНК гідролізують рестриктазою і кожен з отриманих фрагментів вбудовують у вектор.

Фрагменти, що отримані, з'єднують з ДНК векторів за допомогою лігази і, за можливістю, упаковують в підготовлені головки фагових часточок. Бібліотеку зберігають у вигляді фагового банку під хлороформом при t = -70°С. Таким чином бібліотека здатна зберігатися десятки років.

Для клонування еукаріотичних структурних генів необхідні спеціальні методики. Прокаріоти не здатні видаляти інтрони з первинних РНК-транскриптів, тому правильна трансляція еукаріотичних мРНК у бактеріальній клітині неможлива. Більш того, експресія еукаріотичної ДНК може здійснюватися тільки за наявності прокаріотичних сигнальних послідовностей, що регулюють транскрипцію й трансляцію. Саму мРНК не можна вмонтувати у ДНК-вектор, спочатку на ній необхідно синтезувати дволанцюгову ДНК. Для цього послідовно використовують дві різні полімерази: зворотну транскриптазу й фрагменти Кленова ДНК-полімерази I. Отриманий препарат являє собою суміш частково й повністю дволанцюгових комплементарних ДНК-копій (кДНК) мРНК, що переважно містилася у вихідному зразку. *Бібліотеки кДНК* включають не увесь геном, а тільки активовані гени, які добре експресуються і дають відносно високий рівень мРНК. У цьому випадку з клітини виділяють фракцію мРНК; за допомогою ферменту «зворотної транскриптази» на матриці мРНК синтезуються фрагменти ДНК, суворо відповідно до структури білків, і включають отримані гени в плазмідні або фагові вектори. Бібліотека генів у формі кДНК є більш зручною, оскільки виключає усі можливі баластні структури, представлені в геномі, наприклад інтрони. Справа у тому, що в процесі транскрипції відбувається виключення інтронів, і ген виходить в «чистому вигляді».

Отриманий набір векторів із включеним до них шуканим геном вводиться до клітини, і відбір потрібної клітини, що експресує той або інший ген, здійснюється в процесі клонування.

9.8. Перенесення генів до клітин організму-реципієнта

Необхідний етап генно-інженерного експерименту – введення отриманих *in vitro* гібридних молекул ДНК у клітини, що забезпечують реплікацію цих молекул, з метою розмноження, селекції і виділення клонів гібридів.

Процес, внаслідок якого чужорідна ДНК проникає у клітину-реципієнт і викликає у ній зміни, що спадкуються, має назву

трансформація. Трансформацію клітин можуть здійснювати як молекули ДНК, що реплікуються у клітинах позахромосомно (плазміди), так і молекули ДНК, що інтегруються у геном клітини (лінійні і кільцеві молекули ДНК).

Трансдукція – це перенесення генетичної інформації від клітини донора до клітини-реципієнта за допомогою фагу (рис. 87).

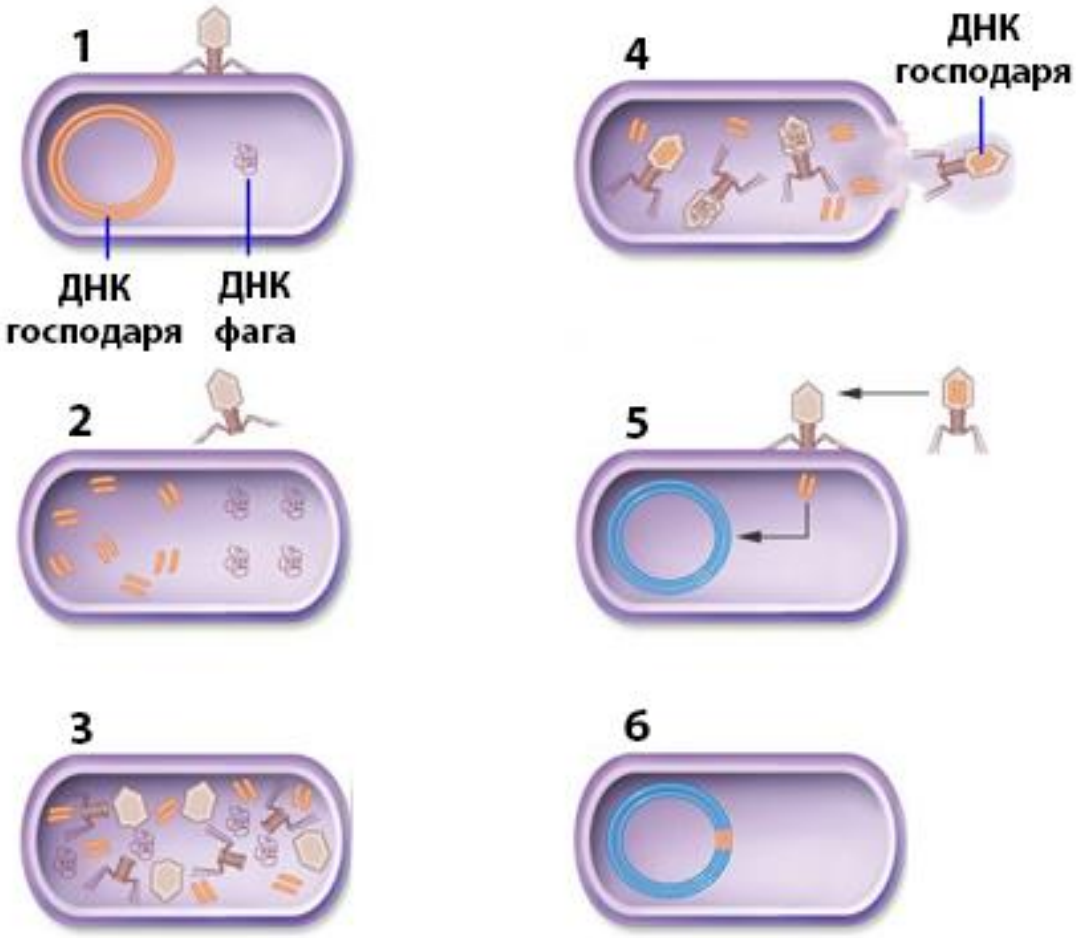


Рис. 87. **Процес трансдукції бактеріальної клітини**

Інколи, в процесі потрапляння (крок 1) і розмноження фагів (крок 2 і 3) у бактеріях створюються часточки, які поряд з фаговою ДНК або замість неї містять фрагменти бактеріальної ДНК (крок 4). Такі часточки мають назву *трансдукуючі*. За своїми властивостями вони не відрізняються від звичайних фагових *віріонів* (фагові часточки, складаються з ДНК (або РНК) і білку), але при зараженні ними нових клітин (крок 5) вони передають їм генетичні детермінанти попередніх господарів (крок 6). Таким чином відбувається процес трансдукції.

Однак, нема потреби очікувати коли ДНК фагу буде захоплювати фрагмент чужорідної ДНК для її внесення в клітину-реципієнту, якщо можливо штучно створити рекомбінантну ДНК фагу і

використовувати такий фаг в якості вектору (наприклад, для клонування великих фрагментів ДНК). Тем більш, що фаговий вектор вводить рекомбінантну ДНК при зараженні клітини, тобто *методом інфекції*, що значно ефективніше, ніж шляхом трансформації або трансдукції. Введення у клітину нуклеїнової кислоти вірусу з наступним утворенням вірусних нащадків називається *трансфекцією*.

Були виявлені також плазміди, які мали генетичні системи, що детермінують перенесення плазмід в інші клітини внаслідок кон'югації (рис. 88).

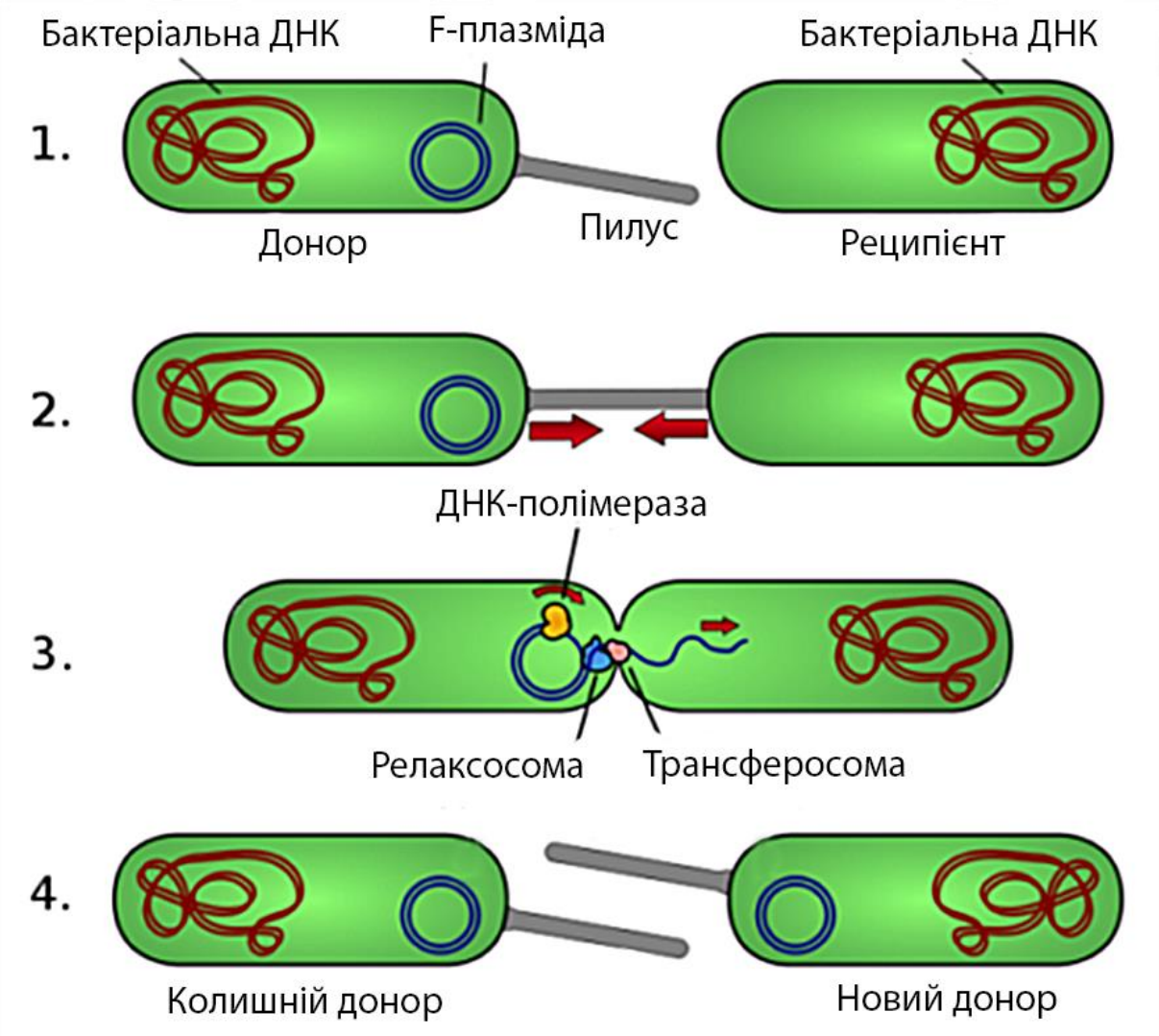


Рис. 88. **Схематичне зображення кон'югації у бактерій:**
1. Клітина-донор випускає статевий пилус; 2. Пилус прикріплюється до клітини-реципієнту, з'єднуючи дві клітини; 3. У мобільній плазміді відбувається одноланцюговий розрив, і один ланцюг ДНК переходить в клітину-реципієнт; 4. Обидві клітини добудовують другий ланцюг ДНК плазміди, відновлюючи дволанцюгову кільцеву плазміду, і утворюють статеві пилуси. Тепер обидві клітини є повноцінними донорами.

Кон'югація – це процес генетичного обміну, при якому здійснюється перенесення генетичної інформації від клітини-донора до клітини-реципієнта при безпосередньому контакті клітин між собою. За здатністю до кон'югативного переносу *плазміди* поділяються на *кон'югативні* і *некон'югативні*. Кон'югативні плазміди містять, так званий фактор фертильності F. Клітини, що містять цей фактор стали називати клітинами F^+ , а клітини, які не містять цього фактору – клітинами F^-. Виявилося, що клітини з фактором F завжди є донорами генетичного матеріалу, а клітини, в яких цей фактор відсутній – реципієнтами. Щоб клітину легко можна було трансформувати вона має бути *компетентною*. Компетентність бактеріальних клітин досягають обробкою: $CaCl_2$, поліетиленгліколем, дією теплового удару.

ДНК, також, легко проникає в клітину через цитоплазматичну мембрану *протопластів*. Протопласти бактерій отримують при обробці лізоцимом, який гідролізує мукопептиди клітинної стінки. Протопласти клітин рослин і дріжджів отримують, руйнуючи ферментами поліцукриди оболонки. Ефективність трансформації протопластів еукаріот збільшує диетиламіноетилдекстран і поліетиленгліколь. ДНК у клітини вищих організмів вводять мікроін'єкцією.

9.9. Ідентифікація клітин-реципієнтів, які отримали бажаний ген (гени)

Після трансформації, кон'югації або трансфекції необхідно *ідентифікувати клітини*, що несуть ген-мішень.

Успіх генно-інженерного проекту залежить від ефективності використаного методу відбору, оскільки після трансплантації генів тільки невелика частина клітин містить необхідний ген. Відбір клітин проводять у дві стадії:

1) Відбір клітин, що несуть відповідний вектор. Відбір проводиться за генетичними маркерами, якими помічений вектор. Наприклад, детермінанти стійкості до антибіотиків на векторі дозволяють збагатити бактеріальну популяцію клітинами, що містять цей вектор, при їх висіві на середовище з антибіотиком.
2) Пошук клітин, що несуть не лише вектор, але і ген-мішень. Для цього використовують дві групи методів:

① Методи, засновані на безпосередньому аналізі ДНК клітин-реципієнтів:
- визначення нуклеотидної послідовності ДНК: з клітин, що імовірно містять необхідний ген, виділяють векторну ДНК, в якій проводиться пошук ділянок, що несуть цей ген; потім проводять секвенування частини нуклеотидної послідовності гена;
- гібридизація виділеної з клітин ДНК із зондом, який може бути або геном, яким цікавляться, або відповідна йому мРНК. Заздалегідь ізольовану ДНК переводять в одноланцюговий стан і вводять її у взаємодію з одноланцюговим зондом ДНК- (чи РНК-). Далі визначають присутність дволанюгових гібридних молекул ДНК.

② Методи, засновані на ідентифікації ознаки, що кодується геном:
- безпосередній відбір клітин, що синтезують білок – продукт експресії гена-мішені, або клітин, які утворюють з'єднання, в синтезі якого беруть участь ферменти, що кодуються геном;
- використання селективних середовищ, що підтримують зростання тільки тих клітин, які отримали ген-мішень;
- імунологічна детекція застосовується, якщо шуканий ген у складі рекомбінантної ДНК експресується, але ніяк не впливає на фенотип організму.

Досить швидко було розроблено методи специфічної ідентифікації гена, методи «розрізання» і «склеювання» ДНК за допомогою ферментів (отримання рекомбінантної ДНК), створено генетичні конфігурації, що забезпечують введення нової генетичної інформації в клітини і високу ефективність експресії нових генів. Для хімічної ензимології суттєвим було створення методів *сайт-специфічного мутагенезу*, тобто створення можливості заміни однієї амінокислоти на іншу в поліпептидному ланцюзі. Розроблені методи стали використовуватися в першу чергу для отримання і дослідження ферментів. Розвиток генетичної інженерії (чи технології рекомбінантної ДНК) привів до того, що генетична інженерія стала рядовим методом хімічної ензимології.

9.10. Основи геноміки

Тривалий час *геномом* називали гаплоїдний набір хромосом. Накопичення відомостей про інформаційну роль позахромосомної

ДНК змінило визначення терміну «геном». Нині він означає сукупність всієї спадкової генетичної інформації організму, тобто всіх генів, некодуючих послідовностей ДНК та позахромосомного генетичного матеріалу. Можна вважати, що *геном* – це повний набір інструкцій для формування і функціонування індивіда.

Загальні принципи побудови геномів і їх структурно-функціональну організацію вивчає *геноміка*, яка проводить:

- ✓ секвенування;
- ✓ картування;
- ✓ ідентифікацію функцій генів і позагенних елементів.

Методи геноміки спрямовані на розшифровку нових закономірностей біологічних систем і процесів. Геноміка людини є основою молекулярної медицини і має найважливіше значення для розробки методів діагностики, лікування і профілактики спадкових і неспадкових хвороб. Для медицини першочергове значення мають дослідження в галузі геноміки патогенних мікроорганізмів, оскільки вони «проливають світло» на природу інфекційного процесу і створення ліків, спрямованих на специфічні мішені бактерій.

Геноміка, незважаючи на її «молодий вік», підрозділяється на декілька умовно самостійних напрямів:

- ☛ структурну;
- ☛ функціональну;
- ☛ порівняльну;
- ☛ еволюційну;
- ☛ медичну.

Структурна геноміка вивчає послідовність нуклеотидів в геномах, визначає межі і будову генів, міжгенних ділянок і інших структурних генетичних елементів (промоторів, енхансерів, тощо), тобто складає генетичні, фізичні і транскрипційні карти організму.

Функціональна геноміка. Дослідження в цій галузі спрямовані на ідентифікацію функцій певного гена або ділянки генома, а також вивчення їх взаємодії в клітинній системі. Вочевидь, це здійснюватиметься шляхом вивчення білкових ансамблів в різних клітинах. Цю область досліджень ще називають *протеомікою*.

Порівняльна геноміка вивчає схожість і відмінності в організації геномів різних організмів з метою з'ясування загальних закономірностей їх будови і функціонування.

Еволюційна геноміка пояснює шляхи еволюції геномів, походження генетичного поліморфізму і біорізноманітності, роль

горизонтального перенесення генів. Еволюційний підхід до вивчення генома людини дозволяє простежити за тривалістю формування комплексів генів, окремих хромосом, стабільністю його частин, нещодавно виявленими елементами «непостійності» генома, процесом расоутворення, еволюцією спадкової патології.

Медична геноміка вирішує прикладні питання клінічної і профілактичної медицини на основі знання геномів людини і патогенних організмів (наприклад, діагностика спадкових хвороб, генотерапія, причини вірулентності хвороботворних мікроорганізмів, тощо).

Усі кроки еволюції живої природи, поза сумнівом, повинні були закріплюватися в інформаційній системі ДНК (а для деяких істот – у РНК), а також в організації її клітин і для виконання консервативної функції збереження спадковості та протилежної до неї – підтримки мінливості. Таке уявлення про формування геному кожного виду найбільш обґрунтовано. Стосовно геному людини можна сказати, що еволюція людини – це еволюція генома. Таке представлення підтверджується нині численними молекулярно-генетичними дослідженнями, оскільки стало можливим зіставлення геномів різних видів ссавців, у тому числі людиноподібних мавп, а також у межах виду *Homo sapiens* геномів різних рас, етносів, популяцій людини і окремих індивідів (рис. 89).

Рис. 89. **Представники виду *Homo sapiens***

Організація генома кожного еукаріотичного виду є послідовною ієрархією елементів: нуклеотидів, кодонів, доменів, генів з міжгенними ділянками, складних генів, плечей хромосом, хромосом гаплоїдногонабору разом з позахромосомною і позаядерною ДНК. В еволюційному перетворенні генома кожен з цих ієрархічних рівнів міг поводитися абсолютно дискретно (змінюючись, комбінуючись з іншими і так далі).

Наші уявлення про геном людини – велика область генетики людини, що включає щонайменше поняття «інвентаризації» генів, груп зчеплення, картування генів (локалізація), секвенування усієї ДНК (генів, їх мутацій і хромосом у цілому), мейотичних перетворень, функціонування окремих генів і їх взаємодій, інтеграції структури і функції генома в цілому. На вирішенні усіх цих питань була зосереджена велика багаторічна міжнародна програма «Геном людини» (з 1990 по 2000 р.). Головним напрямом робіт було послідовне секвенування ділянок генома і їх «стикування». Успішні розробки в цій області надали програмі клініко-генетичний аспект.

Виявлення в різних геномах певних наборів генів метаболічних функцій дозволяє припустити функціональний зв’язок генів цього набору в єдиний блок метаболічного ланцюга.

На даний момент просеквеновано кілька сотень геномів бактерій і геноми декількох еукаріот (табл. 8).

Таблиця 8

Розміри геномів та кількість генів різних організмів

Організми	Геном (м.п.н.)	Число генів (тис.)	Розмір гену (т.п.н.)	Суттєвих генів
Бактерії	0,5-5	0,47-4,29	1-1,7	<50%
Дріжджі	12	6	2	<20%
Нематода	97	19	5	<10%
Людина	3000	30	30	<5%

Відомо, що у бактерій розмір генома не буває менше 0,5 м.п.н. і більше 10 м.п.н. Натомість у дріжджів (еукаріотичний організм) геном містить близько 12 м.п.н., у хробака нематоди – 97 м.п.н., а у людини – 3 млрд п.н. Тим часом, число генів у про- і еукаріот відрізняється вже в менше число разів. Мінімальна кількість генів у бактерії мікоплазми – 470 штук, у дріжджів – 6000, у нематоди – 19000, а у людини близько 20000, тобто від нематоди за кількістю генів ми не

сильно відрізняємось. Кількість хромосомної ДНК, що припадає на один ген у бактерій – 1000 п.н., тобто гени упаковані дуже щільно; у дріжджів – 2000 п.н., і подекуди гени розділені деяким простором; у нематоди – 5000 п.н. на ген і з'являються простори всередині генів – інтрони; у людини – 30000 п.н. У нас в геномі існують великі міжгенні простори і великі простори усередині генів, які не переходять у зрілу РНК.

Зауважимо, всі ці організми за розмірами зрілих транскриптів не сильно відрізняються. У зрілій РНК білок-кодуюча ділянка займає, звичайно, основну частину послідовності. Частина генів кодує РНК, з якою білок взагалі не синтезується. Попереду білок-кодуючої послідовністі у зрілій мРНК розташовані ділянки регуляції трансляції, а після білок-кодуючої послідовності – ділянки, що визначають стабільність (час життя РНК). У прокаріотів послідовності перед і після білок-кодуючою частиною набагато коротші, ніж у еукаріот. Отже, за розмірами РНК всі організми ближче, ніж за розмірами генів, а за розмірами білків – ще ближче.

Експериментально проводили «виключення» кожного гена у багатьох бактерій, і дивилися, чи виживуть вони в даних умовах, чи ні. Виявилось, що у бактерій можна «вимкнути» (по черзі) близько 50% генів, і вони все одно будуть жити. У дріжджів також можна вимкнути 80% генів і ті так само будуть жити.

У нематоди на 20 000 генів отримано кілька десятків тисяч мутацій, які, мабуть, вражають близько 2 000 генів (так званих груп комплементації). Це близько 10% всіх генів нематоди. Тобто якщо «вимкнути» близько 90% генів, клітина буде продовжувати жити. У людини з 20 000 генів тільки в 1700 (менше 10%) відомі мутації, які пов'язані з хворобами, успадковуваними за Менделем як олігогенна ознака.

У геномі не всі його ділянки транскрибуються. У зв'язку з цим постало питання експериментального визначення, де і скільки в геномі генів. Під одним *геном* розуміється ділянка ДНК, яка відповідає єдиному транскрипту, що створюється з цієї ділянки.

Для того щоб дослідити, чи дійсно ген функціонує, тобто чи транскрибується дана ділянка ДНК використовують мікрочипи. Частину гена поміщають до чипу (олігонуклеотиду, який іммобілізований на мікромайданчику матриці з певними координатами на ній). Цей олигонуклеотид відповідає частині екзона,

передбаченого комп'ютером на основі послідовності геномної ДНК. Щоб з'ясувати, чи дійсно геном в даній ділянці транскрибується, з клітини виділяється сумарна РНК. З усіх цих молекул РНК отримують ДНК-копії, які флуоресцентно мітять і проводять гібридизацію з іммобілізованими на мікрочипі олігонуклеотидами. Якщо в даних умовах якісь майданчики з олігонуклеотидами «мовчать», то це означає, що ділянка геномної послідовності, яка комплементарна цьому олігонуклеотиду, не транскрибується. Якщо ж майданчик матриці «світиться», значить в цьому майданчику відбулась гібридизація олігонуклеотидів з флуоресцентно міченим продуктом, тобто відповідна ділянка генома транскрибується і дійсно є частиною якогось гена.

Мікрочипи можуть використовуватись для дослідження змін рівня транскрипції генів, пов'язаних з виникненням або прогресією захворювання, (наприклад, пухлинного або інфекційного). Передбачається, що кожна хвороба, характеризується своїм штрих-кодом - зміною рівня транскрипції набору генів характерного саме для даної хвороби. Цей аналіз є дуже важливим для удосконалення функціональної діагностики в медицині.

Хоча число генів різниться у різних видів (табл. 9), але число так званих *білкових доменів* (структурні одиниці в білку, що відповідають за одиничну функцію) відрізняються в межах різних царств живого до півтора разів, не більше. Звичайно комбінації цих доменів різні, але самі домени схожі, тобто вони кодуються подібними за послідовностями нуклеотидів ділянками геному і ці подібні ділянки мають загальне походження в еволюції.

Таблиця 9

Характеристики еукаріотичних геномів

Організми	Розмір геному (м.п.н)	Число прогнозованих генів	Число родин білкових доменів
Дріжджі	12	6,144	851
Рослини	125	25,706	1012
Хробаки	100	18,266	1014
Муха	180	13,338	1035
Людина	3400	32,000	1262

Якщо функції білків подібні, це не означає, що їх структура буде однакова. Одна і та ж функція, наприклад, один і той же каталітичний процес, може виконуватися різними білками, що не споріднені за походженням. Один і той же процес може каталізуватися навіть як білком, так і РНК (рибозим), у яких немає нічого спільного в походженні.

У таблиці 10 наведено середні характеристики генів людини. Загальна довжина гена дорівнює 27 т.п.н. У ньому налічується 8,8 екзонів середнього розміру – 145 нуклеотидів, а розмір інтрона становить 3365.

Таблиця 10

Характеристика генів у геномі людини, значення середніх величин

Число екзонів на ген	8,8 шт.
Розмір екзону	145 н.п.
Розмір інтрону	3365 н.п.
Розмір 5’-нетрансльованої ділянки	300 н.п.
Розмір 3’-нетрансльованої ділянки	770 н.п.
Розмір кодуючої частини	1340 н.п.
Загальна довжина гену	27000 н.п.

У цілому виходить, що білок-кодуюча частина гена невелика порівняно з білок-некодуючою частиною, тому, коли відбуваються якісь мутації, велика ймовірність, що відбудеться мутація білок-некодуючої частини. Такі мутації або взагалі не позначаться на структурі білка, або призведуть до зміни його кількості, але не структури (зміни регуляторних ділянок ініціації транскрипції або стабільності РНК), або призведуть до драматичних змін структури РНК (мутації в мішенях для сплайсингу).

Загальна структура генома людини така (рис. 90):

- загальний розмір генома 3200 Mb;
- структурні гени займають всього 1200 Mb;
- основна частина геному – це псевдогени (нефункціональні гени, інактивовані мутаціями), різні фрагменти генів та інтрони;
- на екзони функціональних генів (сумарна довжина зрілих РНК) припадає 48 Mb;
- міжгенна ДНК займає 2000 Mb, вона представлена головним чином короткими розсіяними по всьому геному повторюваними послідовностями, які займають 1400 Mb.

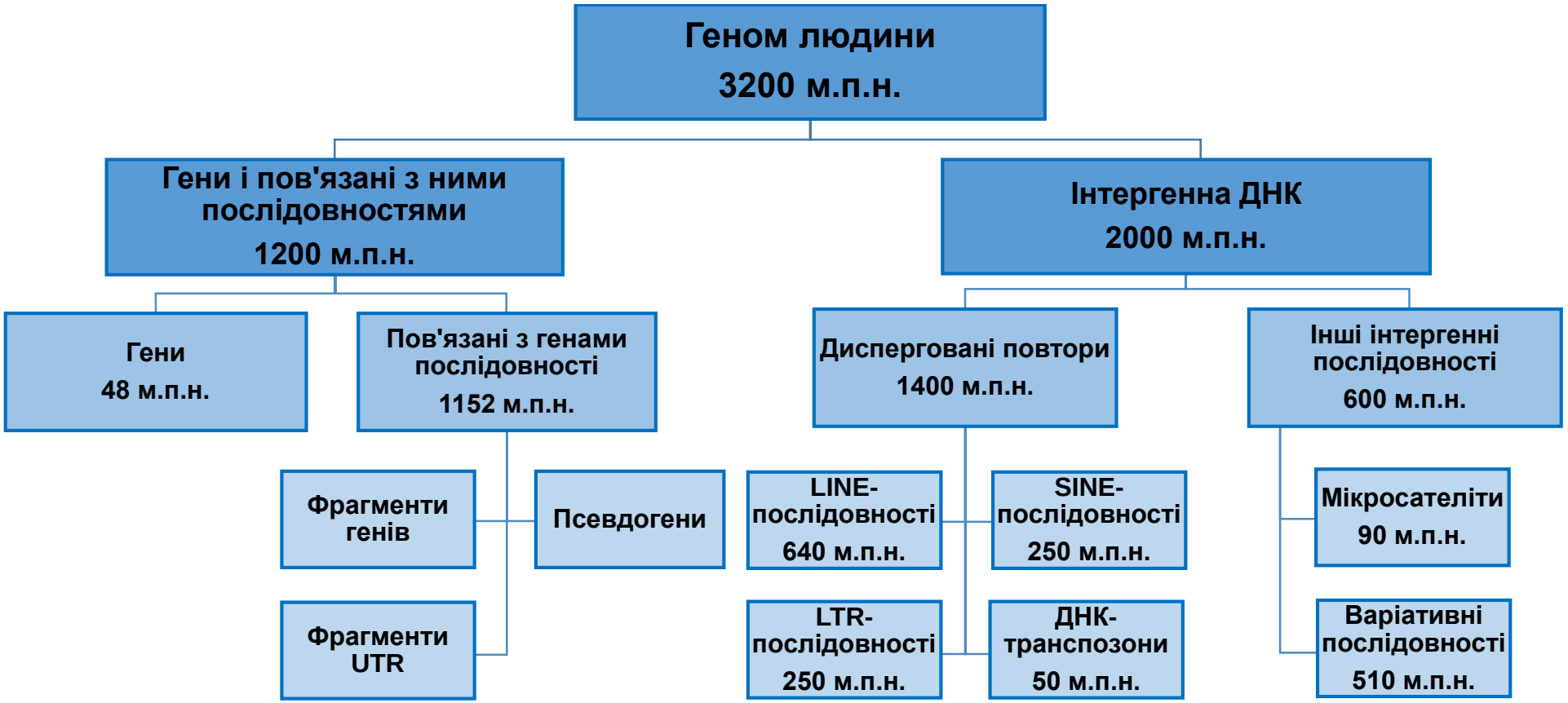


Рис. 90. **Геном людини: розміри областей, що зайняти елементами відомої структури**

Одним з останніх елементів – *Alu*-повтор, довжиною близько 300 п.н., повторений у геномі ~ мільйон разів. Інший тип розсіяних повторів – довгі кінцеві повтори (*LTR, long terminal repeat*). Ці елементи є молекулярними свідоцтвами переміщень фрагментів ДНК всередині генома. Загальна протяжність таких ділянок на молекулі ДНК – 250 Mb.

Основна частина генома людини зайнята не генами: 63-74% довжини – міжгенний простір, половина з нього – повтори. Ген людини всередині «порожній»: 95% внутрішньогенних ДНК вирізається (інтрони). Загальна довжина областей, що кодують білок, близько 1% від геномної ДНК людини. Це лише в 3 рази більше довжини геному бактерій.

Зараз передбачене число генів у людини, з яких утворюються транскрипти – 20-25 тисяч. З них експериментально підтверджено існування близько 19 000.

Окрім того, одному гену може відповідати в середньому 1,4 зрілих мРНК. Це пов’язано з тим, що транскрипт зрілої мРНК може містити екзони 1, 2, 3. Проте внаслідок альтернативного сплайсингу може утворитись РНК, яка містить екзони 1 і 2, або екзони 1 і 3, і в результаті з них будуть утворюватися різні білки (див. вище). Такий спосіб процесингу (обробки) генетичної інформації називається *альтернативний сплайсинг* (різноманітні комбінації екзонів, які залишилися в зрілій мРНК, отриману з однакової пре-мРНК).

Секвенування геному людини показало, що деякі екзони багаторазово повторені в геномі. Це можуть бути повтори екзонів у складі одного гена, або присутність одного і того ж екзона у складі кількох різних генів. Виходить, що екзони, основні елементи структури РНК, тобто білок-кодуючі елементи, в процесі еволюції можуть якимось чином розмножуватися в геномі і «перетасовуватись» між різними генами. Таке явище отримало назву *exon shuffling* – перетасовування екзонів. Таким чином, виявляється, що еволюція – це нерідко саме блокові зміни геному, а не точкові зміни.

Класифікація генів за їх функціями. Станом на 2001 рік для більш ніж 40% генів людини не було встановлено їх функцій, а для решти розкладка була досить умовною. Належність білка до одного функціонального класу не виключає його приналежності також і до іншого класу. Наприклад, те що білок зв’язується з ДНК, не означає, що він не може бути ще і ферментом, тощо. Це характеристика, яка

була дана гену з тієї його частини, яка пов’язана з описаною функцією, але така функція у білка може бути і не єдина (рис. 91).

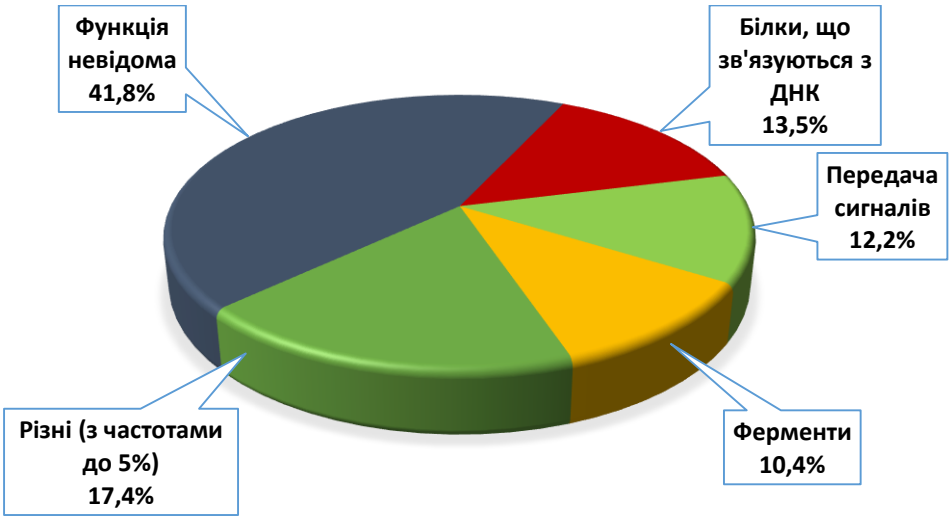


Рис. 91. **Розподілення функцій 26383 генів людини**

Вцілому серед ссавців найбільше генів відповідають за експресію, реплікацію і підтримку функцій геному; близько 20% – за передачу сигналів між клітинами, близько 17% – за те, щоб клітина нормально функцірнувала. Для інших генів здебільшого функції не класифіковані (рис. 92).

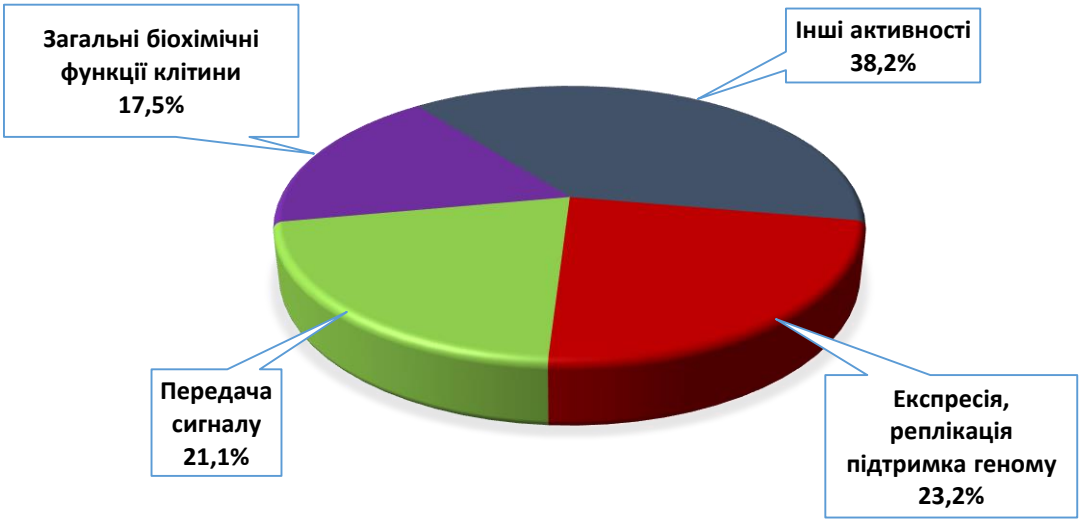


Рис. 92. **Розподіл генів ссавців за функціями**

Виявляється, що у людини, порівняно з дріжджами, бактеріями і т.ін., в геномі є більше генів-регуляторів транскрипції. Тобто, транскрипційні регулятори сильно розмножилися в еволюційній лінії ссавців, зокрема, людини. Передбачається що різноманітність регуляторів транскрипції забезпечує більшу тонкість реакції генома на сигнали зовнішнього середовища. Тобто у ссавців більше число

ансамблів координовано з генами, що транскрибуються, ніж в інших групах.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. Вкажіть напрями сучасних генетичних досліджень.
2. Вкажіть різницю між трьома типами ферментів рестрикції.
3. Які сайти рестрикції отримали назву «паліндром»?
4. Які функції виконують лігази?
5. Вкажіть етапи реакції лігування.
6. Які методи отримання генів існують?
7. На чому заснований метод гель-електрофоретичного розділення ділянок ДНК?
8. З яких етапів складається процес клонування ДНК?
9. Які існують методи конструювання рекомбінантних ДНК?
10. Що використовують у якості векторів?
11. Які вимоги надаються до векторів?
12. У чому полягає особливість фага λ в якості вектора?
13. У чому полягає різниця між космідами і фазмідами?
14. У чому полягає різниця між геномними і кДНК бібліотеками?
15. Які існують способи перенесення генів до клітин-реципієнтів?
16. Які існують методи ідентифікації клітин, що придбали новий ген?
17. Які напрями геноміки розрізняють?
18. Яким чином у геномних дослідженнях з’ясовують здатність ділянки ДНК до транскрипції?

10. ДНК-технології дослідження генома

10.1. Загальний опис методів

Методи виявлення нуклеотидних замін ДНК у геномі дозволили дослідникам розібратися в природі багатьох спадкових хвороб людини. Ці методи дають можливість ідентифікувати специфічні мутації, які призводять до захворювання, а також поліморфні ділянки ДНК, що використовуються як маркери в генетичному аналізі. Завдяки розвитку методів виявлення нуклеотидних замін стала реальністю пренатальна діагностика багатьох спадкових хвороб людини. Якщо ген, що відповідає за захворювання, відомий, відповідну мутацію можна виявити в ДНК геному або в РНК за допомогою блот-гібридизації з використанням мічених олігонуклеотидів як гібридизаційних зондів. У тому випадку, коли нуклеотидна послідовність, яка мутувала, невідома, заміни нуклеотидів можна визначити за *поліморфізмом довжини рестрикційних фрагментів* (*ПДРФ*). ПДРФ виявляється за наявністю або відсутністю сайту рестрикції у фрагменті ДНК генома при гібридизації міченого ДНК-зонду. При цьому попередньо ДНК генома обробляється рестриктазами, а отримані фрагменти розділяються за розміром в агарозному гелі і переносяться на мембранний фільтр. Цей метод виявився дуже ефективним для виявлення як значущих мутацій, так і нейтрального поліморфізму в геномі людини й інших організмів. Проте велику частину мутацій і поліморфних ділянок генома не вдається виявити за допомогою аналізу ПДРФ, оскільки вірогідність того, що заміна нуклеотиду змінить саме сайт рестрикції, низька. Так, наприклад, багато точкових мутацій гена *p*-глобіну людини, які викликають таласемію (група спадкових захворювань крові, пов'язаних з порушенням вироблення гемоглобіну) не змінюють сайтів рестрикції, а тому не можуть бути безпосередньо визначені при аналізі ПДРФ. Крім того, виявилось, що в деяких ділянках геному ссавців поліморфізм незначний, що вкрай ускладнює виявлення в них ПДРФ навіть при використанні великого числа різних рестриктаз. Кожен з них дозволяє ідентифікувати принаймні 50% усіх можливих замін нуклеотидів на ділянці ДНК завдовжки до 1000 п.н.

10.2. РНКазне розщеплення

Поодинокі нуклеотидні заміни у фрагментах ДНК геному можна виявити при розщепленні неспарених ділянок у РНК-ДНК-дуплексах, обробляючи ці дуплекси РНКазою А. Етапи процедури:

1. Синтез рівномірно міченого одноланцюгового РНК-зонду з використанням транскрипції *in vitro* клонованого фрагмента ДНК.
2. Гібридизація зонду з послідовностями комплементу ДНК геномів. Якщо в ДНК, яка гібридизується є заміна нуклеотиду, то РНК-ДНК-дуплекси, що утворюються, містять одноланцюгові неспарені ділянки.
3. Обробка дуплексу РНКазою А, що призводить до розщеплювання ланцюга РНК по багатьох, хоча і не по усіх, неспарених нуклеотидах.
4. Аналіз мічених фрагментів РНК за допомогою денатуруючого гель-електрофорезу з наступною радіоавтографією. У цьому випадку розрізання РНКазою А по неспарених основах призводить до появи на радіоавтографах двох або більше мічених фрагментів РНК, розміри яких вказують на положення нуклеотидної заміни відносно кінців фрагменту ДНК. Один мічений фрагмент РНК, рівний за довжиною фрагменту ДНК, спостерігається у тому випадку, якщо в останньому немає нуклеотидних замін або якщо існуючі заміни перешкоджають розщепленню РНК-ДНК-дуплексу РНКазой.

При такій обробці розщеплюється близько 30-40% від загального числа неспарених ділянок в РНК-ДНК-дуплексі. Тестування фрагмента ДНК у двох незалежних реакціях РНКазного розщеплення з двома зондами, комплементарних кожному з його ланцюгів, дозволяє виявити в ньому 60-70% усіх можливих замін нуклеотидів, оскільки в цьому випадку виявляються навіть заміни комплементу в обох ланцюгах.

Оптимальними є РНК-зонди і відповідно є одноланцюгові ділянки ДНК завдовжки від 100 до 1000 нуклеотидів. У цьому випадку і сам зонд, і продукти його розщеплення легко виявляються за допомогою денатуруючого гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі, аналогічному тому, що використовується при секвенуванні ДНК. При цьому відношення сигналу до фону досить високе для отримання чітких результатів. Зовсім неважко напрацювати мічені одноланюгові

РНК-зонди набагато більшої довжини, але результати обробки таких довгих ланцюгів РНКазою неоднозначні.

Ще одна проблема, яка виникає при використанні зондів з довжиною ланцюга більше 1000 п.н., полягає в тому, що під дією РНКази разом із розщепленням РНК-ДНК-дуплексів по неспарених ділянках може відбуватися розрізання ланцюга РНК по комплементарних спарених ділянках дуплексу. Крім того, аналіз продуктів розщеплення довгих РНК-зондів вимагає проведення денатуруючого електрофорезу в агарозном гелі. При цьому у ряді випадків не вдається повністю розділити гібриди РНК-ДНК і результати виходять суперечливими, оскільки фрагменти РНК, що отримані при розщепленні її по неспарених ділянках, але залишилися пов'язаними з ДНК, виявляються в гелі в зонах, відповідних довжині усього зонду.

Для ефективнішого виявлення поодиноких нуклеотидних замін шляхом РНКазного розщеплення використовується по декілька зондів у кожній реакції відпалу/розщеплення. Проте отримані у такий спосіб результати часто дуже неоднозначні і важко піддаються інтерпретації. Через перераховані причини при дослідженні фрагментів ДНК на поодинокі заміни бажано використовувати в реакціях РНКазного розщеплення РНК-зонди завдовжки від 100 до 1000 нуклеотидів.

Рибонуклеаза може розщеплювати неспарені ділянки і в дуплексах РНК-РНК. Дослідження показали, що природні мутації в гені *p*-глобіну і штучні мутації в промоторній ділянці гена *p*-інтерферону можливо виявити при РНКазному розщепленні як РНК-ДНК-, так і РНК-РНК-дуплексів. На клонованій ДНК-матриці отримують рівномірно мічені одноланцюгові зонди «антисенсової РНК», які далі ренатурують з комплементарною мРНК. Дуплекси, що створюються, обробляють РНКазою, а потім ідентифікують продукти розщеплення денатуруючим електрофорезом у поліакриламідному гелі. Тому наведені нижче методики для дослідження зразків ДНК з рівним успіхом можуть використовуватися і при роботі з РНК.

10.3. Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез

Два фрагменти ДНК, що розрізняються лише делецією, інсерцією, одним неспареним нуклеотидом, або заміною одного нуклеотиду, можна легко розділити за допомогою денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (ДГГЕ). Принцип методу полягає в розподілі

дволанцюгових фрагментів ДНК електрофорезом у стандартному акріламідному гелі з лінійним градієнтом денатуруючих чинників – сечовини, формаміду або температури (рис. 93). Нижче наводяться теоретичні основи методу. Тут відмітимо тільки те, що розподіл дуже схожих фрагментів у гелі відбувається через різні температури плавлення їх ДНК.

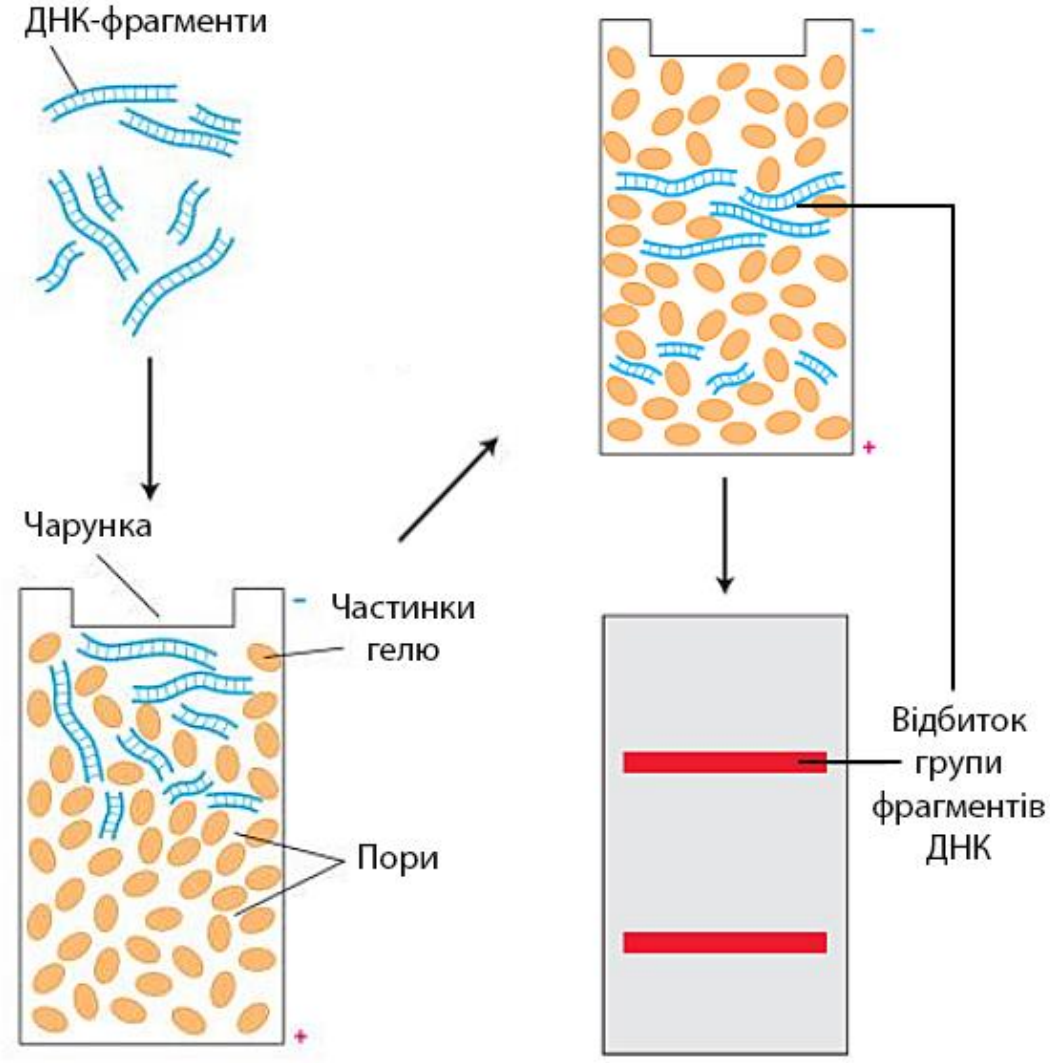


Рис. 93. **Механізм просування фрагментів ДНК під час електрофорезу**

Теоретичні основи методу ДГГЕ. При поступовому підвищенні температури або концентрації денатуруючої речовини відбувається плавлення дволанцюгової ДНК, і для кожного фрагменту параметри цього процесу різні. Усередині фрагмента є так звані *області плавлення* – блоки послідовностей, що плавляться одночасно при певних дискретних значеннях температури, яка і є температурою плавлення (ТП) цієї області. Довжина таких областей складає від 25 до

декількох сотень нуклеотидних пар. Два сусідні домени можуть мати чітку межу і розрізнятися по ТП на декілька градусів. Фрагменти ДНК завдовжки 100-1000 п.н. мають зазвичай від двох до п'яти областей плавлення. Температура плавлення доменів у рестрикційних фрагментах більшості зразків ДНК із природних джерел коливається від 65 до 80°С.

Загальновідомо, що нуклеотидний склад фрагментів ДНК впливає на температуру їх плавлення. Оптимальні умови для відпалу і відмивання нуклеїнових кислот у реакціях гібридизації підбирають виходячи з їх нуклеотидного складу. У значно меншій мірі враховується вклад *стекінг-взаімодій* (особливий вид Ван-дер-Ваальсових взаємодій між π–орбіталями циклічних молекулярних структур, який відіграє важливу роль у стабілізації структури нуклеїнових кислот) в термодинамічну стабільність подвійної спіралі. Енергія таких взаємодій між сусідніми нуклеотидами одного ланцюгу ДНК, що утримує його в скрученому стані у фізіологічних розчинах, більше енергії водневих зв'язків спаровування комплементу. Порядок чергування основ визначає міру стекінга і, отже, впливає на термостабільність фрагменту ДНК. Навіть поодинока нуклеотидна заміна може так сильно позначитися на стекінг-взаімодії, що ТП зміниться більш ніж на 1°С.

Метод електрофоретичного розподілу близьких послідовностей ДНК, розроблений Лерманом і Фішером, заснований на використанні відмінностей в температурі плавлення, зумовлених нуклеотидними замінами. Вони виходять з того факту, що послідовність основ впливає на ТП області і що конформація фрагмента ДНК обумовлює його рухливість у гелі під дією електричного поля. Принцип методу – електрофорез ДНК у акріламідному гелі фіксованої концентрації з градієнтом концентрації речовин, денатуруючих ДНК, що лінійно зростає до нижньої частини гелю, зазвичай сечовини або формаміду. Електрофорезна камера нагрівається до температури приблизно 60°С. Це трохи нижче за температуру плавлення найбільш легкоплавкої ділянки у фрагменті ДНК. Дволанцюгова молекула ДНК входить у гель і просувається в ньому зі швидкістю, пропорційною її молекулярній масі. Як тільки фрагмент досягає ділянки гелю, в якій температура камери і концентрація денатуруючих речовин створюють умови для плавлення першої, найбільш легкоплавкої області, він наче розгалуджується: одна частина його залишається дволанцюговою, а інша переходить в одноланцюгову форму. Така розгалуджена

структура застряє в порах гелю, внаслідок чого її рухливість знижується.

Зниження електрофоретичної рухливості молекули корелює із співвідношенням довжин денатурованої і дволанцюгової ділянок: чим довше найбільш легкоплавкий домен, тим сильніше знижується рухливість. Ділянка гелю, в якому молекула ДНК починає втрачати швидкість, відповідає найбільш легкоплавким доменам. Якщо концентрації денатуруючих речовин підібрані правильно, то два фрагменти ДНК, що розрізняються лише однією нуклеотидною заміною і мають неоднакові значення ТП, почнуть знижувати швидкість в різних ділянках гелю, і до кінця проходження через нього їх легко буде розділити.

Раніше вважалося, що відокремити фрагменти, які мутували, від фрагмента ДНК дикого типу за рахунок різної міри зниження їх рухливості в ДГГЕ можливо лише у тому випадку, якщо заміни відбулися в області з найнижчим значенням ТП. Проте аналіз великого числа зразків ДНК, а також наступні теоретичні викладення показали, що в більшості випадків метод ДГГЕ дає можливість виявити нуклеотидні заміни в усіх областях плавлення, за винятком самих термостабільних. Заміни в областях з найвищою температурою плавлення зазвичай не виявляються, оскільки після закінчення плавлення останнього домена ДНК повністю денатурує, а це призводить до порушення кореляції між конформацією молекули і швидкістю її просування. Важливо пам’ятати, що успіх при проведенні ДГГЕ з метою розподілу фрагмента, що мутував, і фрагмента ДНК дикого типу визначається структурою фрагмента. Вона має бути розгалудженою, причому мутації повинні припадати на області, які піддалися плавленню.

Для збільшення розподільної здатності методу до досліджуваного фрагмента ДНК «пришивали» послідовність з вищою температурою плавлення ДНК, так званий «GC-зажим». При цьому усі області плавлення фрагмента, включаючи найбільш тугоплавку, ставали доступними для аналізу. Ці досліди проводили з препаратами ДНК, що містить «GC-зажим», клонований у плазмідному векторі. Щоб уникнути стадії клонування, фрагменти з «зажимами» можна отримати за допомогою полімеразній ланцюговій реакції.

Ще одним удосконаленням ДГГЕ слід вважати використання гетеродуплексних фрагментів, утворених ДНК, що мутувала, і ДНК дикого типу. У попередніх дослідах порівнювали рухливість

гомодуплексних фрагментів ДНК мутанта і початкової в паралельних доріжках при ДГГЕ. Робота з отриманими з них гетеродуплексами дозволяє значно підвищити роздільну здатність методу і долю мутацій, що виявляються. Причина полягає в тому, що неспарені ділянки гетеродуплекса, в яких є однонуклеотидні заміни, сильно знижують стекінг-взаємодії основ, дестабілізуючи вторинну структуру, а це, у свою чергу, призводить до зниження температури плавлення фрагмента ДНК – у ряді випадків заміна всього одного нуклеотиду зумовлювала зниження температури на цілих 6°С. Аналіз великого числа гетеродуплексів і теоретичні підрахунки показують, що усі можливі заміни нуклеотидів у легкоплавких доменах, що призводять до утворення неспарених ділянок у фрагменті ДНК, виявляються за допомогою ДГГЕ з вірогідністю 100% за рахунок зміни рухливості. На частку легкоплавких ділянок у фрагментах ДНК від 100 до 1000 п.н. доводиться в середньому більше 50% їх довжини. Отже, використання гетеродуплексів таких фрагментів дозволяє виявити більше половини усіх можливих замін нуклеотидів. У клонованих же фрагментах ДНК із «GC-зажимом» виявляються практично усі заміни нуклеотидів.

Гетеродуплекси дають можливість спостерігати зміну рухливості фрагментів мутантів ДНК у гелі, що не виявляється за стандартних умов проведення електрофорезу. Часто поодинокі мутації можна виявити по значних змінах структури доменів, які відбиваються на характері плавлення ДНК: домени, що мали спочатку найвищу температуру плавлення, можуть стати найбільш легкоплавкими. Таким чином, коли замість гомодуплексів використовуються гетеродуплекси, ДГГЕ дозволяє виявляти заміни нуклеотидів навіть у найбільш тугоплавких доменах.

Практичне використання ДГГЕ. Наведені схеми ДГГЕ забезпечують вищу роздільну здатність і ефективність виявлення мутацій за рахунок використання гетеродуплексів. Досліджувані препарати ДНК відпалюють з міченим одноланцюговим ДНК-зондом, і якщо в них сталася заміна нуклеотиду, гетеродуплекс, що утворився, матиме однонуклеотидну неспарену ділянку. Далі проводять електрофорез у денатуруючому гелі з наступною радіоавтографією, використовуючи як контроль гомодуплекс ДНК дикого типу. Таким чином, у цьому випадку не потрібна стадія блотингу гелю.

Окрім одноланцюгових ДНК-зондів можна використовувати асиметрично мічені дволанцюгові ДНК-зонди, а також мічені

одноланцюгові РНК-зонди для тестування ДНК у гібридах РНК-ДНК або РНК в РНК-РНК-гібридах.

За допомогою ДГГЕ, також як і при РНКазному розщепленні, можна досліджувати фрагменти нуклеїнових кислот завдовжки від 100 до 1000 п.н. Верхня межа значень довжин у деякій мірі визначається необхідністю використовувати поліакріламідний гель. Рухливість у ньому фрагментів ДНК довжиною більше 1000 п.н. різко знижується, а це значно збільшує час, необхідний для їх електрофоретичного розподілу. Ще серйознішою проблемою є характер плавлення довгих фрагментів. Відомо, що чим довше фрагмент, тим більше в ньому доменів плавлення. При проходженні такого фрагменту крізь гель дуже швидко настає різке зниження його рухливості, зумовлене плавленням одночасно великого числа доменів, що робить доступною для виявлення заміни лише незначну частину довгого фрагмента.

Через вищезгадані причини прагнуть працювати з фрагментами, довжина яких не перевищує 1000 п.н. Оскільки для більшості фрагментів ДНК більше половини їх довжини припадає на легкоплавкі домени, то денатуруючий електрофорез фрагменту в 1000 п.н. дозволяє тестувати на нуклеотидні заміни приблизно 500 нуклеотидів. Для підвищення інформативності аналізу можна використовувати ДНК-зонд довжиною 1000-2000 п.н.; відпалювати його з ДНК генома, обробляти відповідними рестриктазами і отримувати при цьому два-три фрагменти оптимального розміру.

Недоліки використання ДГГЕ. РНКазне розщеплення і ДГГЕ можна використовувати для безпосереднього дослідження фрагментів ДНК генома, минуючи стадію клонування. Працюючи з рівномірно міченими зондами, що мають високу питому активність, можна будь-яким з цих методів отримати бажаний результат, маючи спочатку 5-10 мкг ДНК генома людини і проводячи радіоавтографію 24 год. Чим простіше організм, тим вище чутливість методів. Хоча отримувані результати в своїй більшості можна оцінити високо, але безпосереднє використання сумарної ДНК геному ставить перед дослідником ряд проблем:

- по-перше, нерідко низьке відношення сигналу до фону, особливо при РНКазному розщеплюванні;
- по-друге, активність рівномірно мічених фосфором зондів має бути настільки високою, щоб використовувати їх протягом дня або двох;

- по-третє, при проведенні деяких аналізів, особливо у разі множинних тестів, лімітуючим чинником може стати кількість ДНК генома. Будь-який тест тим прийнятніший, чим менша кількість ДНК вимагається.

10.4. Полімеразна ланцюгова реакція

Деякі методи дослідження геному набувають усе більш важливого значення в клінічній практиці. *Полімеразна ланцюгова реакція* (*ПЛР*) – експериментальний метод молекулярної біології, який дозволяє досягти значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) в біологічному матеріалі (пробі).

Окрім *ампліфікації ДНК* (збільшення копій), ПЛР дозволяє здійснювати безліч інших маніпуляцій з нуклеїновими кислотами (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК) і широко використовується в біологічній і медичній практиці, наприклад, для діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), для встановлення батьківства, для клонування генів, виділення нових генів, тощо.

На початку 1970-х років Kjell Kleppe замислився про те, що можна ампліфікувати ДНК за допомогою пари коротких одноланцюгових молекул ДНК – синтетичних праймерів. Проте у той час ця ідея не користувалась попитом. Полімеразна ланцюгова реакція була знову відкрита в 1983 році Kary Banks Mullis (нар. 1944). Його метою було створення методу, який би дозволив ампліфікувати ДНК в ході багатократних послідовних подвоєнь початкової молекули ДНК за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Через 7 років після публікації цієї ідеї, в 1993 р., К.Mullis отримав за неї Нобелівську премію.

На початку використання методу після кожного циклу нагрівання-охолодження доводилося додавати в реакційну суміш ДНК-полімеразу, оскільки вона швидко інактивувалася при високій температурі, необхідній для розподілу ланцюгів спіралі ДНК. Процедура була дуже неефективною, вимагала багато часу і ферменту. У 1986 році метод полімеразної ланцюгової реакції був істотно поліпшений. Було запропоновано використовувати ДНК-полімерази з термофільних бактерій. Ці ферменти виявилися термостабільними і були здатні витримувати безліч циклів реакції. Їх використання дозволило спростити і автоматизувати проведення ПЛР. Одна з перших термостабільних ДНК-полімераз була виділена з бактерій *Thermus aquaticus* і названа *Taq*-полімераза. Недолік цієї полімерази

полягає в тому, що вірогідність внесення помилкового нуклеотиду у неї досить висока, оскільки у цього ферменту відсутні механізми виправлення помилок (3’→5’ екзонуклеазна активність). Полімерази *Pfu* і *Pwo*, виділені з архей, мають такий механізм, їх використання значно зменшує число мутацій в ДНК, але швидкість їх роботи (процесивність) нижча, ніж у *Taq*. Зараз застосовують суміші *Taq* і *Pfu*, щоб досягти одночасно високої швидкості полімеризації і високої точності копіювання.

Полімеразна ланцюгова реакція дозволяє багаторазово відтворювати (ампліфікувати) вибраний фрагмент ДНК без допомоги рестриктаз, векторів або клітини-господаря.

Ідея методу і її втілення дуже прості. Спочатку синтезуються два дезоксиолігонуклеотиди довжиною 20-30 основ, що є кінцевими послідовностями фрагменту ДНК, який вивчають. Полярність обрана так, щоб після відпалу їх напрями (5’→3’) були звернені один до одного. Надмірну кількість цих олігонуклеотидів змішують з ДНК геному, і суміш нагрівають для денатурації останньої. Зниження температури призводить до реасоціації олігонуклеотидів з гомологічними ділянками ДНК генома. У подальшому проводять нарощування ланцюга за участю ДНК-полімерази і дезоксирибонуклеотидтрифосфатів. Така послідовність реакцій денатурації, реасоціації і нарощування ланцюга повторюється 20-30 разів.

Вже після двох циклів серед продуктів реакції з’являються фрагменти ДНК, які точно співпадають за довжиною з початковим фрагментом, обмеженим олігонуклеотидами. Ці фрагменти слугують матрицею для наступних реакцій та ідентичні більшості кінцевих продуктів. Процес є по суті матричним, оскільки продукти цієї реакції слугують матрицею для наступних реакцій. Кількість ДНК, яка знову утворюється, зростає в геометричній прогресії, тому за 20 циклів при 100%-ній ефективності кожного з них можна отримати 220 молекул. На практиці ефективність кожного циклу ампліфікації складає 20-50%, тобто при проведенні достатнього числа циклів можна досягти збільшення кількості специфічної послідовності до мільйону копій.

Оскільки при ампліфікації ДНК генома хребетних як праймери для ПЛР використовують олігонуклеотиди довжиною 20 нуклеотидів і більше, то процес цей досить специфічний і ампліфікується лише один фрагмент ДНК. Проте іноді серед продуктів реакції спостерігається накопичення фрагментів, походження яких важко пояснити. Ці

фрагменти можуть заважати наступному аналізу, тому рекомендується провести ще одну серію ампліфікації, з використанням іншого набору олігонуклеотидних праймерів. Для цього використовують метод, який іменований «*nested oligo*». Його суть полягає в наступному: продукт первинної полімеразної ланцюгової реакції використовується як матриця в наступних раундах ПЛР, але вже з двома іншими олігонуклеотидами, що мають гомологію з ділянками ДНК усередині первинного ампліфікованого фрагмента. Така процедура дозволяє отримати велику кількість індивідуальної послідовності ДНК, дещо коротшої, ніж початковий фрагмент, і використовувати її для наступного аналізу. Маючи початково менше 1 мкг сумарної ДНК генома хребетних, за допомогою ПЛР можна отримати декілька мікрограмів специфічного фрагменту. Добре ампліфікуються фрагменти до 2000 п. н. В одній реакції можливо ампліфікувати одночасно і декілька фрагментів.

Послідовність проведення ПЛР. Кожен цикл ПЛР складається з трьох етапів. На першому етапі необхідно денатурувати ДНК, яка міститься в зразку. Для цього реакційну суміш нагрівають до 92-95ºС, внаслідок чого дволанцюгові молекули ДНК розплітаються з утворенням двох одноланцюгових молекул. На другому етапі відбувається відпал (приєднання праймерів до ДНК-мішені з утворенням коротких дволанцюгових ділянок ДНК, необхідних для ініціації синтезу ДНК). Для забезпечення цього процесу праймери беруться в надлишку по відношенню до матриці. З утвореними комплексами праймер-матриця зв’язується ДНК-полімераза і на третьому етапі відбувається одночасне копіювання ДНК, яке починаєтьсявласне з двох праймерів комплементарних відповідним ділянкам ДНК на протилежних ланцюгах.

Розглянемо кожний з етапів детальніше (рис. 94). На першому етапі дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 94-96°С (чи до 98°С, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) на 0,5-2,0 хв., щоб ланцюги ДНК розійшлися. Ця стадія називається *денатурацією*, оскільки руйнуються водневі зв’язки між двома ланцюгами ДНК. Іноді перед першим циклом (перед додаванням полімерази) проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2-5 хв. для повної денатурації матриці і праймерів. Такий прийом називається *гарячим стартом*, він дозволяє знизити кількість неспецифічних продуктів реакції.

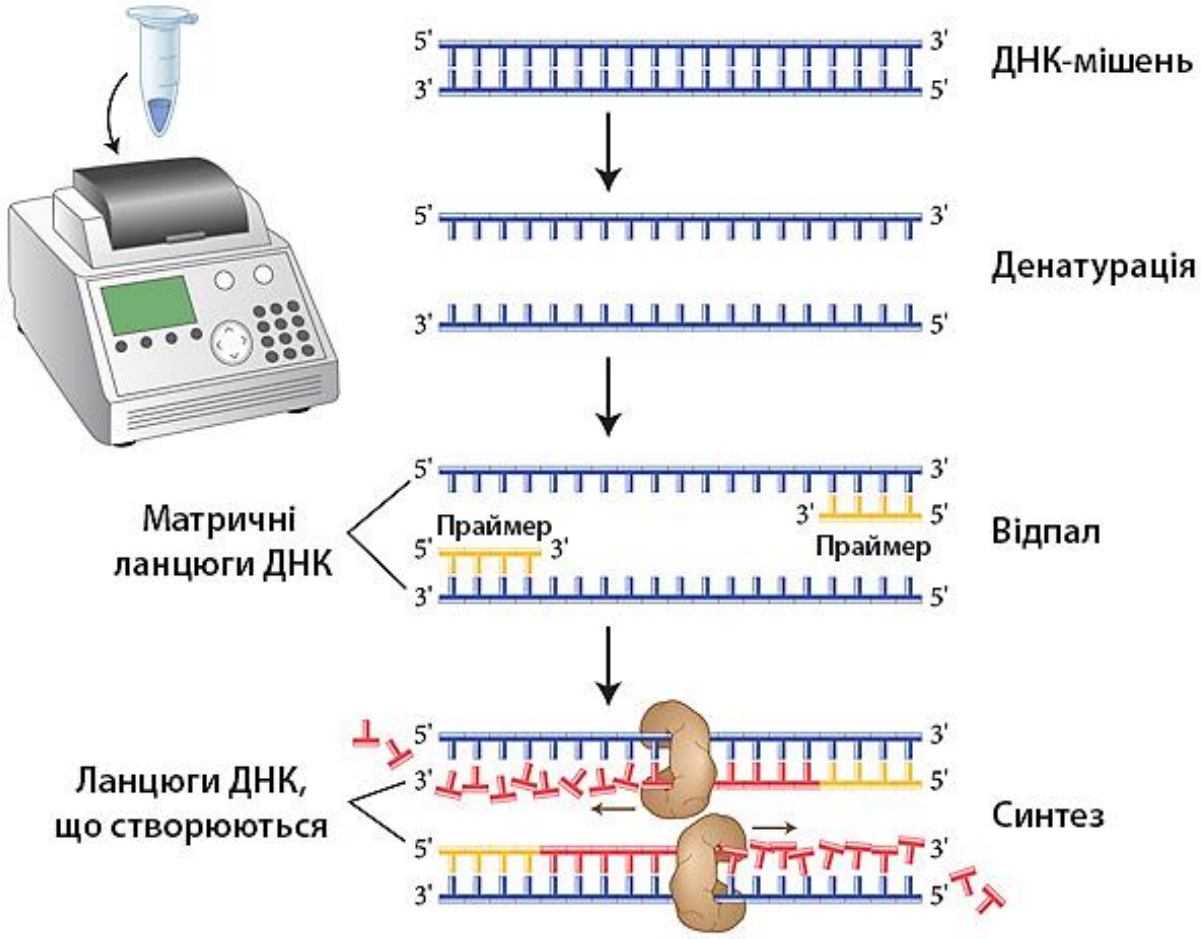


Рис. 94. **Схема першого циклу ПЛР**

Первинна високотемпературна денатурація ДНК геному проводиться протягом 3-10 хв. і залежить від типу матриці. Проте оптимальним часом денатурації вважається 4-5 хв. Вибір часових інтервалів і температурного режиму залежить значною мірою від складу реакційної суміші ПЛР, типу використовуваних пробірок і моделі ампліфікатора та у кожному конкретному випадку може значно відрізнятися від так званих «стандартних умов» – 94˚С 1 хв., 55˚С 1 хв., 72˚С 1 хв. У присутності органічних добавок повна денатурація матриці може бути досягнута вже при температурах нижче 90˚С. При використанні, наприклад, такого термостабільного ферменту, як *Vent* ДНК-полімераза, температуру денатурації можна підвищувати до 97˚С.

Другий етап. Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли зв’язатися з одноланцюговою матрицею. Ця стадія називається *відпалом*, або *ренатурацією*. Температура відпалу залежить від складу праймерів і зазвичай вибирається на 4-5°С нижче за їх температуру плавлення. Час стадії – 0,5-2,0 хв. Неправильний

вибір температури відпалу призводить або до поганого зв'язування праймерів з матрицею (при завищеній температурі), або до зв'язування в невірному місці і появи неспецифічних продуктів (при заниженій температурі).

Час відпалу може складати всього декілька секунд, якщо ампліфікатор налаштований на вимір температури зразка, а не термоблоку. При використанні, наприклад, праймерів, не повністю комплементарних матриці, перші цикли ПЛР проводять за меншою температурою відпалупорівняно з наступними циклами.

З метою оптимізації виходу продукту ПЛР в умовах невизначеності з температурою відпалу праймерів використовують процедуру «скачування», коли температура відпалу зменшується поступово цикл за циклом і сумарна її різниця може складати 15-20°С. Останнім часом з'явилися моделі термоциклерів з градієнтними температурними платами, що дозволяє значно полегшити підбір температури відпалу праймерів.

Третій етап. ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер як затравку. Це – стадія *елонгації*, або *синтезу*. Полімераза починає синтез другого ланцюга від 3'- кінця праймера, який зв'язався з матрицею, і рухається уздовж матриці в напрямку від 3'- до 5'-кінця. Температура елонгації залежить від полімерази. Часто *Taq* і *Pfu* полімерази, які використовуються, найбільш активні при 72°С. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини ампліфікованого фрагмента. Звичайний час елонгації приймають рівним одній хвилині на кожну тисячу пар основ. Після закінчення усіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати усі одноланцюгові фрагменти. Ця стадія триває 7-10 хв.

Дволанцюгові фрагменти ДНК, рівні за довжиною відстані між двома праймерами, починають накопичуватися після третього циклу (рис. 95). Принципово, що синтезовані в ході першого циклу ПЛР ланцюги ДНК слугують матрицями для другого циклу ампліфікації, в якому відбувається утворення певного специфічного фрагменту нуклеїнової кислоти генома вірусу, бактерій або людини. У наступних циклах ампліфікації ампліфікони слугують матрицею для синтезу нових ланцюгів. Таким чином, відбувається накопичення ампліфіконів у реакційному розчині, теоретично в геометричній прогресії за формулою:

$$N_f = N_0(1+Y)\ n, \qquad (1)$$

де n – кількість циклів ампліфікації,

N_0 – початкова кількість копій гена,

N_f – кінцева кількість копій гена,

Y – коефіцієнт ефективності роботи ДНК-полімерази в циклі.

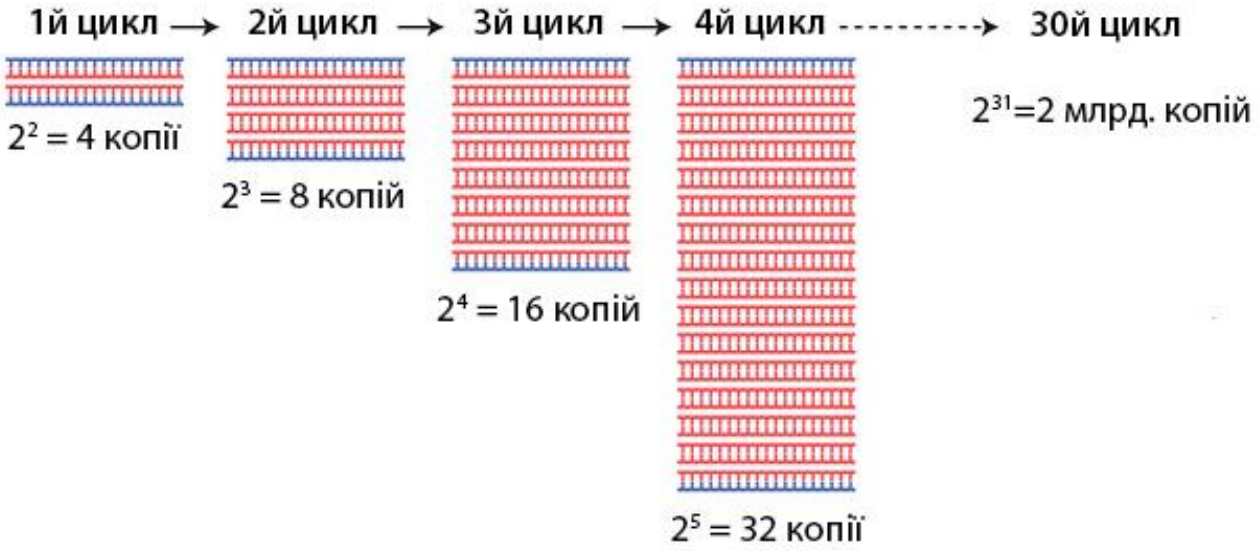


Рис. 95. **Експоненційне зростання кількості копій ДНК з кожним циклом ПЛР**

Зростання необхідного продукту в геометричній прогресії обмежене кількістю реагентів, присутністю інгібіторів, утворенням побічних продуктів. На останніх циклах реакції зростання сповільнюються, що називається «ефектом плато». Час і температура синтезу залежить не лише від активності полімерази, але і від сольового складу реакційного буфера і природи ДНК-матриці.

Для запобігання випаровування реакційної суміші поверх неї нашаровують (окрім ампліфікаторів з кришкою, що нагрівається) мінеральне масло, або спеціальний парафін або віск.

Для вирішення однієї з проблем «*контамінації*» – забруднення ампліфіконами, успішно використовується додавання дезоксиуридинтрифосфату, із застосуванням у наступних ПЛР ферменту урацил-ДНК-глікозилази, який видаляє ураціл з ампліфіконів. Такий підхід робить їх непридатними в якості матриці для роботи ДНК-полімерази. На стадії первинної денатурації урацил-ДНК-глікозилаза інактивується і не заважає проведенню ПЛР.

Специфічність і ефективність синтезу копій нуклеїнових кислот під час ПЛР залежать не лише від якості і властивостей ДНК-полімерази. Величезне значення надається і якості інших компонентів реакційної суміші. Розглянемо основні з них.

Вихідні компоненти ПЛР. Широкомасштабне застосування методу ПЛР у практичній діяльності почалося, коли виробництво забезпечило доступність термостабільних ферментів для споживачів.

Для проведення ПЛР у простому випадку необхідні наступні компоненти:

- термостабільна ДНК-полімераза – фермент, який каталізує реакцію полімеризації ДНК. Полімераза для використання в ПЛР повинна зберігати активність при високій температурі тривалий час, тому використовують ферменти, виділені з термофілів, – *Thermus aquaticus* (*Taq* -полімераза), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-полімераза), *Pyrococcus woesei* (*Pwo*-полімераза), тощо;
- ДНК-матриця, ДНК, яка містить ту ділянку, яку потрібно ампліфікувати;
- два праймери, комплементарні протилежним кінцям різних ланцюгів необхідного фрагменту ДНК;
- дезоксирибонуклеозидтрифосфати (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- іони Mg^{2+}, необхідні для роботи полімерази;
- буферний розчин, який забезпечує необхідні умови реакції, – pH, іонну силу розчину, містить солі, бичачий сироватковий альбумін.

Ферменти ПЛР. Власне як метод ПЛР виникла, коли в описаному вище процесі почали використовувати не просто ДНК-полімеразу, а так звану термостабільну ДНК-полімеразу, тобто фермент, здатний без втрати для своєї активності переносити тимчасовий високотемпературний нагрів реакційної суміші, необхідний для денатурації ДНК. Це дозволило проводити реакцію копіювання ДНК без додавання свіжої порції ферменту після кожного циклу. При проведенні ПЛР найчастіше використовується термостабільна ДНК-полімераза з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*, скорочено звана *Taq*-полімераза, температурний оптимум роботи якої знаходиться в межах 70-72°С.

У переважній більшості випадків ампліфікони довжиною до 4-6 т.п.н. отримують з використанням саме *Taq*-полімерази. Вірогідність неточного включення нуклеотиду при цьому становить 0,01-0,001%. Рівень помилок є критичним моментом у деяких технологіях застосування ПЛР. Необхідність у зменшенні частоти виникнення помилок стимулює пошуки нових (або модифікації за допомогою генної інженерії відомих) термостабільних ДНК-полімераз, які б ампліфікували ДНК з більшою точністю. *Vent* ДНК-полімеразу (а також інші ДНК-полімерази, що відрізняються наявністю так званої

активності, що коригує, наприклад, *Pwo, Pfu, Tgo, Ultma*) застосовують для досягнення точнішого копіювання, а також для отримання продуктів завдовжки близько 10 т.п.н. (як у випадку з *TaqSE* ДНК-полімеразою). Та все ж на сьогодні рівень помилки ДНК-полімераз менше 0,00001% залишається недосяжним. Для секвенування з використанням ПЛР застосовують генно-інженерний варіант *Taq*-полімерази зі значно збільшеною спорідненістю ферменту до дидезоксинуклеозидтрифосфатів. За необхідності клонування ампліконів доцільно застосувати Т4 ДНК-полімеразу з штаму *E.coli*, що несе рекомбінантну плазміду з геном ДНК-полімерази з бактеріофага Т4 і/або фрагмент Кленова для видалення 3'-промоторів або заповнення 3'-«прихованих» кінців ДНК. Для цієї ж мети можна використовувати *Vent* ДНК-полімеразу з *Thermococcus litoralis*. Використання здатності *Vent* ДНК-полімерази розплітати ДНК-дуплекс при температурах вище 55ºС – забезпечує додаткові можливості при проведенні ПЛР.

Для ПЛР РНК-вмісних проб заздалегідь проводять стадію зворотної транскрипції – отримання ДНК, комплементарної РНК-матриці, для чого використовують специфічні праймери до РНК і фермент РНК-залежну ДНК-полімеразу (зворотну транскриптазу, або ревертазу). Для цього використовують іноді властивість *Tth* ДНК-полімерази з *Thermus thermophilus* здійснювати в особливих умовах реакцію зворотної транскрипції, але частіше для синтезу першого ланцюга кДНК застосовують рекомбінантну *M-MuLV* зворотну транскриптазу, у якої відсутня активність РНКази Н, що дає можливість отримувати довші продукти.

ДНК-матриця. Зразок ДНК, який використовується в ПЛР повинен містити щонайменше одну повнорозмірну інтактну копію досліджуваної нуклеотидної послідовності. Більше число цільових копій підвищує вірогідність успішної ампліфікації. Наявність однотяжевих розривів у цільовій ДНК блокує ампліфікацію. Цільова послідовність може бути завдовжки від декількох десятків до декількох десятків тисяч нуклеотидів. Для проведення ПЛР зазвичай використовують 0,1-1,0 мкг ДНК геному ссавців, 10-100 нг, 1-10 нг і 0,1-1,0 нг дріжджової, бактерійної і плазмідної ДНК відповідно. ДНК-матриця, яка містить необхідну послідовність, може вноситися до ПЛР як у денатурованому, так і в нативному стані. Оскільки ефективність ПЛР вище при використанні лінійних молекул ДНК, ампліфікація може бути полегшена обробкою матриці такими ендонуклеазами

рестрикції, які свідомо не гідролізують структуру цільової послідовності. Розчин з ДНК-матрицею, після виділення її з клінічних зразків, не повинен містити домішок ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота) в концентрації більше 1мМ, а так само таких негативно заряджених іонів, як PO_4^{3-}.

Праймери. Специфічність ПЛР заснована на утворенні комплексів комплементу між матрицею і праймерами, короткими синтетичними олігонуклеотидами довжиною 18-30 основ. Кожен з праймерів комплементарний одному з ланцюгів дволанцюгової матриці і обмежовує початок і кінець ампліфікованої ділянки.

Розробка структури олігонуклеотидних праймерів для ПЛР є важливим елементом, як у науково-дослідній роботі, так і при створенні будь-якого діагностичного набору. Необхідно підібрати фрагмент молекули ДНК так, щоб дві його кінцевих ділянки, знаходилися на відстані 300-10000 нуклеотидів одна від одної (для зручної детекції), відрізнялися б за своєю структурою генетичною консервативністю і були присутніми тільки в мікроорганізмах, якими цікавляться, або в досліджуваному гені людини, і відсутні в ДНК інших збудників хвороб або інших генах людини. Виконати цю роботу допомагають спеціальні комп'ютерні програми, що використовують інформацію про нуклеотидну послідовність відомих мікроорганізмів або генів людини.

Місце приєднання комплементарних до ДНК-матриці праймерів не повинне знаходитися усередині стабільної шпилькової структури (яка виникає за наявності протяжних інвертованих повторів) або поряд з нею. На 3'-кінці праймерів краще не залишати підряд більше трьох нуклеотидів G або C. Слід виключити комплементарність 3'-кінців праймерів один одному. За можливістю вміст (G+C) у структурі праймерів вибирають в інтервалі 50-60%, що створює передумови для високої температури відпалу. У порівнянні праймерів між собою різниця в довжині несуттєва за умови, що температура плавлення комплексу праймер-матриця (*Tm*) буде одноковою (різниця не більше 2°C). *Tm* – температура, при якій половина ДНК-матриць утворює комплекс з олігонуклеотидним праймером. Для її визначення досить скористатися наступною формулою:

$$Tm = [2(a + t) + 4(g + c)], °C, \qquad (2)$$

де: *a, t, g, c* – кількість нуклеотидів A, T, G, C відповідно.

Не зважаючи на те, що обчислення за цією формулою дає завищені значення, оскільки формула призначена для коротких (до 20

нуклеотидів) праймерів, можна не використовувати для обчислень складніші формули, оскільки реальна температура відпалу праймерів (Та) нижча на 5-10°С і залежить від багатьох чинників. Сам же синтез праймера відповідно заданій послідовності нуклеотидів не є особливо технічно складним і здійснюється на автоматичних синтезаторах.

Після гібридизації матриці з праймером (відпал), останній слугує затравкою для ДНК-полімерази при синтезі ланцюга комплементарному матриці.

У разі невірного вибору довжини і нуклеотидного складу праймера або температури відпалу можливе утворення частково комплементарних комплексів з іншими ділянками матричної ДНК, що може привести до появи неспецифічних продуктів. Верхня межа температури плавлення обмежена оптимумом температури дії полімерази, активність якої падає при температурах вище 80°С.

При виборі праймерів бажано дотримуватися наступних критеріїв:

- GC-склад ~ 40-60 %;
- близькі *Tm* праймерів (відмінності не більші, ніж на 5°С);
- відсутність неспецифічних вторинних структур – шпильок і димерів;
- бажано, щоб на 5’-кінці був гуанін або цітозін, оскільки вони утворюють три водневі зв’язки з молекулою матриці, що робить гібридизацію стабільнішою.

Дезоксирибонуклеозидтрифосфати. У стандартній ПЛР як «будівельний матеріал» для синтезу ланцюгів комплементу використовують дезоксиаденозинтрифосфат, дезоксигуанозин-трифосфат, дезоксицитозинтрифосфат і дезокситимідинтрифосфат. Водні розчини цих дНТФ (рН 7-8) зберігають у замороженому стані при -20°С. Робочі розчини дНТФ готують в концентрації 0,5-1,0 мМ шляхом розрідження стерильною бідистильованою або деіонізованою водою. Залежно від обраного ферменту в ПЛР використовують різні концентрації дНТФ, що безпосередньо пов’язані з кінетичними параметрами полімераз. Наприклад, для роботи *Vent* ДНК-полімерази необхідно 0,2 мМ концентрації кожного з чотирьох дНТФ, тим часом для ефективної роботи *Taq* ДНК-полімерази достатньо 50 мкМ кожного дНТФ (теоретично 100 мкл 20%-вої реакційної суміші забезпечує синтез 1,3 мкг ДНК, що відповідає 5 пМ ампліфікону завдовжки 400 п.н.). Інтервал концентрацій 20-200 мкМ вибирають для встановлення оптимального балансу між ефективністю, специфічністю і точністю роботи ДНК-полімераз. Надлишок дНТФ

може призводити до зниження специфічності і ефективності, особливо при невідповідній концентрації Mg^{2+}. У нестандартних ПЛР можуть використовуватися з різною ефективністю модифіковані, у тому числі флуоресцентно-мічені субстрати.

Іони двовалентних металів. Іони Mg^{2+} є необхідним кофактором для ДНК-полімерази в ПЛР. Багато компонентів реакційної суміші зв'язують ці іони, у тому числі ДНК-матриця, праймери, ампліфікони і дНТФ. Тому, щоб визначити і створити оптимальний надлишок незв'язаного іона у рамках 0,5-2,5 мМ, здійснюють оптимізацію для вибраних концентрацій ДНК-матриці, праймера, дНТФ і ДНК-полімерази шляхом зміни концентрації іонів в інтервалі 1-4 мМ (у спеціальних випадках до 10 мМ) з кроком 0,2-0,5 мМ. У стандартній ПЛР використовуються концентрації в межах 1,5-2,0 мМ Mg^{2+}. Залежно від типу реакційного буфера, що використовують, іони вносять у вигляді хлориду, сульфату або ацетату. Іони Mn^{2+} призводять до зниження точності копіювання і тому додаються при проведенні сайт-спрямованого мутагенезу.

Реакційний буфер. У стандартній ПЛР використовуються сольові буфери на основі 10-70 мМ Тріс-HCl pH 8-9 (20°C). Внаслідок значної залежності pH цього буфера від температури: pKa /10°C – 0,31, у протоколах для отримання продуктів завдовжки більше 10 т.п.н. використовують ТРІЦІН-КІН буфер pH 9,2.

Активатори ПЛР. Солі хлориду калію в концентрації 10-50 мМ і/або сульфату амонію в концентрації 10-20 мМ додають для поліпшення відпалу праймера. Сироватковий альбумін бугайців або желатин у концентрації 0,01-0,1% (вага/об'єм), а також неіонні детергенти Triton X100, Nonidet NP40 і Tween 20 у концентрації 0,05-0,1 % (об'єм /об'єм) є стабілізаторами ферменту.

Диметилсульфоксид у концентрації 1-10% (об'єм /об'єм), 5%-вий (об'єм /об'єм) ацетамід і гліцерин у концентрації 5-20% (об'єм /об'єм) можуть в деяких випадках покращувати специфічність. Гліцерин сприяє підвищенню термостабільності *Taq* ДНК-полімерази. Формамід у концентрації 1-10% (об'єм /об'єм) корисний при копіюванні G/C багатих матриць.

Інгібітори. ПЛР може послаблюватись домішками нуклеаз і протеаз; фенолом і хлороформом; поліцукридами, особливо гепарином; лідируючими барвниками (креазоловим червоним, бромфеноловим синім, ксіленціанолом); додецилсульфатом натрію і етилендиамінтетраоцтовою кислотою, а також іонами важких металів.

Ампліфікатори. ПЛР проводять в ампліфікаторі – приладі, що забезпечує періодичне охолодження і нагрівання пробірок, зазвичай з точністю не менше 0,1°С. Сучасні ампліфікатори (рис. 96) дозволяють задавати складні програми, у тому числі з можливістю «гарячого старту», Touchdown ПЛР (див. нижче) і наступного зберігання ампліфікованих молекул при 4°С. Для ПЛР у реальному часі випускають прилади, обладнані флуоресцентним детектором. Існують також прилади з автоматичною кришкою і відділенням для мікропланшет, що дозволяє вбудовувати їх в автоматизовані системи.

Рис. 96. **Типи амліфікаторів**

Різновиди ПЛР:

1) «Вкладена» ПЛР (англ. *Nested PCR*) – застосовується для зменшення числа побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК всередині продукту першої реакції.

2) «Інвертована» ПЛР (англ. *Inverse PCR*) – використовується у тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка усередині необхідної послідовності. Цей метод особливо корисний, коли треба визначити сусідні послідовності після вставки ДНК у геном. Для здійснення інвертованої ПЛР проводять ряд розрізань ДНК рестриктазами з наступним з'єднанням фрагментів (лігування). У результаті відомі фрагменти виявляються на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити ПЛР як завжди.
3) ПЛР «зі зворотною транскрипцією» (англ. *Reverse Transcription PCR, RT-PCR*) – використовується для ампліфікації, виділення або ідентифікації відомої послідовності з бібліотеки РНК. Перед звичайною ПЛР проводять синтез одноланцюгової молекули ДНК на матриці мРНК за допомогою ревертази і отримують одноланцюгову кДНК, яка використовується як матриця для ПЛР. Цим методом часто визначають де і коли експресуються ці гени.
4) «Асиметрична» ПЛР (англ. *Asymmetric PCR*) – проводиться тоді, коли необхідно ампліфікувати переважно один з ланцюгів початкової ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридізаційного аналізу. ПЛР проводиться як завжди, за винятком того, що один з праймерів береться у великому надлишку.
5) «Кількісна» ПЛР (англ. *Quantitative PCR, Q-PCR*) – використовується для швидкого виміру кількості певної ДНК, кДНК або РНК у пробі. Для кількісної ПЛР у реальному часі використовують флуоресцентні мічені реагенти для точного виміру кількості продукту реакції у міру його накопичення.
6) «Сходинкова» ПЛР (англ. *Touchdown PCR*) – за допомогою цього методу зменшують вплив неспецифічного зв'язування праймерів на утворення продукту. Перші цикли проводять при температурі вище за температуру відпалу, потім кожні декілька циклів температуру знижують. При певній температурі система пройде крізь смугу оптимальної специфічності праймерів до ДНК.
7) «Метод молекулярних колоній», або ПЛР в гелі (англ. *Colony-PCR*) – акриламідний гель полімеризується з усіма компонентами ПЛР на поверхні після чого проводять ПЛР. На ділянках гелю, які містять аналізовану ДНК, відбувається ампліфікація з утворенням молекулярних колоній.
8) «ПЛР в режимі реального часу» дозволяє отримувати дані про кінетику ПЛР. Для цього використовується ампліфікатор,

забезпечений флуориметром. Синтезується олігонуклеотид, комплементарний послідовності цільової ДНК, на 5’-кінці якого знаходиться нуклеотид, що несе флуоресцентну групу, а з’єднання, яке гасить флуоресценцію, розташовано на блокованому 3’-кінці, що робить його нездатним виконувати роль праймера. Коли *Taq* ДНК-полімераза за рахунок своєї внутрішньої 5’→3’ екзонуклеазної активності вивільняє 5’-кінцевий нуклеотид, флуоресценція не гаситься і детектується флуориметром. З використанням кінетичних даних обчислюється (за допомогою відповідного програмного забезпечення) початкова концентрація цільової ДНК в аналізованій пробі (що може використовуватися для визначення інфекційного агента) і отримують кількісні характеристики експресії генів.

9) «ПЛР довгих фрагментів» (англ. *Long-range PCR*) – модифікація ПЛР для ампліфікації протяжних ділянок ДНК (10 тисяч основ і більше). Використовують дві полімерази, одна з яких – *Taq*-полімераза з високою процесивністю (тобто, здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга – ДНК-полімераза з 3’-5’ екзонуклеазною активністю. Друга полімераза необхідна для того, щоб коригувати помилки, внесені першою.
10) «Випадкова ампліфікація поліморфної ДНК» (англ. *Random Amplification of Polymorphic DNA PCR, RAPD PCR*) – використовується тоді, коли треба розрізнити близькі за генетичною послідовністю організми, наприклад, різні сорти культурних рослин, породи собак або близькоспоріднені мікроорганізми. У цьому методі зазвичай використовують один праймер невеликого розміру (20-25 п.н.). Цей праймер буде частково комплементарний випадковим ділянкам ДНК досліджуваних організмів. Підбираючи умови (довжину праймера, його склад, температуру і ін.), вдається досягти задовільної відмінності картини ПЛР для двох організмів.
11) ПЛР з використанням «гарячого старту» (англ. *Hot-start PCR*) – модифікація ПЛР з використанням парафіну для розподілу на верхню (містить буферний розчин, полімеразу, матрицю і, якщо необхідно, деіонізовану воду) і нижню (містить деіонізовану воду, праймери і дезоксирибонуклеотиди) фракції з метою недопущення раннього змішування компонентів реакції. До початку реакції ампліфікатор необхідно прогріти до температури плавлення парафіну (60-80°С).

Якщо нуклеотидна послідовність матриці відома частково або невідома зовсім, можна використовувати вироджені праймери, послідовність яких містить вироджені позиції, в яких можуть розташовуватися будь-які основи. Наприклад, послідовність праймера може бути такою: …АТН..., де Н – це А, Т або С.

Використання ПЛР. ПЛР застосовується в багатьох галузях/напрямах для проведення аналізів і в наукових експериментах. Полімеразна ланцюгова реакція нині є найбільш досконалим діагностичним методом молекулярної біології, молекулярної генетики і клінічної лабораторної діагностики, що дозволяє виявляти в тканинах і біологічних рідинах організму поодинокі клітини збудників багатьох інфекційних захворювань, виявляти і ідентифікувати навіть однонуклеотидні зміни в структурі генів.

Таким чином, основною перевагою методу ПЛР є надзвичайно висока чутливість цього молекулярно-біологічного дослідження. Використані в медичній практиці тест-системи, засновані на принципі ампліфікації ДНК, дозволяють сьогодні виявляти патогенні для людини бактерії і віруси навіть в тих випадках, коли іншими способами (імунологічним, бактеріологічним) їх виявлення неможливе (внаслідок різниці в чутливості в 1-2 порядки). Можливості, закладені в методі ПЛР, дозволяють, з одного боку, досягати максимальної специфічності аналізу, тобто здібності виявляти ДНК конкретного інфекційного агента у присутності ДНК інших мікроорганізмів і ДНК організму-господаря, а також проводити генотипування. З іншого боку, відповідний вибір олігонуклеотидних праймерів, що в основному визначають специфічність аналізу, дозволяє одночасно виявляти ДНК близькоспоріднених мікроорганізмів.

Іншою перевагою методу є те, що для ПЛР-діагностики практично усіх інфекційних захворювань, а також спадкових захворювань людини, може бути використаний один набір устаткування, універсальні процедури пробо-підготовки і постановки аналізу, а також однотипні (що відрізняються в основному структурою праймерів) набори реактивів. Для проведення ПЛР-аналізу не потрібно проведення культуральних і мікробіологічних процедур, на що раніше витрачали багато часу. Уніфікований метод обробки біоматеріалу і детекції продуктів реакції, і автоматизація процесу ампліфікації дають можливість провести повне дослідження протягом 4,0-4,5 годин. Особливо ефективний метод ПЛР для діагностики важко-

культивованих, некультивованих і персистуючих форм мікроорганізмів, з якими часто доводиться стикатися при латентних і хронічних інфекціях, оскільки цей метод дозволяє уникнути складнощів, пов'язаних з вирощуванням таких мікроорганізмів у лабораторних умовах. Застосування ПЛР-діагностики також украй ефективно відносно збудників з високою антигенною мінливістю і внутрішньоклітинних паразитів. Слід зазначити, що методом ПЛР можливе виявлення збудників не лише в клінічному матеріалі, отриманому від хворого, але і в матеріалі, що отримується з об'єктів зовнішнього середовища (вода, ґрунт), і в продуктах харчування.

Висока чутливість і специфічність, безпосереднє виявлення інфекційного агента і можливість проведення генотипування будь-якого гена людини визначають широку сферу застосування методу ПЛР в клінічній діагностиці і медичній практиці.

Аналіз довжини рестрикційних фрагментів. Рестриктази розщеплюють ДНК у специфічних ділянках, зазвичай в паліндромних послідовностях. Коли одна з основ у такій послідовності змінюється в результаті мутації, ця ділянка перестає розщеплюватися рестриктазами. У той же час мутації можуть призводити до утворення нових ділянок, чутливих до рестриктаз. У результаті відповідні фрагменти ДНК, отриманої від двох генетично не ідентичних індивідів, часто утворюють рестрикційні фрагменти різної довжини. Це явище носить назву поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК (ПДРФ, англ. *Restriction Fragment Length Polimorphism, RFLP*).

Передусім, ДНК-фрагмент, що містить досліджувану послідовність, ампліфікують за допомогою ПЛР. Потім ампліфікований фрагмент гідролізують відповідними рестриктазами. Фрагменти розділяють гель-електрофорезом, фрагмент, що цікавить, виявляють за допомогою специфічного генного зонду. На рисунку 97 приведено результати застосування методу в криміналістиці та генодиагностиці. Рестрикційна карта зразка ДНК, виділеної з тканини, знайденої на місці злочину (зразок 1), не співпадає з пробою, взятою у підозрюваного (зразок 2). Для отримання такого «генетичного відбитку» достатньо дуже малої кількості матеріалу, що містить ДНК. Другим важливим практичним додатком ПДРФ-аналізу є виявлення генетичних мутацій, що ведуть до спадкових захворювань.

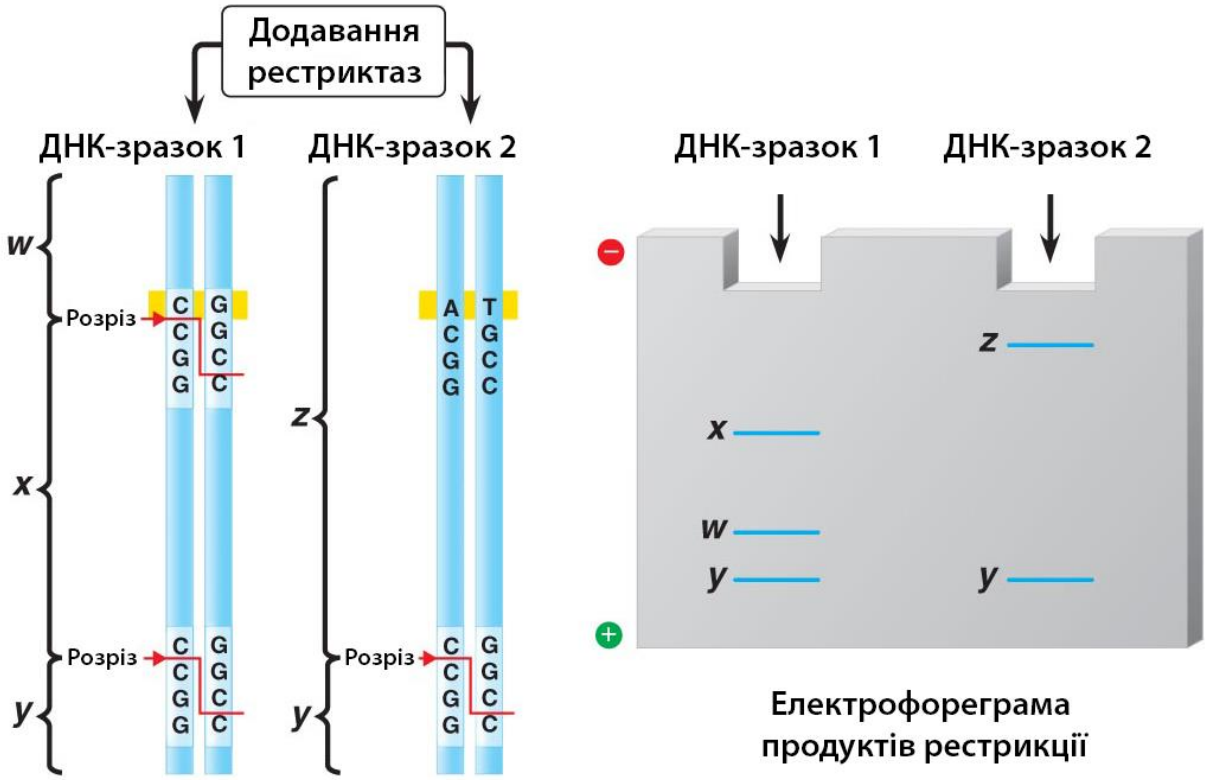


Рис. 97. **Принципова схема методу ПДРФ**

Надекспресія білків. Для лікування тих або інших захворювань необхідні білки, наприклад білкові гормони, які у тварин є присутніми в малих кількостях і тому важкодоступні. Нині такі білки можна отримувати у великих кількостях за допомогою надекспресії в бактерійних або еукаріотичних клітинах. Для цього необхідно виділити відповідний ген з ДНК людини і клонувати його у складі плазміди. Окрім цього гена плазміда повинна містити послідовність ДНК, яка робить можливою реплікацію і транскрипцію плазмідної ДНК в клітині-господаря. Як тільки відповідні клітини трансформовані плазмідою і відбудеться реплікація, транскрипція гена ініціюється шляхом індукції. Трансляція мРНК, що утворилася в клітині-господарі дозволяє виробляти необхідний білок у достатній кількості.

Криміналістика. ПЛР використовують для порівняння так званих «генетичних відбитків пальців». Необхідно зразок генетичного матеріалу з місця злочину (події) – кров, слина, сперма, волосся, тощо, порівняти з генетичним матеріалом підозрюваного. Достатньо зовсім малої кількості ДНК, теоретично – однієї копії. ДНК розщеплюють на фрагменти, потім ампліфікують за допомогою ПЛР. Фрагменти розділяють за допомогою електрофорезу ДНК. Отриману картину

розташування смуг ДНК і називають генетичним відбитком пальців (англ. *genetic fingerprint*).

Встановлення батьківства. Хоча «генетичні відбитки пальців» унікальні (за винятком випадку однояйцевих (конкордантних) близнюків), родинні зв'язки все ж можна встановити, зробивши декілька таких відбитків. Той же метод можна застосувати, дещо модифікувавши його, для встановлення еволюційної спорідненості серед організмів.

Медична діагностика. ПЛР дає можливість істотно прискорити і полегшити діагностику спадкових і вірусних захворювань. Певний ген ампліфікують за допомогою ПЛР з використанням відповідних праймерів, а потім секвенують для визначення мутацій. Вірусні інфекції можна виявляти відразу після ураження, за тижні або місяці до того, як проявляться симптоми захворювання.

Медицина, що персоналізується. Іноді ліки виявляються токсичними або алергенними для деяких пацієнтів. Причини цього – частково в індивідуальних відмінностях у сприйнятті і метаболізмі ліків та їх похідних. Ці відмінності детермінуються на генетичному рівні. Наприклад, у одного пацієнта певний цитохром (білок печінки, що відповідає за метаболізм сторонніх речовин) може бути активніший, у іншого – менш. Для того, щоб визначити, який різновид цитохрому має цей пацієнт, запропоновано проводити ПЛР-аналіз перед застосуванням ліків. Такий аналіз називають попередніми генотипуванням (англ. *prospective genotyping*).

Клонування генів. Клонування генів (не плутати з клонуванням організмів) – це процес виділення генів і, в результаті генно-інженерних маніпуляцій, отримання великої кількості продукту цього гена. ПЛР використовується для того, щоб ампліфікувати ген, який потім вставляється у вектор – фрагмент ДНК, що переносить сторонній ген у той же самий або інший, зручний для вирощування, організм. У якості векторів використовують, наприклад, плазміди або вірусну ДНК. Вставку генів у сторонній організм зазвичай використовують для отримання продукту цього гена – РНК або, найчастіше, білка. Таким чином у промислових кількостях отримують багато білків для використання в сільському господарстві, медицині, тощо.

Секвенування ДНК. У методі секвенування з використанням мічених флуоресцентною міткою або радіоактивним ізотопом дидезоксинуклеотидів ПЛР є невід'ємною частиною, оскільки саме в ході полімеризації в ланцюг ДНК вбудовуються похідні нуклеотидів,

мічені флуоресцентною або радіоактивною міткою. Це зупиняє реакцію, дозволяючи визначити положення специфічних нуклеотидів після розподілу синтезованих ланцюгів у гелі.

Мутагенез. Нині ПЛР стала основним методом проведення мутагенезу (внесення змін до нуклеотидної послідовності ДНК). Використання ПЛР дозволило спростити і прискорити процедуру проведення мутагенезу, а також зробити її надійнішою і відтворною.

10.5. Секвенування ДНК

В умовах практичного використання генетичної інженерії важливо швидко *секвенувати* (тобто визначити послідовність нуклеотидів) будь-якого фрагменту ДНК. При існуючому величезному обсязі інформації про послідовності ДНК, для аналізу даних про геноми необхідні нові технології та комп'ютерна техніка.

У біотехнології рекомбінантних ДНК зазвичай використовують два різних методи секвенування ДНК:

- хімічний;
- ферментативний.

Обидва методи надзвичайно надійні, швидкі у виконанні і результативні. Результати секвенування дозволяють на основі генетичного коду визначити амінокислотну послідовність білка відповідно до нуклеотидної послідовності певного гена. На рис. 98 представлена схема *хімічного методу секвенування ДНК*.

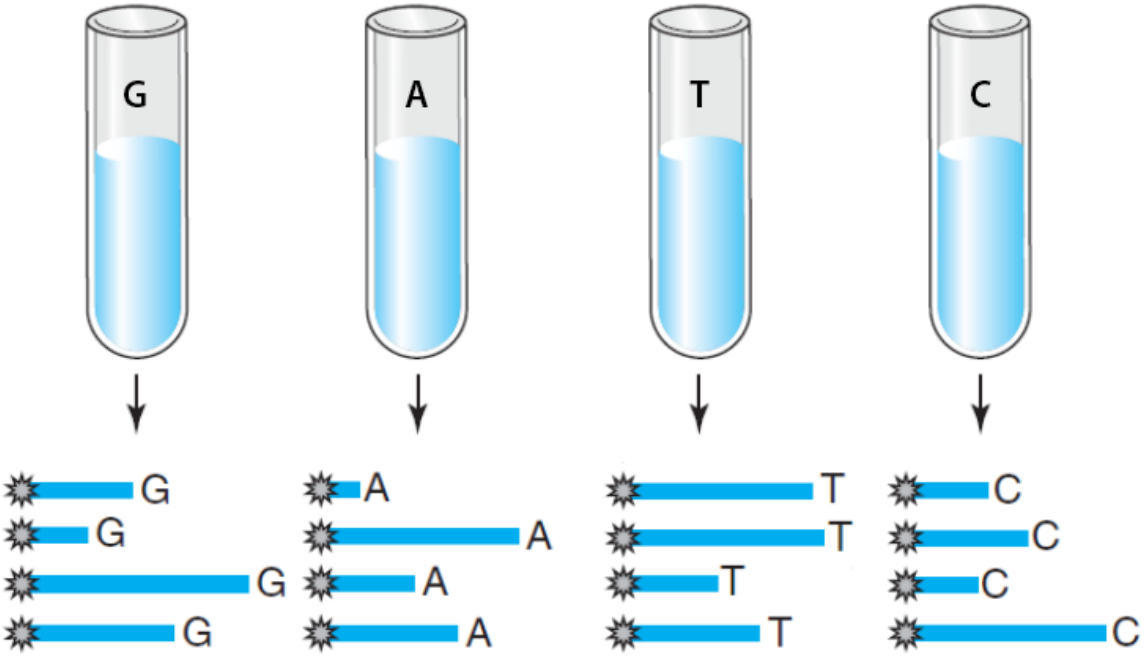


Рис. 98. **Схема отримання сімейства мічених фрагментів ДНК**

Вихідний фрагмент ДНК, мічений ^{32}P на 5’-кінці, піддається специфічному розщепленню за певним нуклеотидом (наприклад, А), в результаті чого утворюються фрагменти різної довжини.

Зазвичай хімічна процедура розщеплення ДНК виконується одночасно для чотирьох однакових проб ДНК з використанням хімічних реагентів, що розщеплюють ДНК по окремих нуклеотидах (Т, С, G і А). Отримані зразки піддають електрофорезу на паралельних доріжках одного гелю і за його результатами визначають нуклеотидну послідовність ДНК.

Першим методом прямого *ферментативного секвенування ДНК* став метод, запропонований Frederick Sanger (нар. 1918) і Alan R. Coulson у 1975 р. У якості матриці в реакції полімеразного копіювання використовувався одноланцюговий фрагмент ДНК, у якості праймерів – синтетичні олігонуклеотиди або природні субфрагменти, що отримані при гідролізі рестрикційнимі ендонуклеазами, а в якості ферменту – фрагмент Кленова ДНК полімерази I (PolI) з *E.coli*. Метод включав два етапи. Спочатку в обмежених умовах проводили полімеразну реакцію в присутності всіх чотирьох типів dNTP (один з них був мічений по альфа-положенню фосфату), отримуючи на виході набір продуктів неповного копіювання матричного фрагмента. Суміш очищали від дезоксинуклеозидтрифосфатів, які не зв’язалися, і розподіляли на вісім частин. Після чого в «плюс» системі проводили чотири реакції у присутності кожного з чотирьох типів нуклеотидів, а в «мінус» системі – у відсутність кожного з них. У результаті, в «мінус» системі термінация (зупинка) відбувалася перед dNTP даного типу, а в «плюс» системі – після нього. Отримані таким чином вісім зразків розподіляли за допомогою електрофорезу, «зчитували» сигнал і визначали послідовність початкової ДНК. Цим способом була секвенована коротка ДНК фага *фХ*174, що складається з 5386 нуклеотидних пар.

У 1977 р. автори «плюс-мінус» методу запропонував ще один спосіб ферментативного секвенування, що отримав назву *методу термінуючих аналогів трифосфатів*. Більш потужний і більш технологічний, цей дещо модифікований спосіб, застосовується і сьогодні. В основі методу теж лежало ферментативне копіювання за допомогою фрагмента Кленова ДНК полімерази I з *E.coli*. У якості праймерів використовували синтетичні олігонуклеотиди. Специфічну термінацію синтезу забезпечували додаванням у реакційну суміш крім чотирьох типів dNTP (один з яких був радіоактивно мічений в альфа

положенні фосфату) ще один з чотирьох варіантів 2’, 3’-дидезоксинуклеозидтрифосфатів (ddATP, ddTTP, ddCTP або ddGTP), який здатний включатися в ланцюг ДНК, що синтезується, але не здатний забезпечувати подальше копіювання через відсутність 3’-ОН групи (рис. 99).

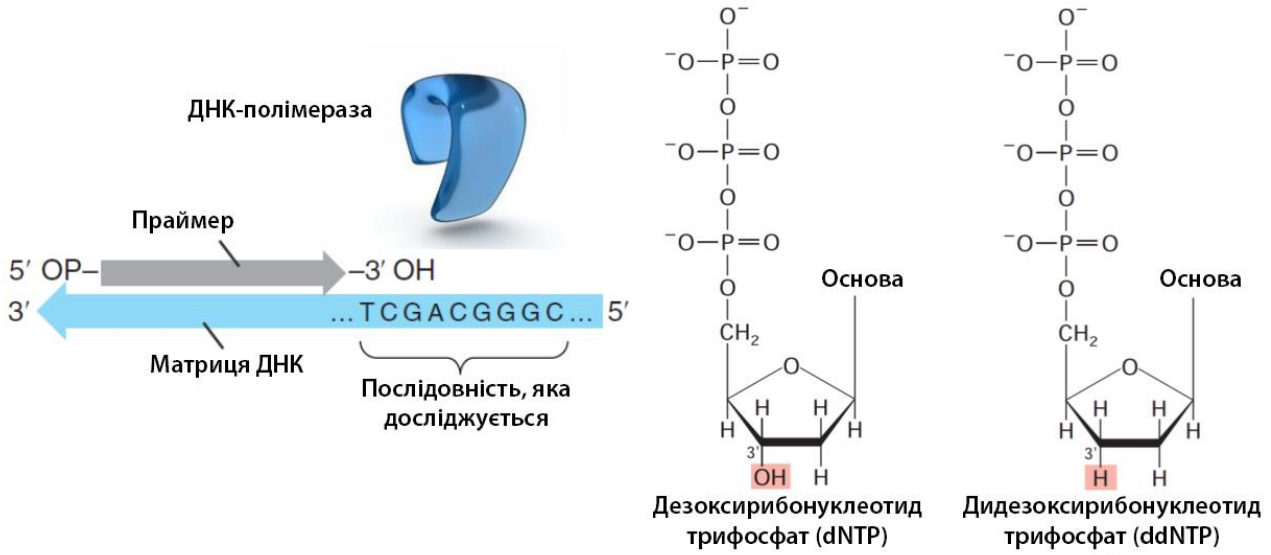


Рис. 99. **Компоненти ферментативного методу секвенування**

Співвідношення концентрацій dNTP/ddNTP автори підбирали експериментально, так, щоб у результаті отримати набір копій ДНК різної довжини. Таким чином, для визначення первинної структури досліджуваного фрагмента ДНК було необхідно провести чотири реакції копіювання: по одному типу термінаторів в кожній з реакцій. Після цього отримані продукти розганялися в поліакриламідному гелі на сусідніх доріжках і по розташуванню смуг визначалася послідовність нуклеотидів (рис. 100).

В основі *автоматичного секвенування* лежить вже згадуваний вище метод ферментативного секвенування з використанням терминуючого ddNTP. Як і класичний варіант F.Sanger, автоматичне секвенування включає дві стадії: проведення термінючих реакцій і розподіл продуктів цих реакцій за допомогою електрофорезу. Як правило, автоматизована лише друга стадія, тобто розподіл мічених фрагментів ДНК в ПААГ (поліакріламідний гель), отримання спектру емісії флуорофорів і подальше обрахування зібраних даних. Таким чином, автоматичне секвенування ідеологічно відрізняється від звичайного ручного секвенування тільки типом використовуваної мітки.

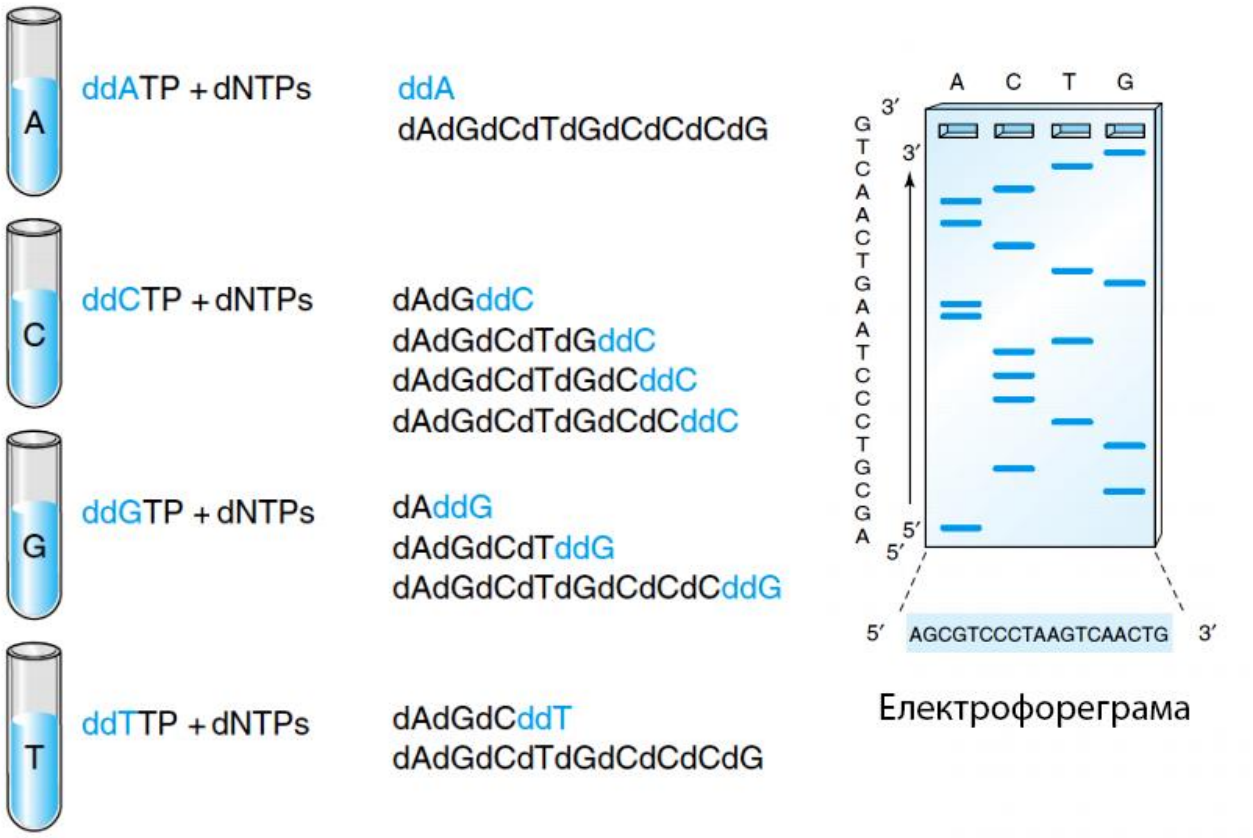


Рис. 100. **Схема ферментативного секвенування за F.Sanger**

Флуоресцентну мітку включають або в праймер, або в термінатор реплікації згідно з такими схемами: мічений праймер (чотири різних барвника) і немічені термінатори; мічені термінатори (кожен тип термінатора своїм барвником) і немічений праймер (рис. 101).

Використання мічених праймерів передбачає проведення чотирьох незалежних реакцій (окремо з кожним термінатором) для кожного зразка, що секвенується.

Використання мічених термінаторів дозволяє поєднати всі чотири реакції в одній пробірці. Якщо використовується єдиний барвник, то розподіл продуктів реакції секвенування в гелі проводять на чотирьох різних доріжках. Використання чотирьох різних фарб дозволяє розганяти продукти реакцій на одній доріжці.

Останні 20 років домінує автоматизоване секвенування за методом F.Sanger. Цей метод був використаний в глобальних проектах з секвенування генома людини, різних тварин, бактерій і вірусів. Однак, даний метод виявився не придатним для швидкого рутинного секвенування людських геномів у клінічних цілях. Тому з'явилась необхідність у винаході нових технологій *повногеномного секвенування*. Автоматизоване секвенування за F.Sanger вважається «методом першого покоління», проте як сучасні методи називаються

«методами нового, або другого, покоління» (*Next-Generation Sequencing, NGS*). В основі цих технологій лежать різні стратегії, засновані на унікальних комбінаціях приготування ДНК-матриць, секвенування, візуалізації, а також вирівнювання та складання послідовностей (*sequences* або «сіквенсів») ДНК.

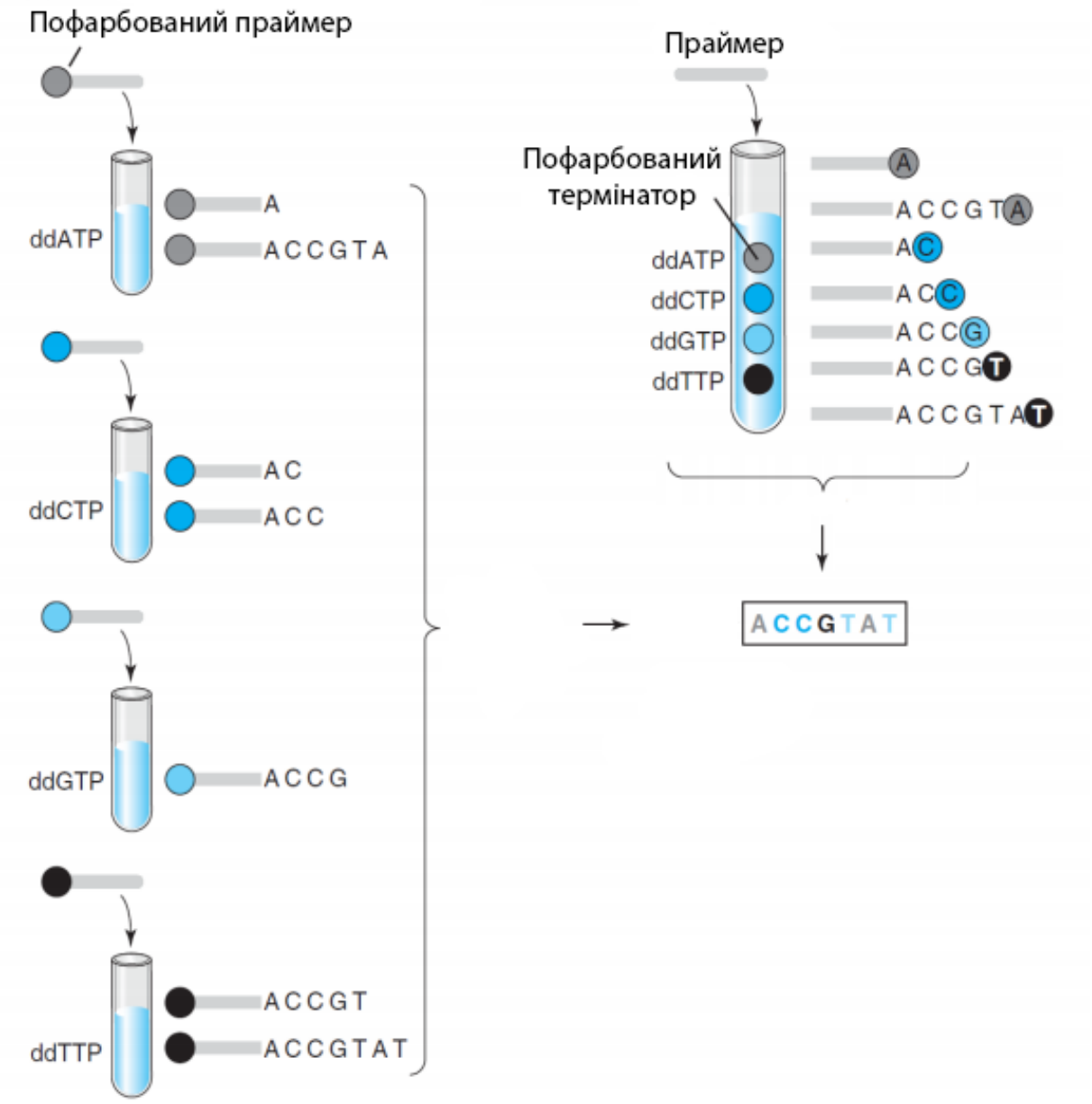


Рис. 101. **Схема використання мічених праймерів (ліворуч) та мічених термінаторів (праворуч) при автоматичному секвенуванні ДНК**

Основною перевагою секвенування нового покоління є рентабельність продукції величезного масиву даних за короткий час. Індивідуальне геномне секвенування – це швидкозростаюча область технології та медицини. Як очікується, істотний прогрес останніх років

у секвенуванні незабаром може призвести до зменшення вартості секвенування до 1000 доларів на індивідуальний геном. У додаванні до персонального повногеномного секвенування, досягнення у вивченні однонуклеотидних поліморфізмів (*single-nucleotide polymorphism, SNP*) дозволили генотипувати більшість варіацій в індивідуальних геномах.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ:

1. З яких етапів складається метод РНКазного розщеплення при визначенні нуклеотидних замін у фрагментах ДНК геному?
2. В чому полягає принцип методу денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (ДГГЕ)?
3. З яких етапів складається полімеразна ланцюгова реакція?
4. Які процеси відбуваються на першому етапі ПЛР?
5. У чому полягають особливості проведення відпалу під час здійснення ПЛР?
6. Чому для здійснення ПЛР необхідно використовувати термостабільну ДНК-полімеразу?
7. Які вимоги надаються до праймерів при здійсненні ПЛР?
8. Які додаткові компоненти необхідні для здійснення ПЛР?
9. Які існують різновиди ПЛР?
10. Вкажіть особливості аналізу ПДРФ?
11. В чому полягає принцип генотипування за допомогою ПЛР?
12. Вкажіть напрями використання ПЛР в генної інженерії?
13. На чому заснований метод хімічного секвенування ДНК?
14. Охарактеризуйте механізм ферментативного секвенування?
15. Зазначте особливості автоматичного секвенування.

Іменний покажчик:

Г
Гамов Георгій Антонович 129

К
Кольцов Николай Константинович 10

A
Avery Oswald Theodore 12

B
Berg Paul Naim 215
Britten Roy John 44

C
Chargaff Erwin 15
Chase Martha Cowles 10
Coulson Alan 265
Crick Francis Harry Compton 17

D
Davidson Eric H. 44
Dulbecco Renato 192

F
Franklin Rosalind Elsie 17

H
Hart Craig M. 53
Hershey Alfred Day 10

J
Jacob François 168

K
Kellner Albert 192
Kleppe Kjell 246

L
Laemmli Ulrich K. 53

M
MacLeod Colin Munro 12
McCarty Maclyn 13
Meselson Matthew Stanley 19
Miescher Johan Friedrich 10
Monod Jacques Lucien 168
Mullis Kary Banks 246

S
Sanger Frederick 265, 266
Stahl Franklin William 19

W
Watson James Dewey 17
Wilkins Maurice Hugh Frederick 17
Woese Carl Richard 35

Термінологічний покажчик:

А

Аденін 15, 100, 129
Азотисті основи 15, 100, 186
- пуринові 15
- піримідинові 15
Ампліфікації ДНК 246
Антикодон 7, 103
Антикодонова петля 103
Археї 38
Атенюатор 93

Б

Бібліотека геномна (банк генів) 222
Бібліотека кДНК (клонотека) 210, 223
Білки (пептиди, поліпептиди) 6, 141
- високої рухливості (HMG) 53
- гістонові 49
- гістоноподібні 37
- інгібітори синтезу 182
- негістонові 53
Білковий домен 232

В

Вектор 205, 218, 263
- BAC 221
- YAC 221
Відстаючий ланцюг 59
Віріоїд 30
Віріон 27
Віропексис 29
Віруси 27, 29
Вірусоїд 30

Г

GC-зажим 243
Гарячий старт 248
Ген 6, 70, 231
- класифікація за функціями 235
- регуляторний 174
- структурний 169
Генетична інженерія 204
Генетичний код 129
- властивості 134
Геном 43, 227, 228
- дрозофіла 47
- ксенопус 47
Геноміка 228
Генотип 43
Гіпотеза світу РНК 109
Головна догма молекулярної біології 70
Гуанін 15, 100, 129

Д

Дезоксирибоза 15
Дезоксирибонуклеїнова кислота 6, 10
- вірусів 31
- конформації 23
- сателітна 45
Делеція 123, 186
Диспергувані повтрювальні послідовності 46
- Alu-повтори 46, 48, 233
- LINE-повтори 46, 234
- LTR-повтори 46, 234
- SINE-повтори 46, 234

Е

Едітосома 123
Екзон 44, 117, 210, 222
Екзосома 127
Експресія генів 7, 70, 129
Екстеїн 161
Електрофорез 212
- денатуруючий градієнтний 240
Енхансер 84, 175
Епімеризація 163
Еукаріоти 40

З

Зимоген 159

І

Ідентифікація клітин 226
Інактивація Х-хромосоми 179

Індуктор (ефектор) 170
Індукція 171
Ініціатор 83
Інсерція 123, 186
Інсулятор 178
Інтеїн 161
Інтерсперсія 47
Інтрон 44, 117, 210, 222
Інфекція 225

К
Канцерогени 188
Капсид 27
- нуклеокапсид 28
- суперкапсид 28
Капсомери 27
Каріотип 43
Кепування 114
Кінці липкі 207, 214
- cos 31, 220
Кінці тупі 207, 215
Кодон 6, 103, 130
- ізоакцепторний 131
- нонсенс- (асенсовий) 131
Кодуючий (матричний) ланцюг 72
Компетентність клітин 226
Коннекторний метод з'єднання 217
Контамінація 251
Кон'югація 219, 226
Косміда 220

Л
Лідируючий ланцюг 59
Лінкер 217
Лінкерний метод з'єднання 217

М
MAR/SAR-послідовності 52
Мезосома 35
Метилування ДНК 180
Мікросателіти 45
Мінісателіти 45
Міторибосоми 154
Модель сканування 146
Модифікації (процесинг):
- РНК 7, 71, 110, 113, 124, 126
- білків 8, 71, 157
Молекулярне клонування 205
Муреїн 35
Мутагенез 185
Мутагення чинники 186
Мутація 185
- геномна 186
- генна 186
  - заміна пари основ 186
    - міссенс- 186
    - нонсенс- 186
    - сеймсенс- 186
  - зсув рамки зчитування 186
- хромосомна 186

Н
Некодуючий (асенсовий) ланцюг 72
Нуклеаза 29
- ексцизійна 198
- рестрикції (рестриктаза) 206
Нуклеїнові кислоти 15
Нуклеоїд 35, 36, 39, 64
Нуклеомер 50
Нуклеосома 50
Нуклеосомна корова одиниця 50
Нуклеосомна фібрила 50
Нуклеотид 15
Нуклеозид 15

О
Оператор 167, 169
Оперон 39, 73, 169

П
Паліндроми 48, 207
Пептидний зв'язок 141
Петля РНК 100
Плазміда 37, 39, 64, 219, 224
- кон'югативні 219, 226
- некон'югативні 219, 226
Поліаденілювання 110, 115
Полімеразна ланцюгова реакція 246
- використання 260
- денатурація 248
- компоненти 252
- ренатурація (відпал) 249

- різновиди 257
- синтез (елонгація) 250
Полімрфізм довжин рестрикційних фрагментів 238, 261
Полірибосома (полісома) 152
Правила Чаргаффа 17
Праймер (затравка) 59, 246, 254, 265
Прокаріоти 35
Промотор 72, 167, 169
- CAT-бокс 84
- GC-бокс 84
- TATA-бокс 83
- дистальний 81
- коровий 81
- проксимальний 81
Промутагени 188
Протопласт 226
Процесивність 60
Псевдовузол РНК 100
Псевдоген 47, 233
Пуроміцин 182

Р

Регуляція метаболізму 165
Регуляція транскрипції 167
- негативна (репресія) 167
- позитивна (активація) 167
Редагування РНК 123
Рекомбінантні молекули 205
Репарація 62, 185, 190
- АР-сайтів 194
- ексцизійна 191, 195
  - BER 195
  - NER 197
- кореплікативна 193
- одноланцюгових розривів 194
- постреплікативна 191, 200
  - гомологічна рекомбінація 200
  - місмач 201
- пошкоджень від алкільних груп 194
- пряма 191, 192
- фотореактивація 192
Реплікація 6, 7, 19, 20, 56, 73
- θ-тип 64
- σ-тип 65
- дисперсна 20
- з утворенням D-петлі 66
- консервативна 20
- напівконсервативна 20
- помилки 187
Реплікатор (Ori-сайт) 57
Реплікативні вила 57
Реплікон 57
Реплісома 57
Рестрикційні карти 211, 213
Ретротранспозон 46
Рибоза 15, 100
Рибозим 102, 108
Рибонуклеїнова кислота 6, 10, 100
- антисенсова 107
- вірусів 32
- мала інтерферуюча 108
- мала ядерна 106
- мала ядерцева 107
- матрична (інформаційна) 102
- мікро- 107
- провідник 124
- рибосомальна 105
- транспортна 102
- транспортно-матрична 106
Рибонуклеопротеїд 102
Рибосома 7, 105, 136
- А-сайт 139
- Е-сайт 139
- Р-сайт 139
РНКазне розщеплення 239

С

Сайленсер 84, 177
Сайт рестрикції 206
Седиментація 105
Секвенування 263, 264
- автоматичне 266
- другого покоління 268
- термінуючі аналоги трифосфатів 265
- ферментативне 265
- хімічне 264
Селективні умови 205
Система трьох доменів 35, 36
Сплайсинг білків 161
Сплайсинг РНК 114, 117
- альтернативний 120, 234

- ауто- 120
- акцептор 117
- донор 117
- транс- 122
Стебло-петля РНК 37
Стрептоміцин 184
Сферопласти 14

Т
ТАТА-бокс 83
Теломера 62
Термінатор 72, 74, 92, 267
Тетрацикліни 184
Тимін 15, 129
Трансдукція 224
Транскриптон 72
Транскриптосома 98
Транскрипційна сфера (бульбашка) 90
Транскрипція 7, 71, 73, 110, 140
- абортивна 88
- базальна 80
- елонгація 74, 89
- зв'язування (преініціація) 74, 80
- індукована, активована 80
- ініціація 74, 87
- сайт початку 81
- термінація 74, 92
Трансляція 7, 71, 129, 139, 140
- активація 140, 141
- елонгація 140, 147, 149
- ініціація 140, 143
  - кеп-залежна 145
  - кеп-незалежна 147
- реініціація 151
- термінація 140, 150
Трансфекція 225
Трансформація 219, 224
Триплет 103, 129

У
Урацил 15, 100, 129

Ф
Фазміда 221
Фактори транскрипції 72, 80, 173
- активація 175
- коактиватори (TAF-білки) 80
- основні (GTF) 80, 81
- специфічні (STF) 80, 81
Флагелліни 35
Фолдинг 158
Фотосинтез 156
Фрагменти Оказакі 59
Фусидова кислота 183

Х
Хлорамфенікол 182
Хроматин 40, 49, 95, 178
- LP-хроматин 37
- гетерохроматин 50, 178
- еухроматин 50, 178
- статевий 179
Хромомери 52
Хромосоми 40, 49
- гігантські (політенні)
- типу лампових щіток
- штучні 221

Ц
Цистрон 72
Цитозин 15, 100, 129

Я
Ядерце 124

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Айала Ф. Современная генетика – в 3х т. – Т. 1-2 / Ф. Айала, Дж. Кайгер; пер. с англ. – М. : Мир, 1987.
2. Алиханян С. И. Общая генетика / С. И. Алиханян, А. П. Акифьев, Л. С. Чернин. – М. : Высш. шк., 1985. – 446 с.
3. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия [Електронний ресурс] / Т. Т. Березов. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://www.xumuk.ru/biologhim/. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
4. Биология : учеб. / В. Н. Ярыгин, В. И. Васильева, И. Н. Волков, В. В. Синелыцикова; под ред. В. Н. Ярыгина. – 5-е изд., испр. и доп. – М. : Высш. шк., 2003. – 432 с.: ил.
5. Бочков Н. П. Медицинская генетика / Н. П. Бочков, А. Ф. Захаров, В. И. Иванов. – М. : Медицина., 1984. – 386 с.
6. Гвоздев В. А. Подвижная ДНК эукариот – в 2х ч. – Ч. 1. Структура, механизмы перемещения и роль подвижных элементов в поддержании целосности хромосом / В. А. Гвоздев // Соросовский обозревательный журнал. – 1998. – № 8. – С. 8-14.
7. Гвоздев В. А. Подвижная ДНК эукариот – в 2х ч. – Ч. 2. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома / В. А. Гвоздев // Соросовский обозревательный журнал. – 1998. – № 8. – С. 15–21.
8. Гиль М. І. Загальна та молекулярна генетика. Модуль «Молекулярно-генетичні механізми мінливості і спадковості» : курс лекцій / М. І. Гиль. – Миколаїв : МНАУ, 2012. – 275 с.
9. Гринев В. В. Генетика человека : курс лекций / В. В. Гринев. – Минск : БГУ, 2006. – 131 с. : ил.
10. Генетический код [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://www.xumuk.ru/encyklopedia/970.html. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
11. Гершенсон С. М. Основы современной генетики / С. М. Гершенсон. – К. : Наукова думка, 1983. – 558 с.
12. Докинз Р. Эгоистичный ген / Р. Докинз. – М. : Мир, 1993. – 316 с.
13. Жилина Е. В. Функции σ-субъединиц РНК-полимераз Escherichia coli и Thermus aquaticus на разных стадиях транскрипции : автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. биол. наук : спец. 03.01.03 «Молекулярная биология» / Е. В. Жилина. – М, 2012. – 22 с.

14. Инге-Вечтомов С. Г. Трансплантация как способ существования живых систем, или в чем смысл «бессмысленных» кодонов / С. Г. Инге-Вечтомов // Соровский образовательный журнал. – 1996. – № 12. – С. 2-10.
15. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём ; пер. с нем. – 2-е изд. – М. : Мир, 2004. – 469 с.
16. Кулаев И. С. Происхождение эукариотических клеток / И. С. Кулаев // Соровский образовательный журнал. – 1998. – № 5 (30). – С. 17–22.
17. Ленц В. Медицинская генетика / В. Ленц ; пер. с нем. – М. : Медицина, 1984. – 448 с.
18. Льюин Б. Гены / Б. Льюин. – М. : Мир, 1987. – 554 с.
19. Молекулярная биотехнология клетки – в 3х т. – Т. 2. / [Б. Альбертс, Д. Брей, М. Рэфф и др.] – М. : Мир, 1994. – 301 с.
20. Особенности структуры 5S рРНК, ее взаимодействия с макромолекулами и возможные функции / [А. В. Смирнов, Н. С. Энтелис, И. А. Крашенинников и др.] // Успехи биологической химии, 2008. – № 48. – С. 133-180.
21. Патрушев Л. И. Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. – М. : Наука, 2000. – 830 с.
22. Процессинг РНК у прокариот [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://www.biosense.ru/bsens-617-1.html. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
23. Прошкин С. А. Ядерные РНК-полимеразы I, II и III: структура и функции / С. А. Прошкин, Г. В. Шпаковский // Успехи биологической химии, 2005. – Т. 45. – С. 269-306.
24. Прошкина Г. М. Структура и функции транскрипционного аппарата эукариотической РНК-полимеразы III / Г. М. Прошкина, Г. В. Шпаковский // Успехи биологической химии, 2003. – Т. 43. – С. 139-162.
25. Репарация ДНК [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://medbiol.ru/medbiol/reparation/0000fc6b.htm#000e68c5.htm. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
26. Репарация ДНК [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://www.cellbiol.ru/category/molekulyarnaya_biologiya/molekulyarnaya_biologiya/reparaciya_dnk. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.

27. Саминский Е. М. Трансляция генетического кода на рибосомах / Е. М. Саминский. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2000. – 87 с.
28. Селеннова Т. В. Матричные процесы [Електронний ресурс] / Т. В. Селеннова. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://biobox.spb.ru/lektsii/matrichnye-protsessy/95-2-matrichnye-protsessy.html. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
29. Сингер М. Гены и геномы – в 2х т. – Т. 2. / М. Сингер, П. Берг ; пер. с англ. – М. : Мир, 1998. – 391 с.
30. Созревание РНК : процессинг и сплайсинг [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://userdocs.ru/himiya/28096/index.html?page=1. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
31. Сойфер В. Н. Репарация генетических повреждений [Електронний ресурс] / В. Н. Сойфер. – Електрон. текст. дані. // Соросовский Образовательный журнал. – 1997. – Режим доступу : http://www.pereplet.ru/obrazovanie/stsoros/373.html. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
32. Степт Г. Молекулярная генетика / Г. Степт, Р. Кэлиндар ; пер. с англ. – М., 1981. – с. 648.
33. Транскрипция хорошо регулируется [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://www.biokhimija.ru/lekcii-po-biohimii/21-matrichnye-biosintezy/93-reguljacija-transkripcii.html. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
34. Фаворова О. О. Сохранение ДНК в ряду поколений : репликация ДНК / О. О. Фаворова // Соровский образовательный журнал. – 1996. – № 4. – С. 11-17.
35. Хесин Р. Б. Непостоянство генома / Р. Б. Хесин. – М. : Наука, 1984. – 472 с.
36. Чолаков В. Нобелевские премии. Ученые и открытия / В. Чолаков. – М. : Мир, 1987. – 363 с.
37. Шапошников М. Механизмы репарации ДНК у *Drosophila Melanogaster* [Електронний ресурс] / М. Шапошников. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://ib.komisc.ru/add/old/t/ru/ir/vt/02-59/04.html. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
38. Юлевич О. І. Біотехнологія : навч. посіб. / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.

39. Юрченко Н. Н. Современная генетика локуса *white* у *Drosophila melanogaster* / Н. Н. Юрченко, М. Д. Голубовский // Генетика 29. – 1988. – № 4. – С. 581-591.
40. Ashburner M. Drosophila : a laboratory handbook / M. Ashburner. – Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, 1989. – 1331 p.
41. Cooley L. Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements / L. Cooley, R. Kelley, A. Spradling // Science. – 1988. – V. 239. – P. 1121-1128.
42. Crick F. C. H. Central nature of the genetic code for proteins / F. C. H. Crick // Nature 192. – 1961. – № 4809. – P. 1227–1232.
43. Crick F. Central dogma of molecular biology / F. Crick // Nature 227. – 1970. – № 5258. – P. 561–563.
44. Defranco D. Two control regions for eukaryotic tRNA gene transcription / D. Defranco, O. Schmidt, D. Soll // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980. – Vol. 77. – № 6. – P. 3365-3368.
45. Engels W. R. Invasions of P elements / W. R. Engels // Genetics. – 1997. – V. 145. – P. 11-15.
46. Life Sciences : web textbook [Електронний ресурс]. – The University of Toky, Japan. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/03_03.html. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
47. Fedoroff N. V. Barbara McClintock (June 16, 1902 – September 2, 1992) / N. V. Fedoroff // Genetics. – № 136. – 1994. – P. 1-10.
48. Fennegan D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution / D. J. Fennegan // Trends in Genetics 5. – 1989. – № 4. – P. 103-107.
49. From DNA to Protein: Genotype to Phenotype [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://bcs.whfreeman.com/thelifewire8e/bcs-pages/body-right_10.asp?s=12000&n=00010&i=12010.01&v=chapter&o=&ns=0. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
50. Garcia A. D. Formation of an Active Transcription Complex in the Drosophila melanogaster 5S RNA Gene Is Dependent on an Upstream Region / A. D. Garcia, A. M. O'Connell, S. J. Sharp // Molecular and cellular biology, 1987. – Vol. 7. – № 6. – P. 2046-2051.
51. In vivo analyses of the internal control region in the 5S rRNA gene from Saccharomyces cerevisiae / Y. Lee, A.M. Erkine, D.I. Van Ryk, R.N. Nazar // Nucleic Acids Research, 1995. – Vol. 23. – № 4. – P. 634-640.

52. Internal control regions for transcription of eukaryotic tRNA genes / [S. Sharp, D. Defranco, T. Dingermann et. al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981. – Vol. 78. – № 11. – P. 6657-6661.
53. Kornberg A. DNA replication / A. Kornberg. – 2nd edition. – University Science Books, 2005 – 931 p.
54. Kressmann A. A. tRNA gene of *Xenopus laevis* contains at least two sites promoting transcription / A. Kressmann, H. Hofstetter, E. D. Capua // Nucleic Acids Research, 1979. – Vol. 7. – № 7. – P. 1749-1763.
55. Lai C. Genetic application of transposable elements and eukaryotes / C. Lai // Genome. –1994. – № 37. – P. 519-525.
56. Lewin B. Genes V / B. Lewin // Oxford University Press. – Oxford ; New York ; Tokyo. – 1994. – 1272 p.
57. MedicalPlanet : Медицинский сайт [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : http://medicalplanet.su/genetica/. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
58. Miklos G. L. G. The role of the genome project in determining gene function : insights from model organisms / G. L. G. Miklos, G. M. Rubin // Cell. – 1996. – V. 86. – P. 521-529.
59. Molecule of the Month Archive : An Educational Resource for Exploring a Structural View of Biology [Електронний ресурс]. – Режим доступу : http://www.rcsb.org/pdb/101/motm_archive.do. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
60. Ng S. Y. Transcription of cloned Xenopus 5S RNA genes by *X.laevis* RNA polymerase III in reconstituted systems / S. Y. Ng, C. S. Parker, R. G. Roeder // Proc. Natl. Acad. Sci., 1979. – Vol. 76. – № 1. – P. 136-140.
61. Ogawa T. Discontinuous DNA Replication / T. Ogawa, T. Okazaki. – Ann. Rev. Biochem, 1980. – V. 49. – P. 421–457.
62. Portugal J. Counterions which favour the C form of DNA / J. Portugal, J.A. Subirana // The EMBO Journal, 1985. – Vol. 4. – № 9. – P. 2403–2408.
63. Reynolds N. M. Cellular mechanisms that control mistranslation / N. M. Reynolds, B. A. Lazazzera, M.Ibba // Nature Reviews Microbiology, 2010. – V. 8. – P. 849-856.
64. Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation / [N. Lee, Y. Bessho, K. Wei1 et. al.] // Nature America Inc., 2000. – P. 28-33.

65. Russell H. J. Genetics. Fifth edition / H. J. Russell. – 5th edition. – The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., USA. – 1998. – 805 p.
66. Schmidt O. Specific transcription of eukaryotic tRNA genes in Xenopus germinal vesicle extracts / O. Schmidt, Jen-I Mao, S. Silverman // Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1978. – Vol. 75. – № 10. – P. 4819-4823.
67. Sequence-specific binding of the N-terminal three-finger fragments of Xenopus transcription factors IIIA to the internal control region of a 5S RNA gene / J.H. Christensen, P.K. Hunsen, O. Lillelund, H.C. Thogersen // Federation of European Biochemical Societies, 1991. – Vol. 281. – № 1-2. – P. 181–184.
68. The first genome from third domain of life / R. A. Clayton, O. White, K. A. Ketchum, J. C. Venter // Nature. – 1997. – V. 387. – P. 459-462.
69. The Structure of Supercoiled Intermediates in DNA Replication / [B.J. Peter, C. Ullsper, H. Hiasa, et. al.] // Cell. – 1998. – Vol. 94. – P. 819–827.
70. Transcription Starts Here : Structural Models of a «Minimal» Preinitiation Complex [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані // Science Highlight, 2011. – Режим доступу : http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/highlights_archive/12-2_kornberg_polii.pdf. – Дата останнього доступу : 13.12.2013. – Назва з екрану.
71. Watson J. D. A structure of deoxyribose nucleic acid / Watson J. D., Crick F. H. C. // Nature 171. – 1953. – № 4356. – P. 737-738.
72. Watson J. D. General implications of the structure of deoxyribonucleic acid / Watson J. D., Crick F. H. C. // Nature 171. – 1953. – P. 964-967.
73. Watson J. D. Molecular structure of deoxypentose nucleic acid / Watson J. D., Crick F. H. C. // Nature 171. – 1953. – P. 738-740.
74. Zhimulev I. F. Genetic organization of polytene chromosomes / I. F. Zhimulev // Advances in genetics. – № 37. – 1998. – P. 1-566.

Навчальне видання

Гиль Михайло Іванович
Сметана Олександр Юрійович
Юлевич Олена Іванівна та ін.

Молекулярна генетика та технології дослідження генома

Навчальний посібник

Технічний редактор: О.Ю. Сметана

Формат 60×84 1/16. Ум. друк. арк. 17,5
Тираж 300 прим. Зам. № _____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.