

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

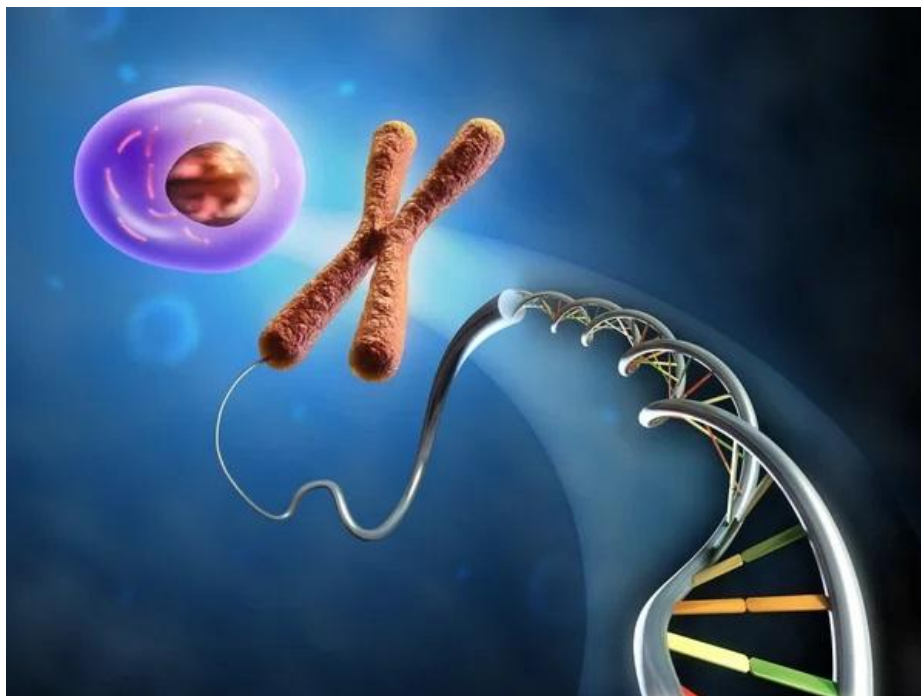
**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології**

Кафедра біотехнології та біоінженерії

МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ

КУРС ЛЕКЦІЙ

для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти ОПП
«Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та
біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти



Миколаїв
2024

УДК 57.577.2
М75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від «24» квітня 2024 р., протокол № 9.

Укладач:

О. С. Крамаренко - канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

П. А. Ващенко – д-р с.-г. наук, старший науковий співробітник, професор кафедри технології виробництва продукції тваринництва, Полтавський державний аграрний університет;

С. С. Крамаренко – д-р біол. наук, професор, професор кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет.

З М І С Т

	стор.
Лекція 1	4
Лекція 2	5
Лекція 3	7
Лекція 4	8
Лекція 5	9
Лекція 6	11
Лекція 7	12
Лекція 8	13
Лекція 9	14
Лекція 10	18
Лекція 11	20
Лекція 12	25
Лекція 13	28
Лекція 14	29
Лекція 15	34
Лекція 16	41
Лекція 17	43
Лекція 18	48
Лекція 19	52
Лекція 20	57
Лекція 21	86
Лекція 22	90
Список використаної літератури	143

1. Визначення предмету молекулярна біологія

Термін «молекулярна біологія» належить Френсісу Кріку, якому набридло у відповідь на питання про його професію оголошувати себе сумішню кристалографа, біохіміка, біофізика і генетика.

Молекулярна біологія - це наука про механізми збереження, відтворення, передачі і реалізації генетичної інформації, про структуру та функції нерегулярних біополімерів - нуклеїнових кислот та білків.

Почавши з вивчення біологічних процесів на молекулярно-атомному рівні, молекулярна біологія перейшла до складних надмолекулярних клітинних структур, а в даний час успішно вирішує проблеми генетики, фізіології, еволюції та екології.

Основні етапи розвитку молекулярної біології:

1. Романтичний період 1935-1944 рр. Макс Дельбрюк і Сальвадор Лурія займалися вивченням репродукції фагів і вірусів, що представляють собою комплекси нуклеїнових кислот з білками. У 1940р. Джордж Бідл і Едуард Татум сформулювали гіпотезу «Один ген - один фермент». Однак, що таке ген у фізико-хімічному плані тоді ще не знали.

2. Другий романтичний період 1944-1953 рр., в якому була доведена генетична роль ДНК. У 1953 р. з'явилася модель подвійної спіралі ДНК, за яку її творці Джеймс Уотсон, Френсіс Крік і Моріс Уїлкінс були удостоєні Нобелівської премії.

3. Догматичний період 1953-1962 рр. Сформульована центральна догма молекулярної біології: **переніс генетичної інформації йде у напрямі**
ДНК → РНК → БІЛОК

В 1962 г. був розшифрований генетичний код.

4. Академічний період з 1962 р. по наш час, в якому з 1974 року виділяють *генно-інженерний підперіод*.

Основні відкриття

- 1944 р. Доказ генетичної ролі ДНК: Освальд Ейвері, Колін Мак-Леод, Маклін Мак-Карті
- 1953 р. Встановлення структури ДНК: Джеймс Уотсон, Френсіс Крік
- 1961 р. Відкриття генетичної регуляції синтезу ферментів: Андре Львов, Франсуа Жакоб, Жак Моно
- 1962 р. Розшифровка генетичного коду: Маршалл Нірнберг, Генріх Маттеї, Северо Очоа
- 1967 р. Синтез in vitro біологічно активної ДНК: Артур Корнберг (неформальний лідер молекулярної біології)
- 1970 р. Хімічний синтез гену: Гобіід Корана
- 1970 р. Відкриття ферменту зворотної транскриптази та явища зворотної транскрипції: Говард Темін, Девід Балтімор, Ренато Дульбеко
- 1974 р. Відкриття рестриктаз: Гамільтон Сміт, Даніель Натанс, Вернер Арбер
- 1978 р. Відкриття сплайсингу: Філіпп Шарп
- 1982 р. Відкриття автосплайсингу: Томас Чек

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке молекулярна біологія, як наука?
2. В чому полягає суть романтичного періоду розвитку молекулярної біології?
3. В чому полягає суть другого романтичного періоду розвитку молекулярної біології?
4. В чому полягає суть догматичного періоду розвитку молекулярної біології?
5. В чому полягає суть академічного періоду розвитку молекулярної біології?
6. Перерахуйте у хронологічному порядку основні відкриття, що стосуються розвитку молекулярної біології, як науки.

2. Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК)

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) — один із двох типів природних нуклеїнових кислот, який забезпечує зберігання, передачу з покоління в покоління і реалізацію генетичної програми розвитку й функціонування живих організмів. Основна роль ДНК в клітинах — довготривале зберігання інформації про структуру РНК і білків.

У клітинах еукаріотів (наприклад, тварин, рослин або грибів) ДНК знаходиться в ядрі клітини в складі хромосом, а також в деяких клітинних органелах (мітохондріях і пластидах). У клітинах прокариотів (бактерій і архей) кільцева або лінійна молекула ДНК, так званий нуклеоїд, знаходиться в цитоплазмі і прикріплена зсередини до клітинної мембрани. У них і у нижчих еукаріот (наприклад дріжджів) зустрічаються також невеликі автономні кільцеві молекули ДНК, так звані плазміди. Крім того, одно- або дволанцюжкові молекули ДНК можуть утворювати геном ДНК-вірусів.

З хімічної точки зору, ДНК — це довга полімерна молекула, що складається з послідовності блоків — нуклеотидів. Кожний нуклеотид складається з азотистої основи, цукру (дезоксирибози) і фосфатної групи (або гомологічної арсенної). Зв'язки між нуклеотидами в ланцюжку утворюються за рахунок дезоксирибози і фосфатної групи. У переважній більшості випадків (окрім деяких вірусів, що містять одностанцюжкові ДНК) макромолекула ДНК складається з двох ланцюжків, орієнтованих азотистими основами один проти одного. Ця дволанцюжкова молекула утворює спіраль. В цілому структура молекули ДНК отримала назву «подвійної спіралі».

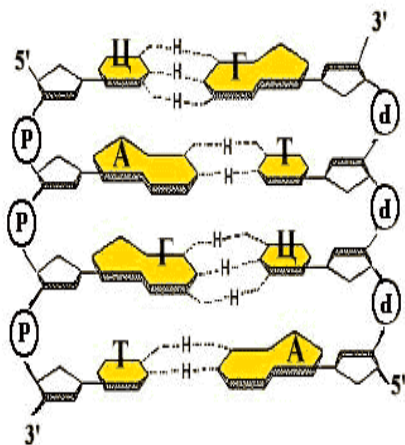
У ДНК зустрічається чотири види азотистих основ (аденін, гуанін, тимін і цитозин) (виняток становлять випадки пізніших

модифікацій нуклеотидів, наприклад метилювання). Азотисті основи одного з ланцюжків сполучені з азотистими основами іншого ланцюжка водневими зв'язками згідно з принципом комплементарності: аденін з'єднується тільки з тиміном, гуанін — тільки з цитозином. Послідовність нуклеотидів дозволяє «кодувати» інформацію про різні типи РНК, найважливішими з яких є інформаційні, або матричні (мРНК), рибосомальні (рРНК) і транспортні (тРНК). Всі ці типи РНК синтезуються на матриці ДНК (тобто за рахунок копіювання послідовності ДНК у послідовність макромолекули, що синтезується) у процесі транскрипції і беруть участь у біосинтезі білків (процесах сплайсингу і трансляції). Крім кодуєчих послідовностей, ДНК клітини містить послідовності, що виконують регуляторні і структурні функції. Ділянки кодуєчої послідовності разом із регуляторними ділянками називаються **генами**.

У геномах еукаріотів містяться також довгі послідовності без очевидної функції (некодуєчі послідовності, інтрони). Також у складі геному досить поширені генетичні паразити — транспозони і вірусні або схожі на них послідовності.

Розшифровка структури ДНК (виконана у 1953 році) стала одним з поворотних моментів в історії біології. За видатний внесок у це відкриття Френсісу Кріку, Джеймсу Ватсону і Морісу Вілкіну була присуджена Нобелівська премія з фізіології і медицини 1962 року.

Принципи будови ДНК



1. Нерегулярність. Існує регулярний цукрофосфатний кістяк, до якого приєднані азотисті основи. Їх чергування нерегулярне.

2. Антипаралельність. ДНК складається з двох полінуклеотидних ланцюжків, орієнтованих антипаралельно.

3'-кінець однієї розташований навпроти 5'-кінця іншого.

3. Комплементарність (додатковість).

Кожній азотистій основі одного ланцюга відповідає суворо певна азотна основа іншого ланцюга. Відповідність задається хімією. Пурин і піримідин в парі утворюють водневі зв'язки. У парі А-Т два водневих зв'язки, в парі Г-Ц - три.

4. Наявність регулярної вторинної структури. Два комплементарні,

антипаралельно розташовані полінуклеотидних ланцюга утворюють праві спірالی із загальною віссю.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке дезоксирибонуклеїнова кислота? Дайте визначення.
2. Місце локалізації ДНК у еукаріот та прокаріот.
3. Що таке ДНК з хімічної точки зору?
4. Що таке ген?
5. Які вчені розшифрували структуру ДНК, в якому році?
6. Вкажіть принципи будови ДНК.

3. Гіпотези реплікації ДНК

Після того, як було встановлено, що ДНК утворюється шляхом побудови на існуючій молекулі нових ланцюгів, виникло питання яким чином відбувається подвоєння вихідної молекули? Були висунуті три гіпотетичних механізми реплікації.

- *Консервативний механізм* — при такому способі розкручування спіралі не відбувається, існуюча подвійна спіраль є матрицею для синтезу двох нових ланцюгів. Нова спіраль будується повністю з нового матеріалу, існуюча спіраль залишається незмінною.

- *Напівконсервативний механізм* — існуюча спіраль розкручується, на кожному полінуклеотидному ланцюзі комплементарно будується новий. Таким чином, нова подвійна спіраль є «гібридом» старого та нового ланцюгів

- *Дисперсивний механізм* — існуюча спіраль розривається на кожному півоберті шляхом багаторазової фрагментації. Синтез нових ланцюгів проходить на фрагментах, які потім хрест-навхрест зливаються з відрізками нового матеріалу. Кожний полінуклеотидний ланцюг складається з відрізків старого та нового матеріалу, які чергуються.

З метою з'ясування, який механізм є дійсним, Меселсон та Сталь провели експерименти з міченою ДНК, яка містила у своєму складі важкий ізотоп азоту. В результаті дослідження вдалося виявити, що ДНК синтезується за напівконсервативним механізмом.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. В чому полягає суть консервативного механізму реплікації ДНК?
2. В чому полягає суть напівконсервативного механізму реплікації ДНК?
3. В чому полягає суть дисперсивного механізму реплікації ДНК?
4. В чому полягає суть досліду Меселсона та Сталю? Який висновок зробили вчені на рахунок гіпотез реплікації ДНК?

4. Молекулярний механізм реплікації дволанцюгової ДНК

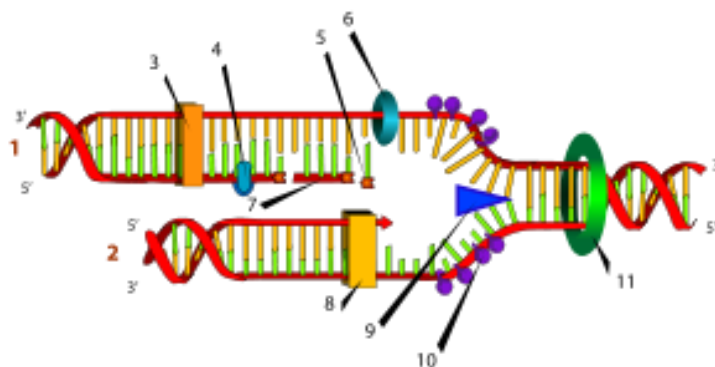


Рис. 1. Процес реплікації ДНК

Схематичне зображення процесу реплікації, цифрами позначені:

1- ланцюг, що відстає; 2 - ланцюг-лідер; 3 - ДНК-полімераза ($Pol\alpha$);
4 - ДНК лігаза; 5 - РНК-праймер; 6 - ДНК-праймаза; 7 - фрагмент Окадзакі;
8 - ДНК-полімераза ($Pol\delta$); 9 - хеліказа; 10 - одиночний ланцюг зі зв'язаними білками; 11- топоізомераза.

Реплікація — складний багатоетапний процес, в якому беруть участь багато ферментів, він потребує багато часу та значних енергетичних витрат клітини. Процес починається з того, що фермент топоізомераза випрямляє закручену у спіраль молекулу ДНК та до неї приєднуються білки, які не дають молекулі знов згорнутись. Фермент хеліказа розриває водневі зв'язки між азотистими основами, внаслідок чого ділянка подвійної молекули ДНК розпадається на два ланцюги, утворюється так звана «виделка реплікації». До ланцюга приєднується ДНК-праймаза — фермент який розпочинає синтез ДНК — власне реплікацію. Вона синтезує праймер — послідовність нуклеотидів, від якої наступний фермент — ДНК-полімераза будує новий ланцюг, використовуючи наявний як матрицю. Праймером слугує фрагмент РНК, він потрібний, тому що ніяка ДНК-полімераза не може почати синтез нового ланцюжка «з нуля», а може тільки додати нуклеотиди до існуючого ланцюжка. Коли праймер виконав свою функцію, він видаляється екзонуклеазою, а інша полімераза «забудовує» пусте місце, яке виникло. Також ДНК-полімераза здатна виправляти можливі помилки реплікації та перевіряти комплементарність. Синтез нових ланцюгів відбувається асиметрично, тобто один з них синтезується безперервно, по ходу роз'єднання молекули ДНК хеліказою, інший ланцюг будується в протилежному напрямку — проти напрямку дії хелікази, тому відбувається короткими фрагментами, довжиною 1000 — 2000 нуклеотидів, які називаються фрагменти Окадзакі, на честь японського вченого що їх відкрив. Фрагменти Окадзакі з'єднує між собою фермент ДНК-лігаза. Таким чином, з

однієї молекули ДНК утворюються дві ідентичні, які після закінчення процесу реплікації спіралізуються.

У еукаріот реплікація відбувається перед поділом клітини, у прокаріот — протягом всього життєвого циклу.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке процес реплікації?
2. Який молекулярний механізм реплікації дволанцюгової ДНК?
3. Де відбувається процес реплікації у еукаріот та у прокаріот?

5. Інші механізми реплікації

Реплікація у вірусів, що мають одноланцюгову ДНК має особливості. В клітині хазяїна на такій молекулі, яку називають (+)- ланцюгом синтезується комплементарний йому (-)- ланцюг, таким чином, утворюється дволанцюгова молекула ДНК. (-)- ланцюг потім слугує матрицею для синтезу нових (+)-ланцюгів, які вбудовуються у вірусні частинки. В процесі беруть участь ферменти вірусів та ферменти клітини-хазяїна.

Реплікація РНК відбувається у організмів, геном яких кодує ця нуклеїнова кислота — це деякі типи вірусів та віроїди. Процес відбувається в клітинах хазяїна, які були інфіковані цими організмами. При цьому також синтезуються (-)- ланцюги та РНК проходить дволанцюгову стадію.

Подвійна спіраль ДНК зазвичай не взаємодіє з іншими сегментами ДНК, а в клітинах еукаріотів різні хромосоми просторово розділені в ядрі. Ця відстань між різними хромосомами важлива для здатності ДНК діяти в якості стабільного носія інформації. В процесі рекомбінації дві спіралі ДНК розриваються, після чого безперервність спіралей відновлюється, але не обов'язково в правильному порядку, тому обмін ділянками хромосом може привести до пошкодження цілісності генетичного матеріалу. З іншого боку, рекомбінація дозволяє хромосомам обмінюватися генетичною інформацією, в результаті цього утворюються нові комбінації генів, що збільшує ефективність природного відбору й важливо для швидкої еволюції нових білків.

В процесі негомологічної рекомбінації (негомологічного з'єднання кінців), що виникає в результаті зовнішніх пошкоджень, дві спіралі ДНК розриваються, після чого неперервність спіралей відновлюється в процесі репарації клітиною дволанцюжкових розривів ДНК, але не обов'язково в правильному порядку. Тому обмін ділянками негомологічних хромосом може привести до пошкодження цілісності генетичного матеріалу

в результаті розриву генів або розриву регуляторних зв'язків — транслокацій.

Найпоширеніша форма рекомбінації — гомологічна рекомбінація — коли рекомбінація виникає між гомологічними хромосомами, тобто хромосомами, що мають дуже схожі послідовності (що зазвичай утворюються в організмах із статевим розмноженням під час мейозу). Іноді в якості гомологічних ділянок виступають транспозони. Реакція гомологічної рекомбінації каталізується ферментами, які називаються рекомбіназами, наприклад, Cre. На першому етапі реакції рекомбіназа робить розрив в одному з ланцюжків ДНК, дозволяючи цьому ланцюжку відокремитися від комплементарного ланцюжка й приєднається до одного з ланцюжків другої хроматиди. Інший розрив в ланцюжку другої хроматиди дозволяє їй також відокремитися і приєднається до ланцюжка, що залишився без пари, з першої хроматиди, формуючи структуру Холідея. Структура Холідея може пересуватися вздовж сполученої пари хромосом, міняючи ланцюжки місцями. Реакція рекомбінації завершується, коли фермент розрізає з'єднання, а два ланцюжки лігуються.

Репарація ДНК (від англ. *DNA repair* — «ремонт ДНК») — набір процесів, за допомогою яких клітина знаходить і виправляє пошкодження молекул ДНК, які кодують її геном. У клітинах всіх організмів, зокрема людини, як нормальна метаболічна активність, так і зовнішні фактори, такі як ультрафіолетове випромінювання, можуть викликати пошкодження ДНК, приводячи у людини до 1 мільйона індивідуальних молекулярних пошкоджень на клітину за день. Багато з цих пошкоджень заподіює структурні пошкодження молекулі ДНК і може впливати на транскрипцію генів клітини, або навіть повністю запобігати їй. Деякі пошкодження викликають потенційно шкідливі мутації в геномі клітин, які впливають на виживання клітини або її дочірніх клітин після мітозу. Тому, процеси репарації ДНК повинні бути постійно активними, так як вони мають швидко відповідати на будь-які пошкодження структури ДНК.

Ефективність репарації ДНК залежить від багатьох факторів, зокрема типу клітини, її віку та оточення. Клітини, що накопичили велику кількість пошкоджень ДНК або не мають більше можливостей до репарації, можуть піти одним з трьох можливих шляхів: перейти до незворотного статичного стану або клітинного старіння, піддатися апоптозу або альтруїстичному самогубству, або продовжити ділитися і стати першою клітиною ракової пухлини. Репарація ДНК життєво важлива для підтримки цілісності геному й для нормального функціонування організму. Багато генів, які, як було показано, впливають на тривалість життя, пізніше опинилися залученими в репарацію і захист ДНК. Нездатність виправлення деяких

молекулярних пошкоджень генеративних клітин можуть ввести мутації в геном нащадків і, таким чином, впливають на швидкість еволюції.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Які особливості реплікації молекули ДНК у вірусів?
2. В чому полягає суть не гомологічної рекомбінації?
3. В чому полягає суть гомологічної рекомбінації?
4. Що таке процес репарації ДНК?
5. Від чого залежить ефективність репарації ДНК?

6. Транскрипція

Транскрипція - це синтез всіх видів РНК на матриці ДНК, що здійснюється ферментом ДНК-залежної РНК-полімерази.

У прокаріотів синтез всіх видів РНК здійснюється одним і тим же ферментом.

У еукаріотів - 3 ядерні РНК-полімерази, мітохондріальні РНК-полімерази, хлоропластної РНК-полімерази. Субстратами для РНК-полімераз служать рибонуклеозид-трифосфат (активовані нуклеотиди). Весь процес транскрипції здійснюється за рахунок енергії макроергічних зв'язків активованих нуклеотидів.

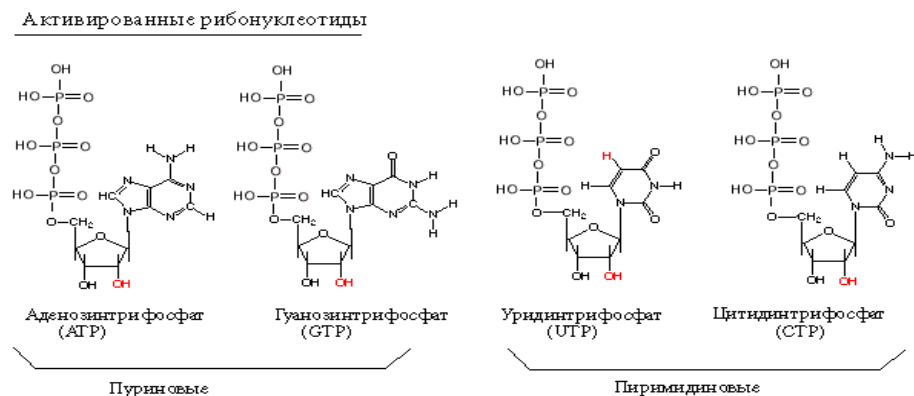


Рис. 2. Активовані рибонуклеотиди

Принципи транскрипції:

1. Комплементарність.
2. Антипаралельність.
3. Уніполярність.
4. Неперекриваємість.
5. Асиметричність.

РНК синтезується комплементарно і антипаралельно ланцюгу ДНК, що транскрибується. Зростання ланцюга РНК йде тільки в напрямку $5' \rightarrow 3'$. Для початку синтезу РНК фермент не потребує полі-або олігонуклеотидної затравки. Перший нуклеотид в РНК завжди пурин у формі трифосфату.

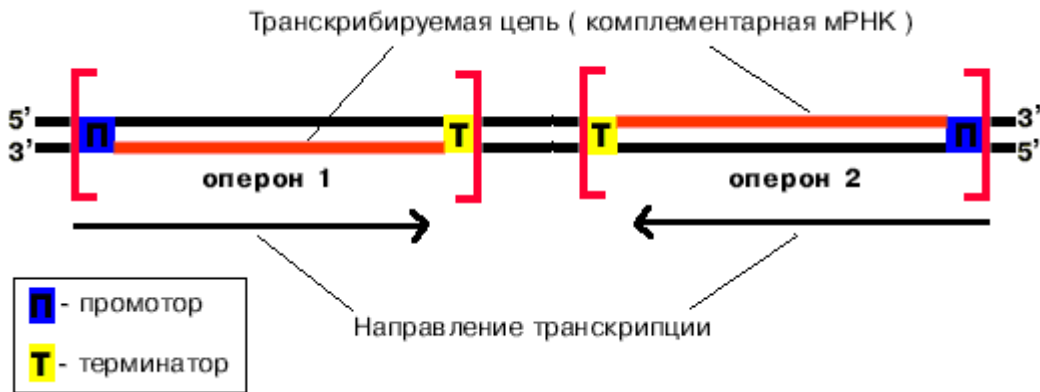


Рис. 3. Синтез молекули РНК

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке процес транскрипції?
2. За допомогою яких ферментів здійснюється транскрипція у прокариот і в еукариот?
3. Перерахуйте основні принципи транскрипції.
4. Як відбувається синтез молекули РНК?

7. Субодиночний склад РНК-полімерази E.coli

РНК-полімераза E.coli - білок з четвертинною структурою. Одночасно в клітині присутньо близько 7000 молекул РНК-полімерази.

Субодиночний склад ферменту: $(2\alpha)\beta\beta'\sigma$ - *holo*-фермент (повний фермент). Без σ -фактора це *core*-фермент $(2\alpha)\beta\beta'$.
 σ (*сигма*) - фактор - змінний фактор специфічності.

Тільки *holo*-фермент володіє високою спорідненістю до специфічної послідовності нуклеотидів - промотору, спорідненість до решти випадкових послідовностей ДНК у нього знижена в 10000 разів. У *core*-ферменту однакова спорідненість до будь-якої послідовності нуклеотидів.

Сам по собі σ -фактор володіє найменшою спорідненістю до ДНК порівняно з іншими субодиноцями РНК-полімерази, однак він додає *holo*-ферменту таку конформацію, що володіє підвищеною спорідненістю до промотору.

Як тільки відбулася ініціація транскрипції, σ -фактор відділяється. Елонгація - продовження синтезу РНК, і термінація - його зупинка, здійснюються core-ферментом.

Стадії впізнавання і зв'язування, а також ініціації здійснюються holo-ферментом. Елонгація і термінація здійснюються core-ферментом.

Дві α субодиниці - каркас РНК-полімерази. До них кріпляться інші субодиниці.

β' - субодиниця відповідає за міцне зв'язування з ДНК за рахунок кластеру позитивно заряджених амінокислот.

В β - субодиниці знаходяться два каталітичних центра. Один відповідає за ініціацію, а інший - за елонгацію. Один центр працює в holo-, а інший - в core-ферменті.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке РНК-полімераза E.coli?
2. Який субодиничний склад ферменту: $(2\alpha)_2\beta\beta'\sigma$?

8. Особливості структури промотора

Для вивчення структури промоторів провели наступний експеримент. За оптимальних умов зв'язування отримали комплекс РНК-полімерази з ДНК. Цей комплекс обробили ДНК-азою, і, таким чином, гідролізували всю ДНК, незахищену РНК-полімеразою.

Після цього відокремили РНК-полімеразу від решти фрагментів ДНК. Знову створили оптимальні умови для утворення комплексу. Комплекс не утворювався.

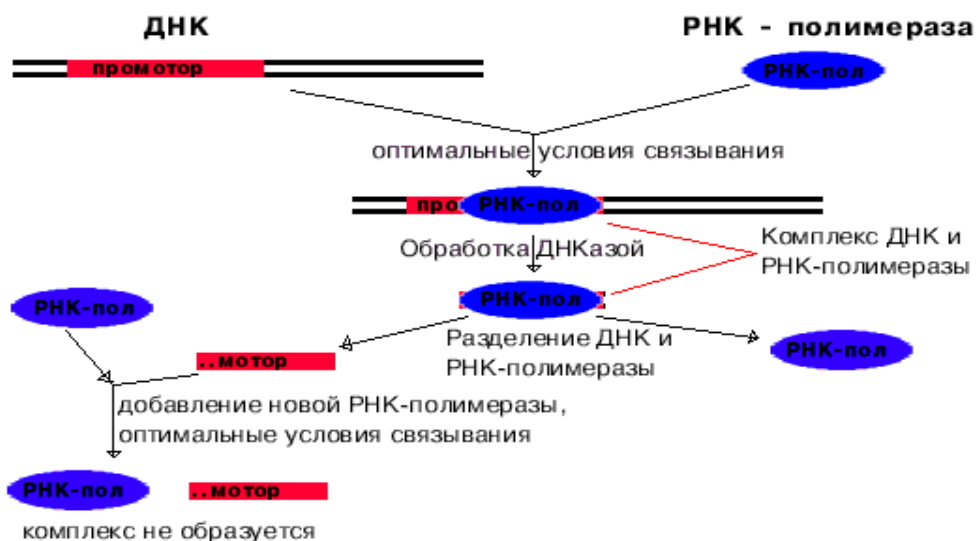


Рис.4. Експеримент щодо отримання РНК-полімерази з ДНК

Звідси випливає висновок, що впізнавання і міцне зв'язування відбувається на різних ділянках ДНК. Ці ділянки відрізняються і за первинною, і за вторинною структурою. Шляхом секвенування виявили структуру багатьох промоторів. У більшості з них є загальна властивість.



Рис. 5. Консенсусні послідовності, які розпізнає РНК-полімераза

РНК-полімераза впізнає промотор, покриваючи 40-60 пар нуклеотидів. У промоторі впізнається взаємне розташування двох розплавлених АТ-багатих ділянок. У кожному з них розплавлено 4-6 пар. Центри цих ділянок знаходяться в положенні "-10" і "-35". Принципово важливим є відстань між розплавленими ділянками. Вона коливається від 16 до 19 п.н. Штучне збільшення цієї відстані до 20 п.н. або зменшення її до 15 п.н. призводить до того, що РНК-полімераза не впізнає зіпсований промотор.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Які особливості структури промотора?
2. В чому полягає суть експерименту щодо отримання РНК-полімерази з ДНК?

9. Етапи транскрипції

1. Впізнавання і міцне зв'язування

Як тільки відбулося впізнавання (позиція 1), РНК-полімераза переміщується в позицію 2. У каталітичному центрі ініціації транскрипції, що знаходиться в β -субодиниці, виявляється +1-ий нуклеотид оперона. Перехід з позиції 1 в позицію 2 можливий, якщо на операторі немає білка-репресора.

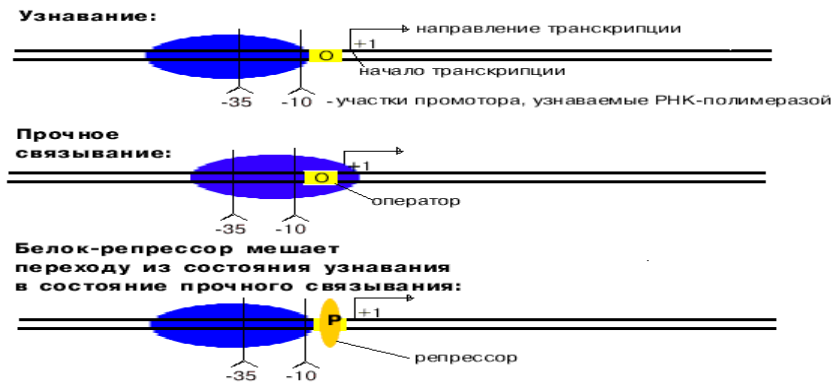


Рис. 6. I этап транскрипції

Приблизно 5% промоторів у прокаріотів мають лише ділянку "-10", однак, тим не менш, добре впізнаються РНК-полімеразою. Такі промотори представлені паліндромними послідовностями, які приймають форму хреста при суперспіралізації кільцевих молекул ДНК.

Паліндромні - послідовності, які читаються однаково зліва направо і справа наліво. Паліндромні першого порядку мають одну вісь симетрії, другого - дві, третього - три.

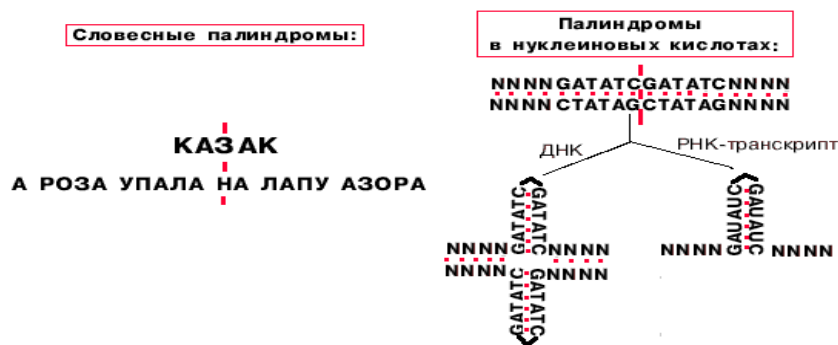


Рис. 7. Паліндромні в нуклеїнових кислотах

2. Ініціація полягає в утворенні першого фосфодієфірного зв'язку між пурин-трифосфатом (АТФ або ГТФ) і наступним нуклеотидом. Після ініціації σ - фактор залишає фермент.

3. Елонгація - послідовне нарощування ланцюга РНК (або продовження транскрипції). Швидкість елонгації 40-50 нукл./Сек. Для комплементарного синтезу РНК необхідний розрив водневих зв'язків в ДНК. Core-фермент РНК-полімерази покриває приблизно 40 пар нуклеотидів (4 витка спіралі ДНК). Розрив водневих зв'язків на 4-х витках спіралі - дуже енергоємний процес. Він не був виявлений при вивченні транскрипції.

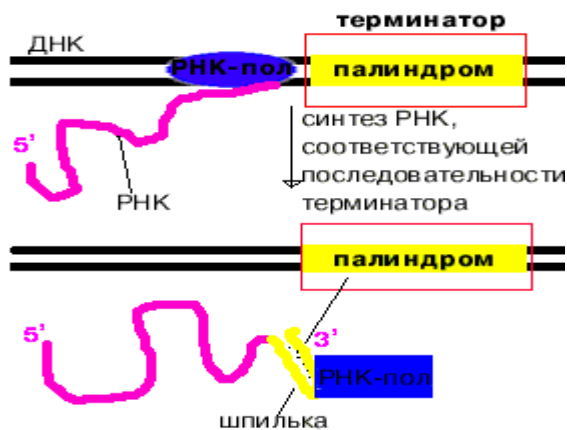


Показано, що РНК-полімераза переводить ДНК з В-форми в А-форму. У ній площини азотистих основ не перпендикулярні осі спіралі, а нахилені на 20° до перпендикуляру. Це полегшує «вивертання» двох сусідніх азотистих основ у ланцюга ДНК для того, щоб навпроти них встали комплементарні нуклеотиди РНК. На користь цього говорить повна ідентичність параметрів А-форми ДНК і гібрида, що складається з одного ланцюга ДНК і однієї - РНК. «Мотором» транскрипції є енергія, що вивільнюється при відщепленні пірофосфату від кожного рибо-НТФ.

Інгібітори транскрипції прокариотів. Існує безліч інгібіторів транскрипції. Вони діють за різними механізмами і на різних стадіях. Більшість з них - антибіотики. *Рифампіцин* - інгібітор ініціації. Зв'язується з центром ініціації голо-РНК-полімерази *E. coli*. Стрептолідігін - інгібітор елонгації. Зв'язується з центром елонгації core-РНК-полімерази *E. coli*.

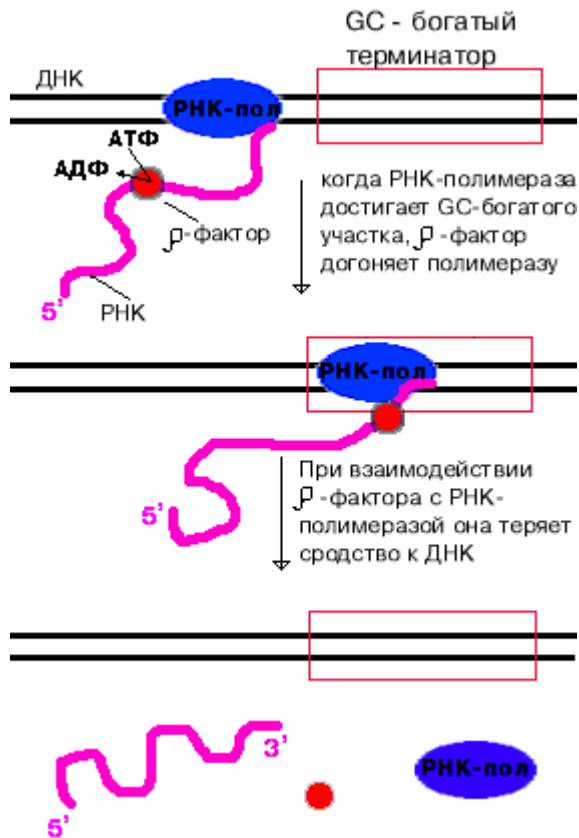
4. Термінація.

Специфічна термінація буває ρ - незалежною і ρ - залежною.



При ρ - незалежній термінації в термінаторі присутній палиндром. У РНК, що синтезується формується шпилька. Шпилька змінює конформацію РНК-полімерази і фермент втрачає спорідненість до ДНК.

ρ -залежна термінація.



ρ- фактор - це білок, що має четвертинну структуру, і володіє АТФ-азною активністю. Він здатний впізнавати 5`-кінець РНК, що синтезується довжиною приблизно 50 нуклеотидів, сідати на нього і рухатися по РНК з такою ж швидкістю, з якою РНК-полімераза рухається по ДНК.

У термінаторі багато Г-Ц пар (з трьома водневими зв'язками), внаслідок чого РНК-полімераза уповільнює хід, ρ- фактор її наздоганяє, змінює конформацію ферменту - і синтез РНК припиняється.

Експресія генів — процес, при якому спадкова інформація генів, наприклад нуклеотидна послідовність, використовується для синтезу функціонального генетичного продукту, наприклад білка або РНК.

Якщо кінцевим продуктом є білок, процес експресії генів називається біосинтезом білків, що складається із кроків транскрипції, сплайсингу, трансляції та посттрансляційної модифікації. В інших випадках, наприклад для генів, що кодують рРНК або тРНК, набір кроків дещо відрізняється. Для експресії генів може використовуватися як генетична інформація, так і епігенетична. Застарілий термін «реалізація генетичної інформації» посилається тільки на інформацію першого типу, якої, проте, може бути недостатньо для отримання функціонального продукту.

Експресія генів в багатьох випадках активно регулюється, змінюючи час та кількість синтезованого генетичного продукту. Кілька кроків у процесі експресії генів можуть модулюватися, зокрема транскрипція і посттрансляційна модифікація. Регулювання експресії генів надає клітині контроль за кількістю та структурою синтезованих біополімерів і є основою диференціації клітин, морфогенезу і адаптації організму до умов навколишнього середовища. Регулювання експресії генів також може приводити до еволюційних змін.

Процес експресії генів відбувається в організмах усіх живих істот: еукаріотів (у тому числі в багатоклітинних організмах), прокариотів (у бактерій і археїв), а також вірусів - для створення макромолекулярних основ для їх життєдіяльності. Деякі процеси, які відбуваються під час експресії генів можуть модулюватися певними чинниками, наприклад транскрипція, сплайсинг РНК, трансляція і посттрансляційна модифікація білку.

Експресія генів забезпечує підтримання структури та функції клітини, що є основою для диференціації клітин, морфогенезу, а також універсальної адаптованості будь-якого організму до умов існування. Регуляція генів може також служити в якості субстрату для еволюційних змін, оскільки контроль за часом, місцем і інтенсивністю експресії генів може мати величезний вплив на функції (дію) генів у клітині або у багатоклітинному організмі.

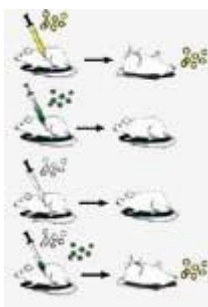
У генетиці, вплив експресії генів розглядається на фундаментальному рівні, адже під час цього процесу під дією генотипу формується фенотип. Генетичний код зберігається у ДНК у вигляді нуклеотидної послідовності «яка інтерпретується» під час експресії генів, а властивості продуктів експресії генів призводить до формування фенотипу організму.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Перерахуйте етапи транскрипції.
2. В чому полягає суть впізнавання та міцного зв'язування?
3. В чому полягає суть процесу ініціації?
4. В чому полягає суть процесу елонгації?
5. Вкажіть основні інгібітори транскрипції прокаріотів.
6. Що таке термінація? Які існують види термінації? Охарактеризуйте їх.
7. Що таке експресія генів? Яким чином вона регулюється? Що вона забезпечує?

10. Докази генетичної ролі нуклеїнових кислот

1. 1928 р. Досліди Фредеріка Гріффіта.



Гріффіт працював з пневмококками – бактеріями, що викликають пневмонію. Він брав два штами пневмококів: капсульний і безкапсульний. Капсульний – патогенний (вірулентний), при інфікуванні таким штамом миші гинуть, безкапсульний – непатогенний. При введенні мишам суміші убитих нагріванням (тих, що втратили вірулентність) капсульних пневмококів і живих безкапсульних невірулентних бактерій, тварини гинули в результаті розмноження капсульних вірулентних форм. Виявлене явище Гріффіт інтерпретував як трансформацію.

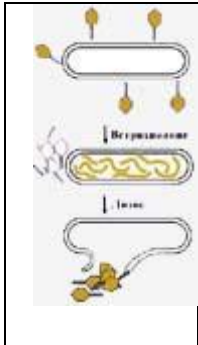
Таким, чином, **трансформація** – це придбання одним організмом деяких ознак іншого організму за рахунок захоплення частини його генетичної інформації.

У 1944р. цей експеримент був повторений Освальдом Ейвері, Коліном Мак-Леодом і Маклін Мак-Карті у варіанті змішування безкапсульних пневмококів до взятих від капсульних білками, полісахаридами або ДНК. В результаті цього експерименту була виявлена природа трансформуючого фактору. Трансформуючим фактором виявилася ДНК.

2. 1952 р. – Експеримент Альфреда Херши та Марти Чейз.

Фаги (бактеріофаги) – це віруси, які розмножуються у бактеріях.

E. coli – кишкова паличка (еубактерія).

	<p>Суть досліду: фаги, у яких білкова оболонка була мічена радіоактивною сіркою (S^{35}), а ДНК – радіоактивним фосфором (P^{32}), інкубували з бактеріями. Потім бактерії відмивали. У змивних водах не виявляли P^{32}, а в бактеріях - S^{35}. Відповідно, всередину потрапила тільки ДНК. Через кілька хвилин з бактерії виходили десятки повноцінних фагів, які містили і білкову оболонку, і ДНК.</p>
---	---

Звідси випливав однозначний висновок про те, що саме ДНК виконує генетичну функцію – несе інформацію як про створення нових копій ДНК, так і про синтез фагових білків.

3. 1957 р. Досліди Френкеля – Конрата.



Френкель-Конрат працював з вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ). У цьому вірусі міститься РНК, а не ДНК. Було відомо, що різні штами вірусу викликають різну картину ураження листя тютюну. Після зміни білкової оболонки «перевдягнуті» віруси викликали картину ураження, характерну для того штаму, чия РНК була вкрита чужим білком.

Отже, не тільки ДНК, але й РНК може служити носієм генетичної інформації. На сьогоднішній день існують сотні тисяч доказів генетичної ролі нуклеїнових кислот. Наведені три є класичними.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

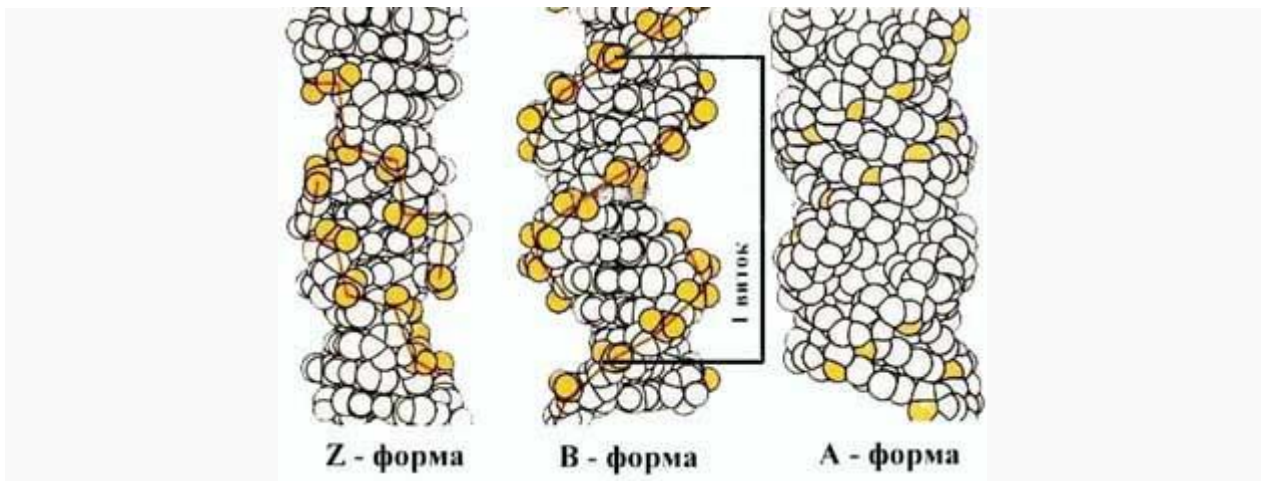
1. В чому полягає суть досліду Фредеріка Гріффіта?
2. В чому полягає суть експерименту Альфреда Херши і Мартіна Чейза?
3. В чому полягає суть дослідів Френкеля Конрата?
4. Які речовини слугують носієм генетичної інформації?

11. Фізичні властивості молекул ДНК.

Нуклеїнові кислоти добре розчиняються у воді, практично не розчиняються в органічних розчинниках. Дуже чутливі до дії температури і критичних значень рівня рН. Молекули ДНК з високою молекулярною масою, виділені з природних джерел, здатні фрагментуватися під дією механічних сил, наприклад при перемішуванні розчину. Нуклеїнові кислоти фрагментуються ферментами – нуклеазами.

Конформація

Альтернативні форми подвійної спіралі



Залежно від концентрації іонів і нуклеотидного складу молекули, подвійна спіраль ДНК у живих організмах існує в різних формах. На рисунку (зліва направо) представлені А, В і Z форми.

Рис. 8. Форми молекули ДНК у живих організмах

ДНК може існувати в кількох можливих конформаціях. Зараз ідентифіковані та описані такі: А-ДНК, В-ДНК, С-ДНК, D-ДНК, Е-ДНК, Н-ДНК, L-ДНК, Р-ДНК і Z-ДНК. Проте, тільки А-, В- і Z- форми ДНК спостерігалися в природних біологічних системах. Конформація, яку приймає ДНК, залежить від послідовності ДНК, величини та напрямку суперскрученості, хімічних модифікації основ і концентрації хімічних речовин у розчині, перш за все концентрацій іонів металів і поліамінів. Із всіх конформацій, В-форма, описана вище, є найзагальнішою формою за умов, що властиві більшості клітин. Альтернативні конформації подвійної спіралі відрізняються своєю геометрією та розмірами.

А-форма — ширша правостороння спіраль, з дрібнішою і ширшою малою борозенкою і вужчою та глибшою великою борозенкою. Ця форма зустрічається за нефізіологічними умовами у зневоднених зразках ДНК, крім того вона, ймовірно, зустрічається в живих клітинах у гібридних комплексах ланцюжків ДНК і РНК, та в комплексах ферментної ДНК. Сегменти ДНК із

хімічно зміненими (метильованими) основами можуть проходити через більші конформаційні зміни і приймають Z-форму. Тут, ланцюжки закручуються в ліву подвійну спіраль, на відміну від правої спіралі B-форми. Ці структури можуть розпізнаватися специфічними Z-ДНК зв'язуючими білками і можуть бути залучені до регуляції транскрипції.

Неканонічна H- форма. H-форма ДНК – неканонічна структура в гомопурін-гомопіримідинових ділянках ДНК. На початку 80-х років було виявлено, що гомопурін-гомопіримідинові послідовності в негативно зверх спіралізований ДНК володіють гіпер-чутливістю до ендонуклеаз, специфічно розщеплюючій одноланцюжковій ДНК. Однак ці дані як і дані за хімічною модифікацією не дозволили в той час зробити певних висновків про цю структуру, за рахунок розбіжностей результатів різних авторів. Значне просування у вивченні питання було досягнуто в роботах Франк-Каменецького з співробітниками, які використовували метод двовимірного електрофорезу для дослідження структурних змін в цих ділянках. У роботі Лямічев В.І. та ін, 1986 було показано, насамперед, що в гомопурін-гомопіримідинових ділянках дійсно відбувається утворення неканонічної структури – на електрофореграмі кільцевих ДНК з відповідними вставками спостерігався стрибок рухливості, обумовлений конформаційними змінами в цих ділянках. Утворення цієї структури в топологічному відношенні було еквівалентно розплітання подвійної спіралі або переходу ділянки в хрестоподібну форму – параметр k дорівнював 1 (термодинамічний аналіз утворення неканонічних структур). Було встановлено, що щільність зверхв'язків, при якій відбувається перехід в цю структуру, в сильному ступені залежить від рН розчину.

Денатурація ДНК. Ренатурація ДНК.

Якщо водний розчин ДНК нагріти до 100°C і підвищити рН до 13, то ДНК дисоціює на 2 ланцюга (денатурує), так як комплементарні зв'язки між основами руйнуються. У 1961 році було виявлено, що цей процес є зворотнім: витримання ДНК при температурі 65°C вело до відновлення структури подвійної спіралі. Цей процес називається ренатурація або гібридизація. Процеси гібридизації відбуваються між будь-якими одинарними ланцюгами, якщо вони комплементарні: ДНК - ДНК, РНК - РНК, ДНК - РНК. Для тесту необхідно мати чистий одноланцюговий фрагмент ДНК, комплементарний тій послідовності, яку хочемо виявити. Цей фрагмент отримують або клонуванням, або шляхом хімічного синтезу. Одноланцюгова ДНК, використовувана в якості індикатора, називається ДНК-зонд. Вона може містити від 15 до 1000 нуклеотидів. ДНК-зонди застосовуються в різних цілях. Гібридизація ДНК-зонда з РНК, виділеної з аналізованої клітини, може виявити наявність або відсутність експресії гена. Якщо гібридизації не відбувається, значить ген мовчить, не працює. ДНК-зонди також дозволяють проводити діагностику спадкових хвороб. У більшості випадків мутації, що ведуть до спадкових хвороб, рецесивні, тобто

хвороба розвивається, якщо людина отримує дефектні гени від обох батьків. Аномальні ембріони краще виявляти до народження. Наприклад, для серповидноклітинної анемії у мутантному гені, що кодує бета-ланцюг гемоглобіну, послідовність ГАГ замінена на ГТГ. У цьому випадку синтезують олігонуклеотид довжиною близько 20 основ, мітять радіоактивною міткою. З ембріональних клітин, що містяться в амніотичній рідині, виділяють ДНК і використовують її для гібридизації. Якщо ембріон дефектний, то тест буде позитивним. Аналіз проводять за наступною схемою: досліджувану ДНК гідролізують рестриктазами, фракціонують електрофорезом, переносять розділені фрагменти на нітроцелюлозний фільтр і проводять реакцію гібридизації з міченими олігонуклеотидами. Цей метод був розроблений Саузерном у 1975 році. У вітчизняній літературі його прийнято називати «південний блот». «Блоттинг» - в перекладі з англійської означає «промокашка», «Саузерн» - «південний», в даному випадку гра слів: прізвище вченого перекладається як географічний напрямок.

Конформація, тобто та або інша просторова форма молекул білків, визначається їх первинною структурою. Залежно від хімічної будови і зовнішніх умов молекули білку. можуть знаходитися або в одній або в декількох переважних конформаціях (нативні стани білку, що зазвичай зустрічаються в природних умовах, наприклад, глобулярна будова білків, подвійна спіраль ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота)), або приймати багато більш-менш рівноімовірних конформацій. Білки ділять по просторовій структурі на фібрилярних (ниткоподібні) і глобулярних; білки-ферменти, білки-переносники, імунні і деякі інші мають, як правило, глобулярну структуру. Для ряду білків — гемоглобін, міоглобін, лізоцим, рибонуклеаза і ін. — ця структура встановлена у всіх деталях (з визначенням за допомогою рентгеноструктурного аналізу розташування кожного атома). Вона визначається послідовністю амінокислотних залишків і утворюється та підтримується відносно слабкими взаємодіями між мономерними ланками поліпептидних ланцюгів у водно-сольовому розчині (кулонівські і дипольні сили, водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії), а також дисульфідними зв'язками. Глобула білка формується так, що більшість полярних гідрофільних амінокислотних залишків виявляються зовні і контактують з розчинником, а більшість неполярних (гідрофобних) залишків знаходяться усередині і ізольовано від взаємодії з водою. Молекули білку, що володіють надлишком неполярних груп, коли частина з них виявляється на поверхні глобули, утворюють вищу, так звану. четвертинну структуру, при якій декілька глобул агрегують, взаємодіючи між собою в основному неполярними ділянками (рис. 9). Просторова структура кожного білка-ферменту унікальна і забезпечує необхідне для його функціонування розташування в просторі всіх ланок білків, особливо так званних. активних центрів. В той же час вона не абсолютно жорстка і допускає необхідні в процесі функціонування (при взаємодії з субстратами, інгібіторами та іншими речовинами) конформаційні зрушення і зміни.

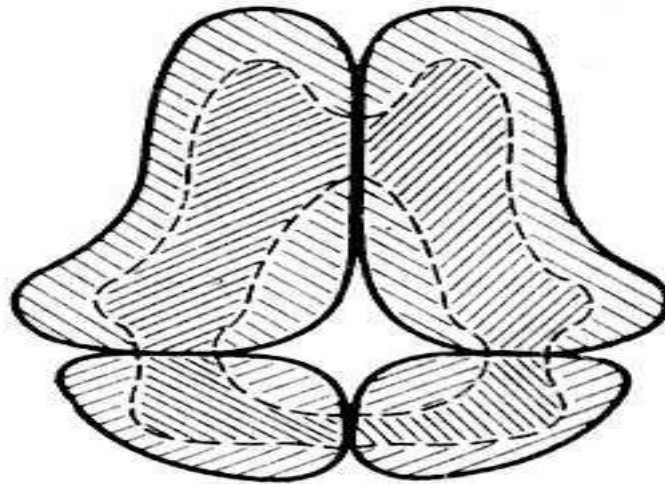


Рис. 9. Четвертинна структура молекул білку

Просторова структура нативної ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) утворена двома нитками комплементу і має подвійну спіраль Крика — Уотсона; у ній протилежні азотисті основи попарно зв'язані водневими зв'язками — аденін з тиміном і гуанін з цитозіном. Стійкість подвійної спіралі забезпечується, поряд з водневими зв'язками, також гідрофобною взаємодією між плоскими кільцями азотистих основ. Нитки РНК (рибонуклеїнова кислота) спіралізують лише частково. ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) вірусів бактеріофагів, бактерій, а також мітохондріальна у ряді випадків є замкнутим кільцем; при цьому поряд із спіраллю Крика — Уотсона спостерігається ще додаткова т.з. надспіралізація.

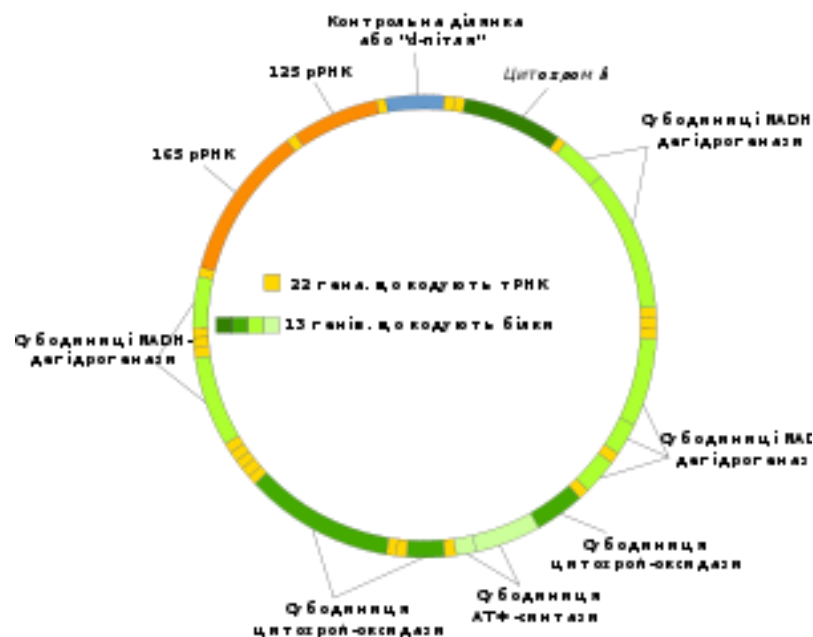


Рис. 10. Схема мітохондріальної ДНК людини

Мітохондріальна ДНК або мтДНК — кільцева молекула ДНК,

локалізована в мітохондріях, цитоплазматичних органелах більшості клітин еукаріотів, що мають вигляд ниткоподібних або гранулярних утворень. Локалізація мтДНК відрізняється від локалізації більшості ДНК еукаріотів, розташованої в ядрах клітин. Часто стверджується, що мітохондріальна ДНК успадковується тільки по материнській лінії, хоча універсальність цього твердження для всіх організмів точно ще не встановлена.

На відміну від більшості генетичних продуктів, закодованих у ядерній ДНК, частина генетичних продуктів мітохондрій кодується її власною ДНК, яка на ранніх стадіях еволюції життя на Землі еволюціонувала окремо від неї. Мітохондріальна ДНК, як і ДНК інших птастид, була отримана клітинами стародавніх еукаріотів від бактерій (у випадку мтДНК — альфа-протеобактерій) в результаті ендосимбіозу. Мітохондріальна ДНК людини складається з 5 — 10 ідентичних копій ДНК що несуть 16 568 пар основ з 37 генами, які зокрема відповідають за біосинтез 13 білків і 22 тРНК. Така коротка нуклеотидна послідовність мтДНК кодує лише незначну частину всіх білків і РНК, що містяться в мітохондріях.

Суперскручення або надспіралізація. Суперскрученість ДНК — топологічна характеристика молекул ДНК. У «розслабленому» стані подвійної спіралі фрагменту ДНК, два ланцюжки, з яких він складається, обертаються навколо осі спіралі один раз на кожні 10,4 пар основ нуклеотидної послідовності ДНК. Проте, такий стан не є звичайним в живих клітинах, оскільки в процесі використання ДНК деякі ферменти додають або прибирають витки. Якщо фрагмент ДНК, кінці якого обернуті один навколо одного, замкнуті у коло, а потім дозволити йому рухатися вільно, кільцева ДНК отримала би нову форму, наприклад форму цифри вісім. Така зміна форми у порівнянні із круговою і є суперскрученістю.

Форма цифри вісім є найпростішим прикладом суперскрученості, і є формою, яку кругова ДНК приймає при додаванні одного витка навколо осі спіралі. Дві частини цифри вісім можуть обертатися або за годинниковою стрілкою, або проти годинникової стрілки одна щодо другої, залежно від того, чи спіраль закручена праворуч (надлишково закручена) або ліворуч (недозакручена). При додаванні кожного додаткового оберту навколо осі спіралі, частини молекули ДНК покажуть на один оберт більше.

Із рис. 11 можна побачити, що існують два типи суперскрученості, які топологічно рівнозначні: обертання ланцюжків в молекулі один навколо одного (Twist) і перехрещення дволанцюжкових молекул (Writhe). Формально суперскрученість є абстрактною математичною властивістю, що представляє собою суму обертів ланцюжків і перехрещень молекули: $S = T + W$.

Додаткові оберти, в порівнянні із звичайним правим обертанням В-форми ДНК, приводять до позитивної суперскрученості, віднімання обертів — до негативної. Багато ферментів-топоізомераз додають або прибирають витки, чим змінюють топологію ДНК.

ДНК більшості організмів мають негативну суперскрученість. Хоча

ДНК багатьох організмів лінійні, вони також негативно суперскручені, зокрема тому, що хромосоми найчастіше дуже великі і обертаються настільки повільно, що для ділянок в центрі здається, що кінці хромосом закріплені. В результаті, вони, можливо, не в змозі поширювати додаткові супервитки на всю хромосому, але центральна частина хромосом може бути так само суперскручена, як і кругові молекули ДНК.

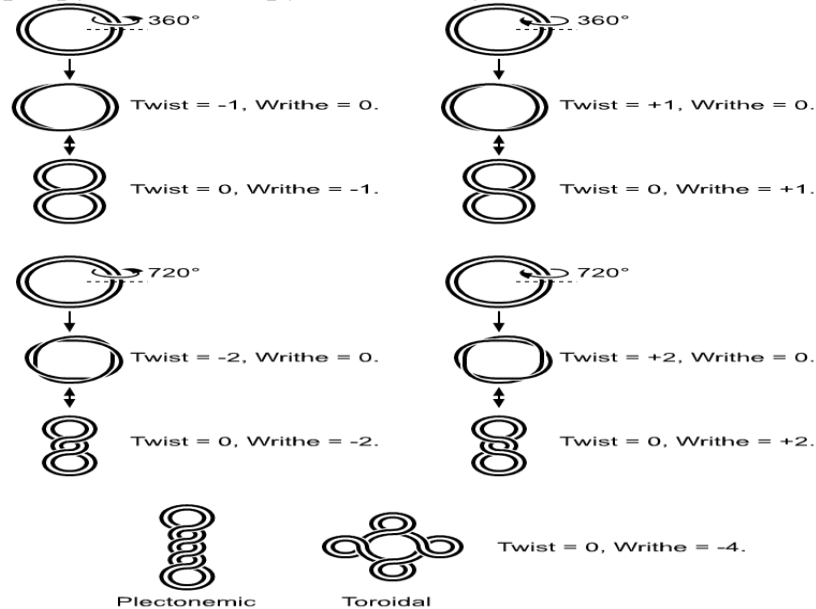


Рис. 11. Типи суперскрученості молекули ДНК

Структура кругової суперскрученої ДНК, з різною кількістю обертів ланцюжків в молекулі (*Twist*) і перехрещень дволанцюжкових молекул (*Writhe*).

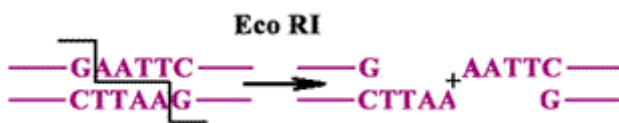
КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Перерахуйте фізичні властивості молекули ДНК.
2. Які існують форми молекули ДНК у живих організмах? Охарактеризуйте ці форми.
3. Що таке денатурація ДНК? Яка суть цього процесу?
4. Що таке ренатурація ДНК? Яка суть цього процесу?
5. Яка просторова структура нативної ДНК?
6. Що таке мітохондріальна ДНК?
7. Що так суперскручення, або надспіралізація?
8. Які існують типи суперскрученості молекули ДНК?

12. Топоізомерази

Топоізомерази – ферменти, що змінюють топологію ДНК. Топоізомерази змінюють число зачеплень одного ланцюга за інший.

Поділяться на два класи: Тип I (*релаксази*) – зменшують число зачеплень. Тип II (*гірази*) – збільшують число зачеплень. Гірази вносять дволанцюговий розрив ДНК за принципом роботи рестриктаз.



рестриктази – ендонуклеази, які впізнають певні послідовності і роблять розрізи у обох ланцюгах.

Після розриву ланцюгів гіраза повертає кінці ДНК на 360° і проявляє лігазну активність, тобто зшиває ланцюги ДНК. У цьому процесі використовується енергія АТФ. Результат діяльності гірази – супервитки.

Суперспіралізована ДНК напружена. При високій напрузі у суперспіралі у деяких місцях ланцюги розходяться, тому розплавляються А-Т багаті ділянки.

Гірази мають відношення і до транскрипції, оскільки при напрузі у молекулі ДНК плавляться А-Т багаті райони промоторів, а паліндроми переходять у форму хреста.

Всі природні кільцеві дволанцюгові ДНК мають негативну суперспіралізацію. Один супервиток припадає на кожні 200 пар нуклеотидів. У релаксаз є тільки ендонуклеазна і лігазна активність, але немає АТФ-азної. Вони розривають тільки один ланцюг. Відбувається розкручування напруженої ДНК, після чого релаксаза зшиває кінці. Релаксаза впізнає певну конформацію суперспіралізованої молекули ДНК і ріже її, скидаючи тим самим зайві супервитки.

Регуляція транскрипції у бактеріальній клітині здійснюється не тільки на рівні білків репресорів (активаторів), але і на рівні активності гіраз і релаксаз.

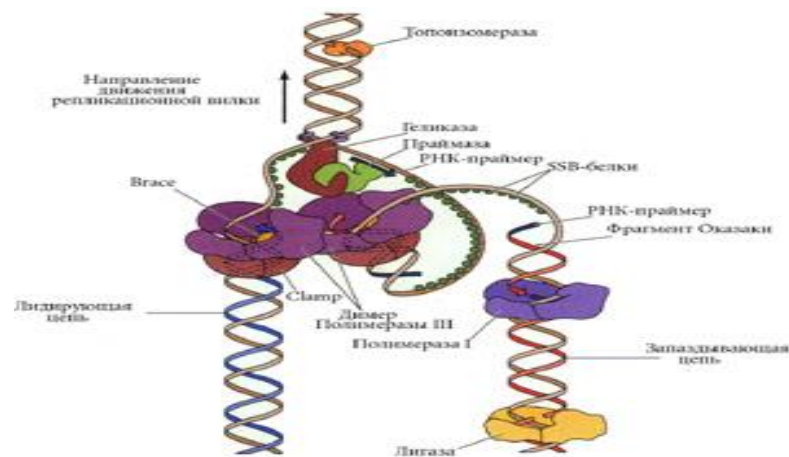


Рис.12. Регуляція транскрипції на рівні активності гіраз і релаксаз

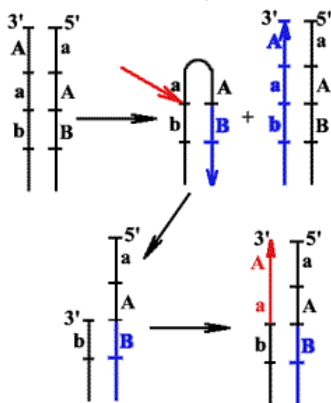
У еукаріотів РНК-затравки розміром 6-10 нукл. видаляються РНК-азою Н (hybrid). Проломи зашпаровуються репаруючими ферментами.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке топоізомерази?
2. Скільки існує класів топоізомераз?
3. В чому полягає різниця між дією гіраз і релаксаз?

13. Проблема реплікації кінців лінійних молекул

Модель «заячі вуха».



Працює у ряді вірусів.

Реплікація кінців ДНК хромосом еукаріотів

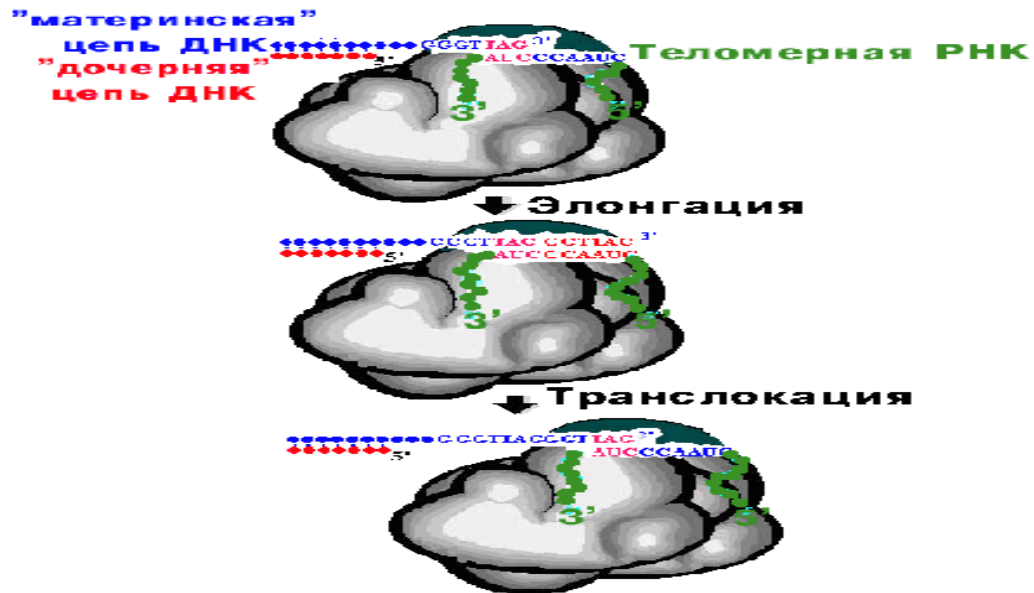
Видалення РНК-праймерів після завершення синтезу лінійних ДНК у вигляді фрагментів Окадзакі і закладення утворюються між фрагментами проломів нуклеотидами ДНК, призводить до того, що дочірні ланцюги ДНК виявляються коротшими материнських на розмір першого РНК-праймера (10-20 нукл.).

Утворюються 3'-оверхенги, тобто виступаючі 3'-кінці материнських ланцюгів. Вони розпізнаються теломеразою – ферментом, що містить крім білкової частини ще і РНК, що виконує роль матриці для нарощування ДНК повторами.

Теломераза послідовно нарощує материнські ланцюги ДНК повторами, використовуючи 3'-оверхенги в якості затравок. Утворені довгі одноланцюжкові кінці, у свою чергу, служать матрицями для синтезу дочірніх ланцюгів традиційним реплікативним механізмом.

Хромосоми соматичних клітин людини фланковані багаторазово повтореними гексамерами ТТАГГГ, загальна довжина районів з повторами може досягати 10 тис. пар нуклеотидів. У комплексі зі специфічними білками такі тандемні повтори утворюють тіломіри, що захищають кінці ДНК від дії екзонуклеаз, що запобігають неправильній рекомбінації і дозволяють кінцям хромосом прикріплюватися до ядерної оболонки.

При кожному раунді реплікації відбувається укорочення тіломер у середньому на 50 пар нуклеотидів. Оскільки тіломерні послідовності не є кодуєчими, вони виступають у ролі буферної зони - як захист від «проблеми кінцевої реплікації».



Вкорочення ДНК у ході кожного раунду реплікації лише скорочує текст тіломери що не транскрибується, але не призводить до втрати смислових послідовностей - генів і регуляторів їх експресії.

Регуляція реплікації прокаріотів відома, так як відомі гени білків регуляції реплікації *E.coli* і механізми їх включення (виключення). Для еукаріотів ці механізми ще не зрозумілі, але відомий розклад реплікації ДНК по різним хромосомам.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Як відбувається реплікація кінців молекули ДНК хромосом еукаріотів?
2. Що відбувається при кожному раунді реплікації?

14. Реплікація ДНК

Реплікація ДНК – процес, що здійснюється комплексом ферментів і білків, які виконують топологічну функцію, суть якої в утворенні ідентичних копій ДНК для передачі генетичної інформації у поколіннях клітин та організмів.

Гіпотези реплікації ДНК

Після того, як було встановлено, що ДНК утворюється шляхом побудови на існуючій молекулі нових ланцюгів, виникло питання яким чином відбувається подвоєння вихідної молекули? Були висунуті три гіпотетичних механізми реплікації.

- Консервативний механізм — при такому способі розкручування спіралі не відбувається, існуюча подвійна спіраль є матрицею для синтезу двох нових ланцюгів. Нова спіраль будується повністю з нового матеріалу, існуюча спіраль залишається незмінною.
- Напівконсервативний механізм — існуюча спіраль розкручується, на кожному полінуклеотидному ланцюзі комплементарно будується новий. Таким чином нова подвійна спіраль є «гібридом» старого та нового ланцюгів
- Дисперсивний механізм — існуюча спіраль розривається на кожному півоберті шляхом багаторазової фрагментації. Синтез нових ланцюгів проходить на фрагментах, які потім хрест-навхрест зливаються з відрізками нового матеріалу. Кожний полінуклеотидний ланцюг складається з відрізків старого та нового матеріалу, які чергуються.

З метою з'ясування, який механізм є дійсним? Меселсон та Сталь провели експерименти з міченою ДНК, яка містила у своєму складі важкий ізоотоп азоту. В результаті дослідження вдалося виявити, що ДНК синтезується за напівконсервативним механізмом.

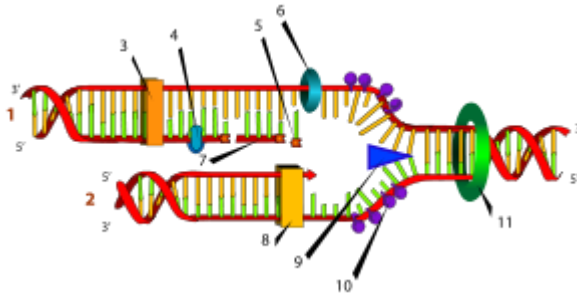


Рис.13. Молекулярний механізм реплікації дволанцюгової ДНК

1 – ланцюг, що відстає, 2 – ланцюг-лідер, 3 – ДНК-полімераза (Pol α), 4 – ДНК лігаза, 5 – РНК-праймер, 6 – ДНК-праймаза, 7 – фрагмент Окадзакі, 8 – ДНК-полімераза (Pol δ), 9 – хеліказа, 10 – одиночний ланцюг зі зв'язаними білками, 11 – топоізомераза.

Реплікація — складний багатоетапний процес, в якому беруть участь багато ферментів, він потребує багато часу та великих енергетичних витрат клітини. Процес починається з того, що фермент топоізомераза випрямляє закручену у спіраль молекулу ДНК та до неї приєднуються білки, які не дають молекулі знову згорнутись. Фермент хеліказа розриває водневі зв'язки

між азотистими основами, внаслідок чого ділянка подвійної молекули ДНК розпадається на два ланцюги, утворюється так звана «виделка реплікації». До ланцюга приєднується ДНК-праймаза — фермент який розпочинає синтез ДНК — власне реплікацію. Вона синтезує праймер — послідовність нуклеотидів від якого наступний фермент — ДНК-полімераза будує новий ланцюг, використовуючи наявний як матрицю. Праймером слугує фрагмент РНК, він потрібний, тому що ніяка ДНК-полімераза не може почати синтез нового ланцюжка «з нуля», а може тільки додати нуклеотиди до існуючого ланцюжка. Коли праймер виконав свою функцію, він видаляється екзонуклеазою, а інша полімераза «забудовує» пусте місце, яке виникло. Також ДНК-полімераза здатна виправляти можливі помилки реплікації та перевіряти комплементарність. Синтез нових ланцюгів відбувається асиметрично, тобто один з них синтезується безперервно, по ходу роз'єднання молекули ДНК хеліказою, інший ланцюг будується в протилежному напрямку — проти напрямку дії хелікази, тому відбувається короткими фрагментами, довжиною 1000 -2000 нуклеотидів, які називаються фрагменти Окадзакі, на честь японського вченого що їх відкрив. Фрагменти Окадзакі з'єднує між собою фермент ДНК-лігаза. Таким чином, з однієї молекули ДНК утворюються дві ідентичні, які після закінчення процесу реплікації спіралізуються.

У еукаріот реплікація відбувається перед поділом клітини, у прокаріот — протягом всього життєвого циклу.

Інші механізми реплікації

Реплікація у вірусів, що мають одноланцюгову ДНК має особливості. В клітині хазяїна на такій молекулі, яку називають (+)-ланцюгом синтезується комплементарний йому (-)-ланцюг, таким чином утворюється дволанцюгова молекула ДНК. (-)-ланцюг потім слугує матрицею для синтезу нових (+)-ланцюгів, які вбудовуються у вірусні частинки. В процесі беруть участь ферменти вірусів та ферменти клітини-хазяїна.

Реплікація РНК відбувається у організмів, геном який кодує ця нуклеїнова кислота — це деякі типи вірусів та віроїди. Процес відбувається в клітинах хазяїна, які були інфіковані цими організмами. При цьому також синтезуються (-)-ланцюги та РНК проходить дволанцюгову стадію.

Принципи реплікації

1. Комлементарність.
2. Антипаралельність.
3. Уніполярність.
4. Потреба у затравці.
5. Уривчастість.
6. Напівконсервативність.

Перші три принципи можна сформулювати у одній фразі: синтез кожного дочірнього ланцюга ДНК йде комплементарно і антипаралельно матричного ланцюга і завжди у напрямку $5' \rightarrow 3'$.

Доказ напівконсервативного характеру реплікації

Для з'ясування питання про характер розбіжності ланцюгів по дочірнім молекулам Метт Мезельсон і Френк Сталь у 1958 р. розробили метод рівноважного центрифугування у градієнті щільності CsCl. Внаслідок чого ДНК розділяється не по молекулярній вазі, а по питомій щільності.

Е. солі вирощували протягом кількох поколінь на середовищі, що містить важкий ізотоп азоту (N_{15}), для того, щоб вся ДНК була «важкою». Перед черговим раундом поділу клітини синхронізували. При цьому у середовищі замінювали N_{15} на легкий ізотоп N_{14} з тим, щоб знову синтезовані ланцюги були «легкими». Після реплікації ДНК виділяли і центрифугували у градієнті щільності CsCl.

Напівконсервативність означає, що кожна дочірня ДНК складається з одного матричного ланцюга і нового, синтезованого.

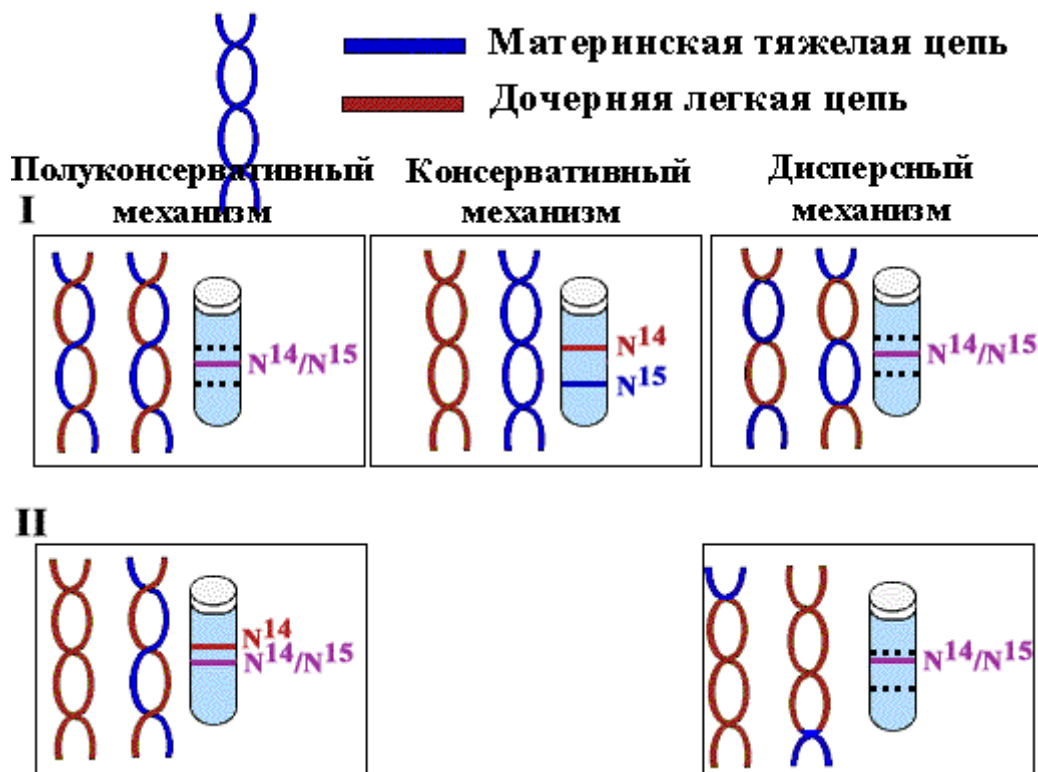
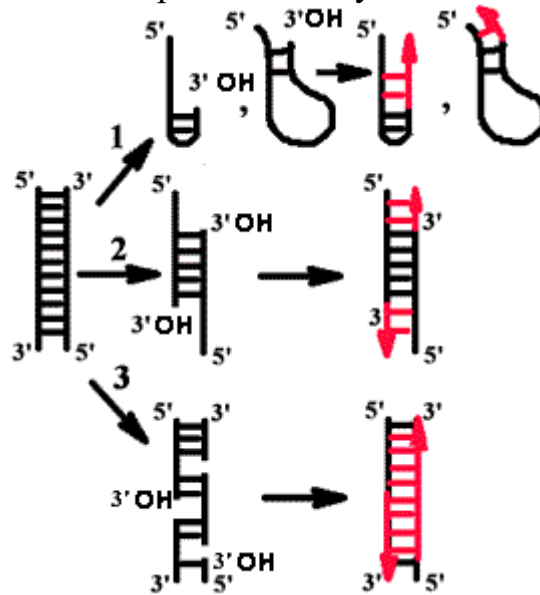


Рис. 14. Гіпотези реплікації ДНК

Рівний розподіл «важких» і «легких» ланцюгів між усіма молекулами виключав можливість консервативного способу, згідно з яким одна дочірня клітина отримує материнську ДНК, а інша - знову синтезовану, обидві ланцюги якої є новими.

Клітини другого покоління містили повністю як «легкі» молекули, так і «гібридні», що складаються з одного «легкого» і одного «важкого» ланцюга, аналогічні молекулам першого покоління. Цей факт виключав можливість дисперсного механізму, згідно якому шматки материнської ДНК випадковим чином розподіляються між дочірніми молекулами.

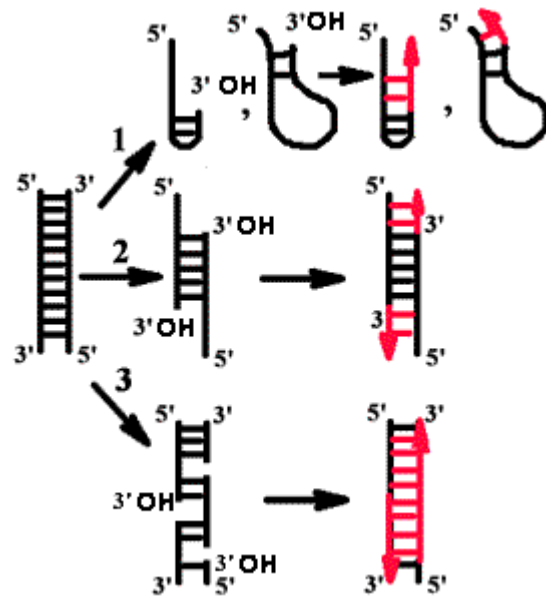


КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке реплікація ДНК?
2. Перерахуйте три гіпотетичні механізми реплікації ДНК.
3. В чому полягає суть консервативного механізму реплікації ДНК?
4. В чому полягає суть напівконсервативного механізму реплікації ДНК?
5. В чому полягає суть дисперсивного механізму реплікації ДНК?
6. Який механізм реплікації ДНК є дійсним за Месельсон і Сталь?
7. З чого починається процес реплікації?
8. Що таке фрагменти Окадзакі?
9. Коли відбувається реплікація у еукаріот і прокаріот?
10. Принципи реплікації.
11. Доказ напівконсервативного характеру реплікації ДНК.

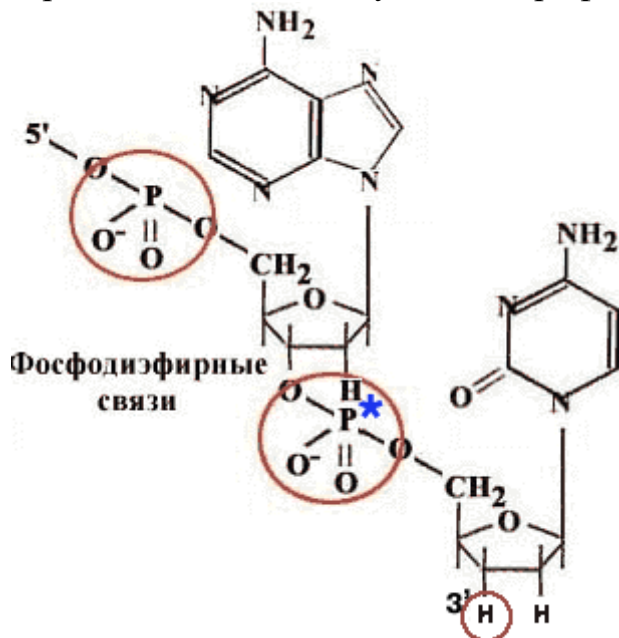
15. Поняття про матрицю і затравку

Продукти, що утворюються у ферментативній системі *in vitro*.



У всіх випадках матрицею для синтезу нових ланцюгів служить одноланцюжкова ДНК. Затравкою є 3'-гідроксильний кінець дволанцюгової ДНК, причому він повинен бути спарений з матрицею. У тому випадку, якщо ендонуклеаза вносила нікі з 3'-фосфатним кінцем, ДНК не була активованою.

Прямим доказом того, що затравка - 3'-гідроксильний кінець, є експеримент з дидезоксинуклеозидтрифосфатом.



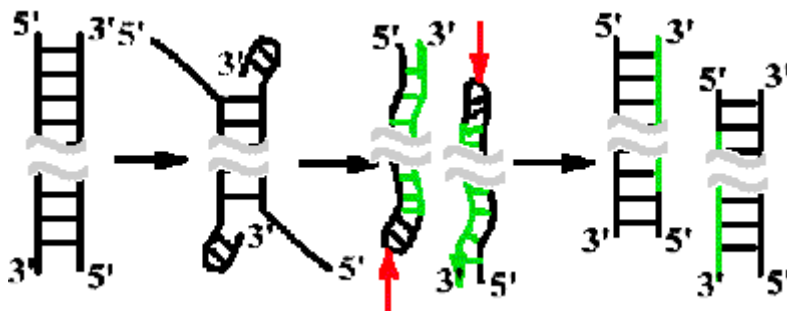
Якщо такий активований нуклеотид зробити міченим по α -фосфату, то він включається у зростаючий полімерний ланцюг і завжди виявляється на його 3'-кінці. Це говорить про те, що він сам включається, але подальше зростання ланцюга неможливе, тому що немає 3'-гідроксильного кінця.

Це також доводить і уніполярність реплікації у напрямку $5' \rightarrow 3'$.



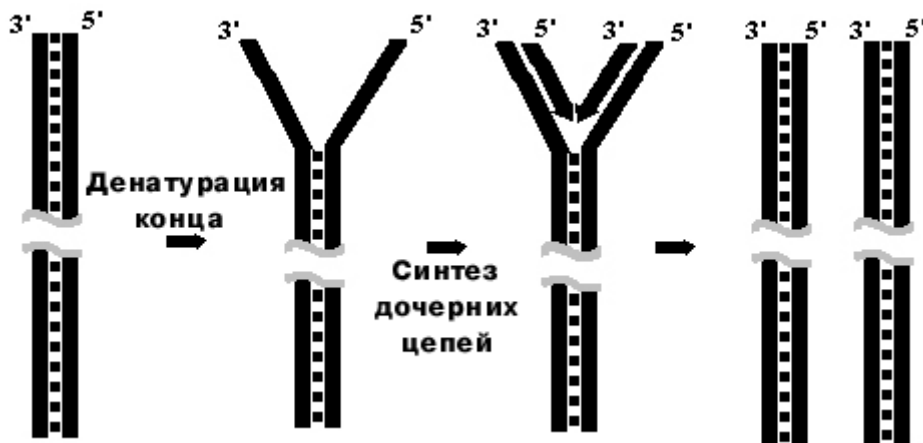
Схема непрерывной антипараллельной репликации *in vivo* за Корнбергом

1960 р. Гипотетична модель.

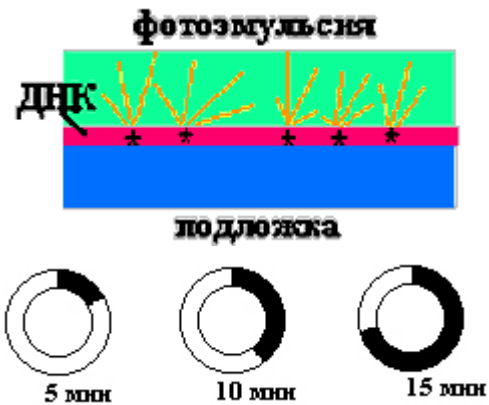


Суть припущення: невідомий фактор денатурує кінці лінійної молекули, 3'-ОН-кінці загинаються і служать затравками для роботи ДНК-полімерази. Фермент здійснює денатурацію матричної ДНК по мірі просування та синтезу дочірніх ланцюгів. На виході - дочірні молекули, які коротші на загнутий кінець, тому ендонуклеаза вносить розрив у материнський ланцюг.

Схема непрерывной параллельной репликации Джона Кернса



1963 р. Авторадіографія



Бактерії вирощувалися на середовищі з радіоактивним НЗ-тимідином протягом 5-ти, 10-ти, 15-ти хв., Після чого проводили авторадіографію.

Ширина смуг засвічення відповідала двом міченим ниткам ДНК (якщо позначений один ланцюг, то смуга виходить вужчою). У моделі допускалося наявність ферменту, здатного вести синтез у напрямку $3' \rightarrow 5'$. Такий фермент не знайдений і сьогодні.

Дана модель невірна, проте, вона спонукала шукати нові ДНК-полімерази і у *E. coli* були знайдені ще дві: **II і III**.

Порівняльні характеристики ДНК-полімераз *E. coli*

Функція	ДНК-полімераза I	ДНК-полімераза II	ДНК-полімераза III
Полімеризація у напрямі $5' \rightarrow 3'$	+	+	+
Гідролітична активність $3' \rightarrow 5'$	+	+	+
Гідролітична активність $5' \rightarrow 3'$	+	-	-
<i>Потреба у матриці - затравці:</i>			
Нативна дволанцюгова ДНК	-	-	-
Одноланцюгова ДНК з олігонуклеотидною затравкою	+	-	-
2-х ланцюгова ДНК з ніком	+	-	-
або з пробілом менше 100 нуклеотидов	+	+	+
або з пропуском більше 100 нуклеотидів	+	-	-
Оптимальна концентрація КСІ	Активність		
20мМ	60%	60%	100%
50мМ	80%	100%	50%
100мМ	100%	70%	10%
150мМ	80%	50%	0%
Вплив 10% етанолу	40%	45%	200%
Молекулярна вага (кДа)	109	120	субодинич.склад
Число обертів, приймаючи за одиницю 667 нукл / хв.	1	0,05	15
Кількість молекул на клітину	250	100	20

До реплікації мають відношення полімерази I і III. Причому саме

полімераза III є репліказою, тобто вона синтезує *in vivo* нові ланцюги ДНК. Участь ДНК-полімерази I є необхідною. У неї допоміжна, репаративна функція. ДНК-полімераза II має відношення лише до репарації.

Схема переривчастої антипаралельної реплікації Рейджі Окадзакі

1968 р. всі дані Корнберга, отримані у ферментативній системі *in vitro*, і «картинки» Кернса вірні (але картинки неправильно інтерпретовані).

Окадзакі спеціально розробив два нових методи дослідження:

1. **Метод імпульсного мічення.** До Окадзакі мітку давали у культуральне середовище і швидко починали відмивати клітини, але мінімальний час подачі мітки був 5 хв. Окадзакі через потрібний момент часу після додавання міченого тимідину, давав 1000-кратний надлишок холодного (неміченого) тимідину. Таким чином, мітка включається тільки протягом дуже короткого часу. Окадзакі вважав, що час Кернса (5 хв.) є дуже великим для отримання справжньої картини того, що відбувається при реплікації.

2. **Центрифугування у лужному градієнті сахарози.** Сахароза розлучається на луги. У лужному середовищі відбувається денатурація ДНК. У цьому випадку короткі фрагменти ДНК, якщо вони є, відокремлюються від довгих. Після цього їх можна виявити при центрифугуванні у градієнті щільності сахарози, який розділяє молекули по молекулярній вазі.

Окадзакі припустив, що синтез ДНК йде короткими фрагментами і що короткі фрагменти повинні зшиватися. Зшиваються вони лігазою. ДНК-лігаза була виявлена як у прокариотів, так і у еукаріотів. У *E. coli* були знайдені мутанти по лігазі.

Окадзакі провів експеримент на бактеріях, заражених фагом T4, у якого є своя термочутлива лігаза, яка працює при 20 °C і не працює при 43 °C. Якщо у клітину потрапляє фагова ДНК, то клітина перемикається на реплікацію ДНК фага. Клітини заражали фагом T4, давали імпульсну мітку H_3 -тимідин і вирощували при двох температурах: 20 °C і 43 °C. Потім проводили центрифугування у лужному градієнті сахарози.

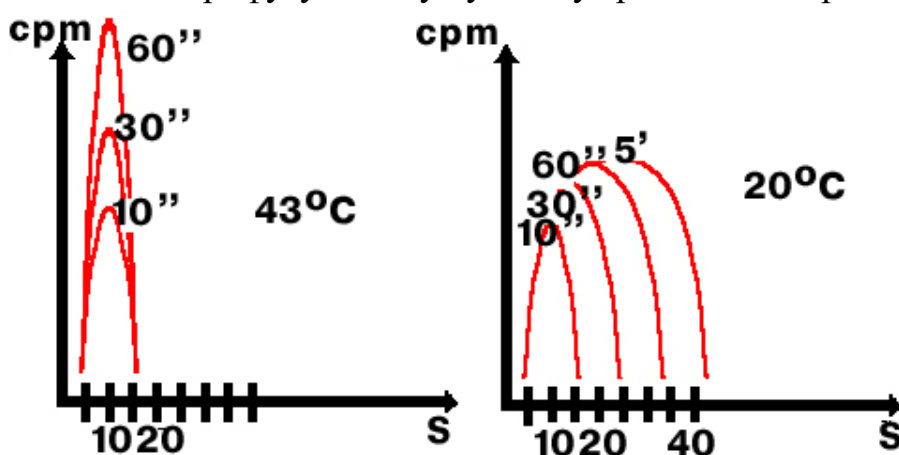
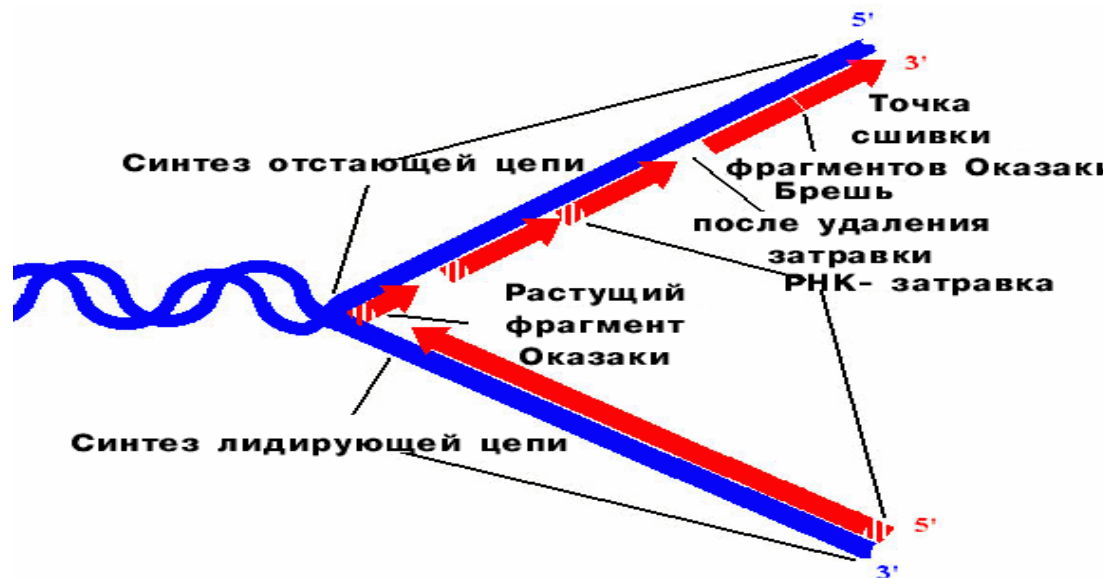


Рис. 15. Експеримент на бактеріях

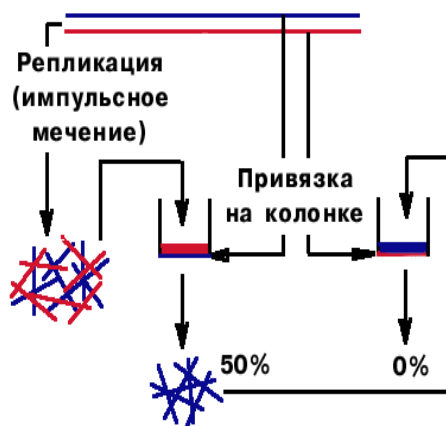
Лігаза *E. coli* потребує коферментів НАД, а лігаза фага - у АТФ. Якщо *E. coli* не давати нікотинову кислоту (попередник НАД), бактеріальна ДНК реплікується, але не зшивається.

Уривчастість реплікації показана для всіх об'єктів, крім фагів, що містять одноланцюжкову ДНК.

У деяких фагів і вірусів переривчастий синтез йде по обох ланцюгах. У бактерій і вищих організмів один ланцюг утворюється безперервно, а інший - уривчасто (лідуючий і запізнений ланцюги).

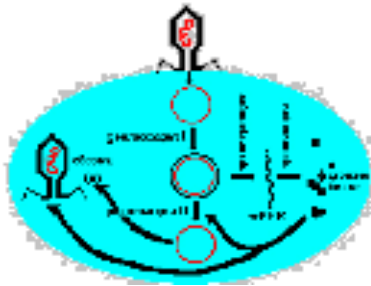


Розмір фрагментів Оказакі видоспецифічний і становить для фагів 1000-2000 нукл., *E. coli* - 1000 нукл., для еукаріотів - 200-400 нукл.



У фага T7 обидва ланцюга ДНК теж реплікуються уривчасто. Вони мають різну щільність (у одного більше пуринів). Ланцюги були розділені у градієнті щільності CsCl і поміщені на дві колонки. Була здійснена ковалентна прив'язка, тому вони не могли зійти зі смоли. Потім провели реплікацію у умовах імпульсного мічення. Пропустили всі фрагменти через першу колонку. Вихід був 50%. Решта прогнали через другу колонку. Виходу не було. Таким чином, було показано, що фрагменти комплементарні обом матричним ланцюгам. Значить, фрагменти утворюються по обох ланцюгах.

Схема розмноження фага М13



1974 р. Окадзакі.

Рифампіцин - інгібітор бактеріальної РНК-полімерази (на стадії ініціації).

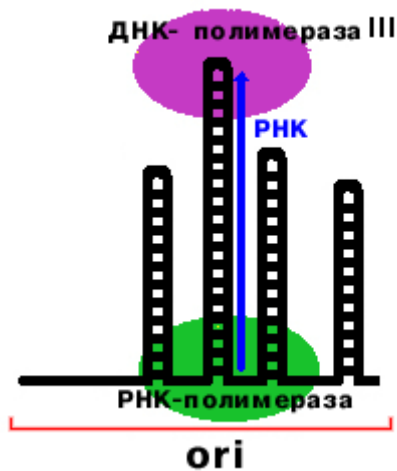
Хлорамфенікол - інгібітор трансляції на бактеріальних рибосомах.

Якщо одночасно із зараженням *E. coli* фагом, додати хлорамфенікол, то блокуються трансляція, реплікація II і збірка фагів.

Якщо подіяти рифампіцином, то блокується не тільки транскрипція і всі наступні процеси, але і реплікація I.

Висновок: бактеріальна РНК-полімераза бере участь у реплікації ДНК фага. Вся фагова ДНК складає ~ 6000 нукл.

origin (ori) - район початку реплікації.



В районі *ori* (початок реплікації) є 4 шпильки. Ці шпильки розпізнаються РНК-полімеразою, і друга шпилька використовується у якості матриці. У міру утворення РНК шпилька плавиться. Утворюється РНК-затравка довжиною 24 нукл., 3'-кінець якої використовується ДНК полімеразою III.

Коли 3'-кінець ланцюга ДНК що синтезується «втикається» у 5'-кінець РНК-затравки, ДНК-полімераза III витісняється ДНК-полімеразою I, яка, володіючи 5' → 3' гідролітичною активністю, «з'їдає» РНК-затравку, одночасно продовжуючи синтез ДНК. Коли затравка (РНК) з'їдена, ДНК-полімераза I витісняється лігазою, яка зшиває кінці ДНК.



Всі ці ферменти (ДНК-полімераза III, ДНК-полімераза I, лігаза) входять

до складу *реплісоми*. Вони представляють єдиний білковий комплекс, який реагує зміною конформації на виконання чергової функції.

Протяжна (більше 100 нукл.) одноланцюжкова ДНК-матриця може бути використана ДНК полімеразою III, коли полімераза III представлена у формі *holo-ферменту*. Крім субодиниці α , що володіє полімеразною активністю, у *holo-фермент* входить ще кілька субодиниць, що забезпечують високу процесивність синтезу ДНК.

Фаг Φ X174. Реплікація ДНК цього фага не залежить від рифампіцину. Тут працює не звичайна РНК-полімераза, а особливий фермент - *праймаза*. Він вміє робити тільки РНК-затравку. Праймаза потребує додаткові фактори - білки препраймінга. Точно так само (за допомогою праймази і білків препраймінга) утворюються РНК-затравки при реплікації ДНК *E. coli*.



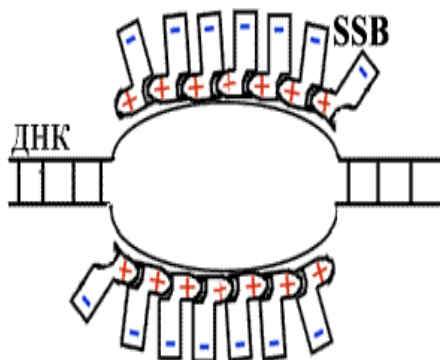
Праймосома - це білки препраймінгу і праймаза.

Білки рухаються по матричному ланцюгу ДНК в $5' \rightarrow 3'$ напрямі, праймаза - у протилежному, синтезуючи РНК-затравки у організованих за допомогою білків препраймінгу ділянках ДНК на відстані ~ 1000 нукл. один від одного.

Топологічні проблеми реплікації ДНК

Білки Альбертса, виявлені у 1968 р., знижують температуру плавлення ДНК *in vitro* на 20-40 °С. Вони зв'язуються з ДНК електростатично, хоча мають негативний заряд. Ці білки містять кластер позитивно заряджених амінокислотних залишків, але загальний заряд білка від'ємний. У них підвищена спорідненість до одноланцюгової ДНК. Білок не зв'язується з дволанцюговою ДНК, яка не має розплавлених ділянок.

Але якщо є одноланцюжкова ДНК, то білки легко сідають на неї, випрямляють її, перетворюючи ДНК у «палицю». Білки зв'язуються з дволанцюговою ДНК, якщо у ній є порушення вторинної структури.



Коли у ДНК утворюється розплавлена ділянка, білок покриває його за рахунок електростатичних взаємодій. При цьому виявляється спорідненість білків один до одного. Вони покривають ДНК суцільним шаром (стехіометрична кількість білку).

Білки, що сидять на комплементарних ланцюгах, **не** дають ланцюгам зхлопнутися, **тому** мають потужний негативний заряд. Називаються ці білки **SSB (single strand bind)**. Вони не денатурують ДНК, а лише фіксують одноланцюговий стан.

Участь SSB у реплікації абсолютно необхідна. Вони утримують матричні ланцюги ДНК у реплікативній вилці у одноланцюговому стані, а також захищають одноланцюжкові ДНК від дії нуклеаз. Вони вибірково стимулюють роботу ДНК-полімерази. РНК-полімераза не може використовувати одноланцюжкову ДНК, покриту SSB. Вибірковість стосується і виду. Наприклад, SSB фага T4 стимулює ДНК-полімеразу фага T4, але не ДНК-полімерази E. coli. **SSB не ферменти - вони потрібні у стехіометричній кількості.**

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що слугує матрицею для синтезу нових ланцюгів?
2. Що є затравкою?
3. В чому полягає суть експерименту з дидезоксинуклеозидтрифосфатом?
4. В чому полягає суть бактеріальної антипаралельної реплікації in vivo за Корнбергом?
5. В чому полягає суть безперервної паралельної реплікації за Джоном Кернсом?
6. Які існують методи досліджень за Р. Окадзакі? В чому полягає їх суть?
7. Що таке рифампіцин та хлорамфенікол?
8. Топологічні проблеми реплікації ДНК.

16. ДНК - Полімерази

ДНК-полімераза — це фермент, що бере участь у реплікації ДНК. Ферменти цього класу каталізують полімеризацію дезоксирибонуклеотидів уздовж ланцюжка ДНК, який фермент «зчитує» і використовує як шаблон. Тип нового нуклеотиду визначається за принципом комплементарності до шаблону, з якого ведеться зчитування. Молекула ДНК, що синтезується, є комплементарна до шаблонного ланцюжка і ідентична до другої компоненти подвійної спіралі.

Розрізняють ДНК-залежну ДНК-полімеразу, що використовує як матрицю один з ланцюжків ДНК, і РНК-залежну ДНК-полімеразу (інша назва — зворотна транскриптаза), здатну до зчитування інформації з РНК (зворотна транскрипція). ДНК-полімераза є голоферментом, оскільки для нормального функціонування вона потребує присутності іонів магнію як кофактора. При відсутності іонів магнію про неї можна говорити як про апофермент.

ДНК-полімераза I *E. coli*: роль у синтезі ДНК і РНК

ДНК-полімераза I *E. coli* складається з одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою близько 109 кДа і володіє трьома активностями: полімеризується в напрямку 5' → 3', 5' → 3'-екзонуклеазної і 3' → 5'-екзонуклеазної. Великий фрагмент ДНК-полімерази I *E. coli* (фрагмент Кленова) є частиною поліпептидного ланцюга ДНК-полімерази I з молекулярною масою близько 76 кДа, у якої відсутній домен, відповідний 5' → 3'-екзонуклеазі. Як ДНК-полімераза I, так і її фрагмент використовуються для введення радіоактивно мічених дезоксирибонуклеотидів в синтезовані ланцюги ДНК шляхом нік-трансляції, тобто переміщення одноланцюжкового розриву уздовж молекули дволанцюжкової ДНК, в якому 3'-ОН-кінець використовується в якості затравки для ферментів. При цьому ДНК-полімераза I прокладає собі шлях за допомогою 5' → 3'-екзонуклеази, а фрагмент Кленова витісняє ланцюг ДНК з 5'-кінця. Крім того, фрагмент Кленова використовують для синтезу другого ланцюга кДНК, секвенування ДНК за методом Сенгера, заповнення 5'-виступаючих «липких» кінців ДНК з утворенням «тупих» кінців, введення кінцевої радіоактивної мітки, а також для видалення 3'-виступаючих кінців рестрикційних фрагментів ДНК 3' → 5'-екзонуклеазою цього ферменту.

ДНК-полімераза II (також відома як ДНК Пол II і Pol II) є прокаріотичною ДНК-полімеразою, яка швидше за все, бере участь у репарації ДНК ферменту розміром 90 кДа в і кодується геном *polB*. ДНК-Pol II може синтезувати нові базові пари ДНК в середньому від 40 до 50 нуклеотидів / сек.

Штами з відсутнім геном не виказують дефекту росту або реплікації. Синтез Pol II індукується під час стаціонарної фази росту клітин. Це етап, на якому відбувається повільний ріст і синтез ДНК. Це також фаза, в якій ДНК може накопичувати пошкодження, такі як короткі прогалини, які діють як блок ДНК Pol III. У цих умовах Pol II допомагає подолати проблеми, тому що він може відновити синтез ДНК осторонь від прогалин. Pol II має низький рівень помилок, але є занадто повільною, щоб використовуватися при нормальному синтезі ДНК. Pol II відрізняється від Pol I в тому, що їй не вистачає 5' → 3'-екзонуклеазної діяльності, і вона не може використовувати нікований дуплексний шаблон.

Голофермент ДНК полімераза III (скорочено Pol III) — головний комплекс ферментів, залучений у реплікацію ДНК прокаріотами. Знайдений Томасом Біллом Корнбергом і Малкольмом Гефтером в 1970 році. Комплекс має високу процесивність (число нуклеотидів, що додаються за подію зв'язування) і, згідно з даними отриманими для бактерії *E. coli*, працює в комплексі з чотирма іншими ДНК-полімеразами (Pol I, Pol II, Pol IV і Pol V). Це основна полімераза, залучена в реплікації ДНК, і також має здатність до корекції помилок реплікації, за допомогою своєї екзонуклеазної активності в 3' → 5' напрямку. ДНК полімераза III — компонент реплісоми, розташованої в

реплікаційній вилці.

Компоненти полімерази III. 2 ДНК-Pol III ферменти, кожен з яких містить α , ϵ і θ субодиниці. α субодиниця має полімераза активність. ϵ субодиниця має 3'→5' екзонуклеазну активність. θ субодиниця стимулює ϵ підрозділи коректури. 2 β одиниці, які виступають в якості ковзних затискачів ДНК, утримують полімераза прив'язаною до ДНК. 2 τ одиниці які діють димеризуючи два основних ферменти (α , ϵ і θ субодиниці). 1 γ субодиниця, яка діє як затискач і завантажувач для відстаючих фрагментів Окадзакі, допомагаючи двом β субодиницям утворювати єдине ціле і зв'язатися з ДНК.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке ДНК-полімераза?
2. Які існують види ДНК-полімераз?
3. Характеристика ДНК-полімерази I та її роль у синтезі ДНК і РНК?
4. Характеристика ДНК-полімерази II?
5. Характеристика голоферменту ДНК-полімерази III?

17. Мутації.

Мутації — зміни генетичного матеріалу (звичайно ДНК або РНК). Мутації можуть бути викликані помилками копіювання генетичного матеріалу протягом поділу клітини, опроміненням жорсткою радіацією, хімічними речовинами (мутагенами), вірусами або можуть відбуватися свідомо під клітинним контролем за рахунок таких процесів як, наприклад, мейоз або гіпермутація. У багатоклітинних організмах мутації можуть бути підрозділені на генеративні мутації, які можуть бути передані нащадкам, і соматичні мутації. Соматичні мутації не можуть передаватися до нащадків у тварин. Рослини іноді можуть передавати соматичні мутації своїм нащадкам безстатеві або статеві (у випадку, коли брунька розвивається в соматично зміненій частині рослини).

Мутації розглядаються як рушійна сила еволюції, де менш сприятливі (або шкідливі) мутації видаляються з генофонду природним відбором, тоді як сприятливі (корисні) прагнуть накопичуватися. Нейтральні мутації визначаються як мутації, ефекти яких не впливають на виживання видів або індивідуумів, що складають види. Вони також можуть накопичуватися. Переважна більшість мутацій не мають ніякого ефекту, тому що механізми репарації ДНК (ремонт ДНК) можуть виправити більшість змін перед тим, як вони стануть постійними мутаціями, і багато організмів мають механізми для усунення інакше постійно видозмінених соматичних клітин.

Мутації були відкриті де Фрізом в 1900 р., спостерігаючи за мінливістю енотери (*Oenothera*).

Класифікація мутацій

I. За ефектом на структуру

Послідовність ДНК гена може бути змінена безліччю шляхів. Генетичні мутації мають різні ефекти на стан здоров'я залежно від того, де вони відбуваються і чи змінюють вони функцію важливих білків. Структурно, мутації можуть бути класифіковані, як:

1. Невеликі мутації, що охоплюють один або декілька нуклеотидів, зокрема:

- **Точкові мутації**, часто викликані хімічними речовинами або помилками при реплікації ДНК, представляють собою заміну одного нуклеотиду іншим. Найбільш розповсюджені — заміна пурину на пурин ($A \leftrightarrow G$) або піримідину на піримідин ($C \leftrightarrow T$). Така заміна може бути викликана азотистою кислотою, помилкою спарювання основ або мутагенними аналогами основ, наприклад, 5-бромо-2-дезоксидурином (BrdU). Менш загальний випадок — *трансверсія*, або заміна пурину на піримідин або піримідину на пурин ($C/T \leftrightarrow A/G$). Точкова мутація може бути нейтралізована іншою точковою мутацією, в якій нуклеотид змінюється назад до свого оригінального стану (*дійсна реверсія*) або додатковою мутацією де-небудь у іншому місці, яка приводить до відновлення функціональності гена (*додаткова реверсія*). Такі зміни класифікуються як *переходи* або *трансверсії*. Приклад трансверсії — аденін, що перетворюється на цитозин. Точкові мутації, які відбуваються в межах області гена що кодує білки, можуть бути класифіковані на три види, залежно від того, для чого використовуються помилкові кодони:

А) **Безмовні мутації**: які кодують ту ж саму амінокислоту.

Б) **Міссенс-мутації**: які кодують іншу амінокислоту.

В) **Нонсенс-мутації**: які кодують код зупинки (стоп-кодон) трансляції білка.

- **Вставки** додають один або більше нуклеотидів до ДНК. Вони звичайно викликані мобільними генетичними елементами, або помилками протягом копіювання елементів, що повторюються (наприклад АТ повторення). Вставки в кодуючі області гена можуть змінювати сплайсинг мРНК або викликати «зміщення рамки» (англ. *frameshift*), обидва типи мутацій можуть значно змінити продукт гена. Вставки можуть бути звернені делецією мобільного генетичного елемента.

- **Делеції** видаляють один або більше нуклеотидів із ДНК. Подібно до вставок, ці мутації можуть викликати «зміщення рамки» гена. Вони незворотні.

2. Великі мутації в хромосомній структурі, зокрема:

- **Ампліфікації** (або дублювання гена) приводять до створення багатьох копій хромосомних областей, збільшуючи дозування генів, розміщених в їхніх межах.

- **Делеції** великих хромосомних областей приводять до втрати генів в межах цих областей. Мутації, ефект яких — зіставити разом окремі шматки ДНК, що може привести до створення гібридних генів з новою функціональністю (наприклад bcr-abl). Вони включають:
 - А) Хромосомні транслокації**: обмін частинами генів між негомологічними хромосомами.
 - Б) Інтерстиціальні (проміжні) делеції**: видалення областей ДНК з єдиної хромосоми, таким чином сполучаючи наперед віддалені гени.
 - В) Хромосомні інверсії**: зміна орієнтації хромосомного сегменту.
- **Втрата гетерозиготності**: втрата одного аллелю, шляхом делеції або рекомбінації, в організмах які перед тим мали два.

II. За ефектом на функції

Мутації втрати функції приводять до створення гена, що має зменшену або немає функції. Коли аллель має повну втрату функції (нульовий аллель), така мутація часто називається аморфною мутацією. Фенотипи, пов'язані з такими мутаціями, частіше всього рецесивні, але є винятки — коли організм гаплоїдний або коли зменшене дозування продукту гена мало для підтримання нормального фенотипу (гаплонедостатність).

Мутації отримання функції замінюють продукт гена таким чином що він набуває нової аномальної функції. Такі мутації звичайно мають домінантний фенотип.

Домінантні негативні мутації (також відомі як антиморфні мутації) мають змінений продукт гену, який діє антагонічно до аллелю дикого типу. Такі мутації звичайно приводять до зміненої молекулярної функції (часто недіючої) і характеризуються доміантним або напів-домінантним фенотипом. Синдром Марфана у людини — приклад доміантної негативної мутації, яка проявляється як аутосомна доміантна хвороба. За цими умовами, дефектний глікопротеїн що кодується зміненим геном фібріліну (FBN1) протидіє продукту аллелю.

Смертельні мутації — мутації, які приводять до такого фенотипу, який не здатний до ефективного відтворення.

III. За аспектом зміненого фенотипу

Морфологічні мутації звичайно впливають на зовнішність індивідуума. Мутації можуть замінити висоту рослини або замінити вигляд її насіння від гладкого до грубого.

Біохімічні мутації приводять до пошкоджень, що зупиняють ферментний шлях. Часто, морфологічні мутанти — прямий результат мутації завдяки ферментного шляху.

IV. Спеціальні категорії

Умовна мутація — мутація, яка має фенотип дикого типу за певними природними умовами і мутантний фенотип за певними умовами. Умовні мутації також можуть бути смертельними.

Причини мутацій: Два класи мутацій — спонтанні мутації (молекулярний розпад) і вимушені мутації, викликані мутагенами.

V. Спонтанні мутації на молекулярному рівні включають:

Таутомеризм — В основі замінюється розташування водневого атома.

Депуринація — Втрата пурину (А або G).

Деамінація — Заміна нормальної основи на нетипову; C → U, (може бути виправлений механізмами ремонту ДНК), або спонтанна деамінація 5-метилцитозину (непоправна), або A → HX (гіпоксантин).

Транзиція — зміни пурину на інший пурин, або піримідину на піримідін.

Трансверсія — пурин стає піримідіном або навпаки.

VI. Вимушені мутації на молекулярному рівні можуть бути викликані:

Хімічними речовинами: **Нітрозогуанадин** (Nitrosoguanidine, NTG), **Аналоги основ** (наприклад BrdU), **Прості хімічні речовини** (наприклад **кислоти**), **Алкілюючі агенти** (наприклад, N-етил-N-нітрозосечовина, **англ.** *N-ethyl-N-nitrosourea*, ENU)). Ці агенти можуть діяти на ДНК як при реплікації, так і у інший час. На відміну, аналог основи можуть тільки видозмінити ДНК, якщо він включається при реплікації ДНК. Кожний з цих класів хімічних мутагенів має певні ефекти, які приводять до транзицій, трансверсій або делецій, **Метилируючі агенти** (наприклад **етан-метил-сульфонат**, **англ.** *ethane methyl sulfonate*, EMS)), **Поліциклічні вуглеводні** (наприклад **бензопірен**, знайдений у вихлопах **двигунів внутрішнього згорання**), **Інтеркаляційні агенти** (наприклад, **бромистий етідій**, **англ.** *ethidium bromide*), **Крослінкери** або агенти поперечного зшивання ДНК (наприклад, **платина**), **Окислювальне пошкодження**, викликане **кисневими радикалами**

Радіація або випромінювання: **Ультрафіолетове випромінювання** (неіонізуюче випромінювання) — збуджує електрони до вищого рівня енергії та визиває хімічні реакції інакше неможливі. Дві нуклеотидні основи ДНК — цитозин та тимін — найуразливіші до збудження, яке може замінити властивості спаровування цих основ, **Іонізуюча радіація**. У ДНК існують так звані **гарячі точки**, де мутації відбуваються до 100 разів частіше, ніж у решті ДНК. Гаряча точка може знаходитися в незвичайній основі, наприклад, 5-метилцитозині.

Частота мутацій також відрізняється для різних видів. Еволюційні біологи запропонували, що вищі частоти мутації вигідні в деяких ситуаціях, тому що вони дозволяють організмам еволюціонувати і тому пристосуватися швидше до своїх **навколишніх середовищ**. Наприклад, багатократна дія **антибіотиків** на бактерії і відбір стійких мутантів може привести до відбору

бактерій, які мають вищі частоти мутацій, ніж оригінальна популяція (мутаторна лінія).

Мутації і хвороби

Зміни в ДНК, викликані мутацією, можуть викликати помилки в послідовності білка, створюючи частково або цілком нефункціональні білки. Щоб функціонувати правильно, кожна клітина залежить від тисячі білків, що повинні функціонувати в правильних місцях в правильні часи. Коли мутація змінює білок, який грає критичну роль в тілі, може виникнути захворювання. Захворювання, викликане мутаціями в одному або більше генах називається генетичним захворюванням. Проте, тільки маленький відсоток мутацій визивають генетичні захворювання, більшість не мають ніякого впливу на здоров'я. Наприклад, деякі мутації змінюють послідовність основ ДНК гена, але не замінюють функцію білку, зробленого геном.

Якщо мутація присутня в зародковій клітині, вона може дати початок нащадку, який буде носити мутацію у всіх своїх клітинах. Це причина спадкових хвороб. З другого боку, мутація може відбуватися в соматичній клітині організму. Такі мутації будуть присутні у всіх нащадках цієї клітини, і певні мутації можуть примусити осередок почати безконтрольно відтворюватися, і тому викликати рак.

Часто, мутації гена, які могли б створити генетичну хворобу, виправляються ремонтною системою клітини. Кожна клітина має цілий ряд шляхів, через які ферменти визнають і ремонтують помилки в ДНК. Оскільки ДНК може бути пошкоджена або видозмінюються у багатьох відношеннях, процес ремонту ДНК — важливий шлях, в якому тіло захищає себе від хвороби.

Дуже маленький відсоток всіх мутацій фактично має позитивний ефект. Ці мутації приводять до нових версій білків, які допомагають організму і його майбутнім поколінням краще пристосовують до змін в їхньому навколишньому середовищі. Наприклад, вигідна мутація могла б приводити до створення білку, який захищає організм від нової лінії бактерій.

Фрагменти Окадзакі — відносно короткі фрагменти ДНК з коротким (кілька нуклеотидів) праймером РНК на 5' кінці, що створюються на ланцюжку, що запізнюється, протягом реплікації ДНК. Назва фрагментів походить від імені вчених, що їх відкрили Окадзакі Рейдзі і Окадзакі Цунеко, у 1968 році, досліджуючи реплікацію ДНК бактеріофагів.

Механізм дії фрагментів О. Кожен фрагмент Окадзакі утворюється поряд з реплікаційною виделкою після РНК-праймера, утвореного праймазою, і далі продовжується ДНК-полімеразою III у прокаріотів. У еукаріотів ланцюг що відстає синтезується ДНК-полімеразою δ . Праймер пізніше видаляється ферментом з ендонуклеазною активністю подібної РНКазі H, flap-ендонуклеазами і геліказою / нуклеазою Dna2.

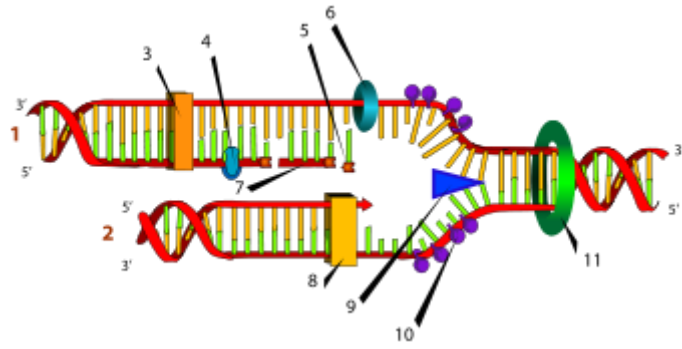


Рис.16. Молекулярний механізм реплікації дволанцюгової ДНК

1 – ланцюг, що відстає, 2 – ланцюг-лідер, 3 – ДНК-полімераза (Pol α), 4 – ДНК лігаза, 5 – РНК-праймер, 6 – ДНК-праймаза, 7 – фрагмент Окадзакі, 8 – ДНК-полімераза (Pol δ), 9 – хеліказа, 10 – одиночний ланцюг зі зв’язаними білками, 11 – топоізомераза.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке мутації?
2. Які існують види мутацій?
3. Коли і ким були відкриті мутації?
4. Надайте класифікацію мутацій.
5. Що таке частота мутацій?
6. Що таке мутації хвороби?
7. Що таке фрагменти Окадзакі?
8. Який механізм дії фрагментів Окадзакі?

18. Регуляція реплікації у бактерій.

Реплікація хромосом бактерій тісно поєднана з метаболізмом клітин. Наприклад, частота ініціацій нових раундів реплікації залежить від швидкості росту бактеріальних клітин, і в клітинах швидко зростаючих бактерій можуть міститися хромосоми з декількома працюючими реплікативними виделками, хоча для реплікації однієї бактеріальної хромосоми їх потрібно тільки дві, ініційовані в єдиній області початку реплікації (*ori*) і розбіжні в протилежних напрямках. Це дозволяє бактеріям при сприятливих умовах витратити для генерації менше часу, ніж для повної реплікації бактеріальної хромосоми. Очевидно, що для підтримки строго упорядкованого характеру реплікації повинні існувати тонкі механізми регуляції реплікації на рівні ініціації нових раундів. Такі механізми, дійсно, існують. Найбільш добре вивченими є механізми регуляції синтезу ДНК у *E. coli*, в тому числі механізми контролю числа копій у невеликій плазміді *E. coli ColE1*.

Поліаденування антисмислової РНК: регуляція реплікації плазмід

У деяких плазмід, наприклад, ColE1 та її похідної pBR322, регуляція числа копій здійснюється за допомогою антисмислової РНК (РНК I), що утворює гібрид з РНК-праймером (РНК II), необхідним для ініціації їх реплікації, і блокує його функціонування. Внутрішньоклітинна концентрація РНК I є критичним параметром у регуляції реплікації плазмід. Деградація РНК I ініціюється відщепленням 5'-кінцевого пентануклеотиду під дією РНКазы E (РНК I-5) і далі контролюється полі (A) - полімеразою - продуктом гена *pspB*. Поліаденована РНК I-5 володіє коротким часом напівжиття, типовим для бактеріальних мРНК (1-2 хв), тоді як немодифікована РНК I-5 більш стабільна (час напівжиття \rightarrow 10 хв). Прискорена деградація полі (A)-РНК I-5 ініціюється полінуклеотидфосфорилазою. У полі (A) - РНК I-5 3'-кінцевий нуклеотид знаходиться в складі шпильки, що перешкоджає ефективній дії полінуклеотидфосфорилази. Однак при наявності короткого полі (A) - хвоста, виступаючого за межі шпильки, РНК I-5 ефективно розщеплюється ферментом по 3'-екзонуклеазному механізму. В руйнування полі (A) +РНК I-5 вносять свій внесок і інші Нуклеази, включаючи РНКазы E і РНКазы III. Є дані, що поліаденування саме по собі інактивує РНК I-5, так як призводить до характерної зміни її вторинної структури.

Реплікон - одиниця генома, здатна до автономної реплікації ДНК; містить точку ініціації реплікації.

Реплікон несе дві специфічні детермінанти: а) структурний ген (СГ), що контролює синтез специфічного ініціатора, і б) реплікатор, або оператор реплікації, на який впливає ініціатор, дозволяючи тим самим копіювати ДНК, що прилягає до реплікатора.

Багато репліконів використовують, мабуть, зовсім іншу стратегію регуляції власного синтезу. Цей білок специфічно зв'язується з певною послідовністю ДНК, багаторазово повтореною на даному репліконі. Зв'язування білка-ініціатора з однією або декількома такими послідовностями, що знаходяться в оріджині, необхідне для ініціації. Одна з послідовностей знаходиться на початку гена білка-ініціатора, так що зв'язування з нею білка пригнічує його власний синтез. Вважається, що регуляція реплікації здійснюється завдяки складній конкуренції за білок-ініціатор між ділянкою ДНК, необхідною для власної репресії, ділянкою (або ділянками), необхідною для ініціації синтезу ДНК, і іншими ділянками зв'язування. Хоча подібні реплікони поки ще недостатньо вивчені і детальна картина регуляції реплікації не зрозуміла, очевидно, що наявність множинних місць зв'язування ключового білка ініціації реплікації дозволяє регуляторній системі дуже чуйно відгукуватися на зміну копійності репліконів. У певному сенсі багаторазово повторені ділянки зв'язування білка-ініціатора, сумарна кількість яких пропорційна копійності репліконів, аналогічні раніше розглянутій інгібіторній РНК, концентрація якої також пропорційна копійності.

Багато дрібних репліконів використовують альтернативну стратегію

стабільного успадкування. Вони, мабуть, не мають механізму впорядкованої сегрегації, але підтримуються у високому числі копій. Висока копійність забезпечує відносно стабільне успадкування репліконів при випадковому розподілі молекул по дочірнім клітинам при поділі. Природно, для цього способу принципово важливим є суворе відновлення копійності, щоб єдина молекула ДНК встигла швидко розмножитися до характерного для неї числа копій до початку наступного поділу клітини.

Реплікони в еукаріот

Істотною відмінністю еукаріотичної системи реплікації є те, що кожна хромосома є полірепліконом: загальний геном, наприклад ссавців, містить близько 40 тис. точок ініціації оріджинів. Оріджини важко ідентифікувати, оскільки загальних елементів послідовності у них немає, вони лише характеризуються підвищеним вмістом АТ-пар. Розмір еукаріотичного реплікону варіює від 50 до 200 тис. пар основ, що збігається з розмірами петльових доменів хроматину. Отже, хроматинова петля це один реплікон, а оріджин збігається з ділянкою, асоційованою з ядерним матриксом. Ініціація реплікації залежить від мультибілкового комплексу ORC (Origin Recognition Complex - Комплексу Розпізнавання оріджинів - КРО), який практично постійно присутній на оріджині. При підготовці до реплікації в фазі G1 клітинного циклу відбувається фосфорилування циклінозалежними кіназами факторів регуляції клітинного циклу *cdc6* і *cdc45* (*cdc* - Cell division cycle - Цикл Поділу Клітини). В результаті ці фактори разом з двома моногексамерами МСМ (яким відводиться роль геліказ) взаємодіють з ORC і індукують локальне плавлення подвійної спіралі. МСМ разом з *cdc45* залишаються і далі в основах двох реплікативних виделок. З розплетеним полінуклеотидним ланцюгом взаємодіє РРА, *cdc45* рекрутує в кожную реплікативну виделку ДНК-полімераза. Остання починає синтез праймера, з основою виделки зв'язується RF-C, який завантажує обруч PCNA, полімераза замінюється полімеразою (Так зване перемикання полімераза). Надалі МСМ продовжує поділ ланцюгів ДНК, а полімераза здійснює синтез праймерів на ланцюгу, що запізнюється, і кожен раз замінюється на іншу копію полімерази. Реплікація ініціюється синхронно на сусідніх 25100 репліконах, які становлять так звану реплікативну фабрику. При цьому різні ділянки хроматину реплікуються не одночасно: в останню чергу відбувається реплікація гетерохроматинових зон.

Роль метилювання ДНК в регуляції реплікації

Метилювання ДНК — модифікація молекули ДНК без зміни її нуклеотидної послідовності, що є основним механізмом епігенетики. Метилювання ДНК полягає в приєднанні метильної групи до С-5 або N-4 позицій цитозину або N-6 позиції аденіну.

Загалом метилювання впливає на рівень транскрипції, і тому є

частиною регулювання експресії генів. Інформація про метилювання може наслідуватися із поділом клітини, і, таким чином, може розглядатися як частина епігенетичного коду, епігенетичної складової геному. Метилювання ДНК зустрічається у всіх основних групах живих організмів, але рівень зазвичай більш високий у еукаріотів. У людини метильовано близько 1 % ДНК геному. У соматичних клітинах дорослого організму метилювання ДНК зазвичай відбувається в CpG-динуклеотидах, метилювання цитозину в складі інших послідовностей зустрічається в ембріональних стовбурових клітинах.

У рослин метилювання цитозину відбувається як симетрично по обох ланцюжках (у складі послідовностей CpG або CpNpG), так і асиметрично лише на одному з двох ланцюжків (у складі CpNpNp, де N позначає будь-який нуклеотид).

У бактерій може відбуватися метилювання як цитозину, так і аденіну, і є частиною захисту від вірусів і деяких інших паразитів та, можливо, частиною механізму регуляції різних клітинних процесів, зокрема клітинного циклу



Рис. 17. Ілюстрація молекули ДНК з метильованими цитозинами в центрі.

Метилювання ДНК у людини

У людини за процес метилювання ДНК відповідають три ферменти — ДНК-метилтрансферази 1, 3a і 3b (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b), відповідно. Передбачається, що DNMT3a і DNMT3b — це *de novo* метилтрансферази, які здійснюють формування картини метилювання ДНК на ранніх стадіях розвитку. DNMT1 є, ймовірно, метилтрансферазою, яка підтримує метилювання ДНК на пізніших стадіях розвитку організму і відповідає за приєднання метильної групи на комплементарному ланцюжку при реплікації ДНК дочірньої клітини. Білок DNMT3L гомологічний іншим DNMT-білкам, але не має каталітичної активності. Натомість, DNMT3L підтримує *de novo* метилтрансферази, сприяючи зв'язуванню цих ферментів з ДНК і стимулюючи їхню активність.

Важливим етапом в розвитку злоякісних новоутворень є інактивація генів-супресорів пухлинного росту. У разі якщо інактивація була зумовлена метилюванням промоторної області гену, проводилися експерименти з відновлення експресії шляхом інгибування DNMT. 5-аза-2-дезоксцитидин (децитабін) є нуклеозидним аналогом, що інгибує DNMT метилтрансферазу.

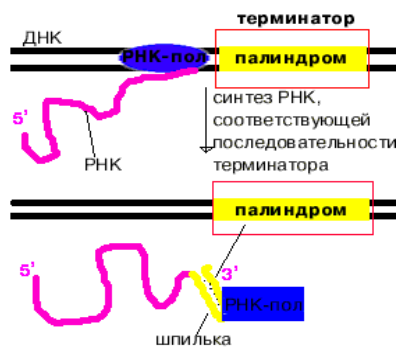
Механізм дії препарату заснований на ковалентному зв'язуванні ферменту в комплексі з ДНК, що унеможлиблює виконання ферментом своєї функції і призводить до деградації метилтрансферази. Проте для того, щоб децитабін був активний, він повинен вбудуватися в геном клітини, але це, в свою чергу, може викликати мутації в дочірніх клітинах, якщо клітина не гине і продовжує поділ. До того ж децитабін токсичний для кісткового мозку, що звужує область його терапевтичного застосування. Ці обмеження привели до інтенсивного пошуку методів терапевтичної дії, заснованих на використанні «антисенсових» РНК, які протидіють DNMT за допомогою деградації її мРНК і, отже, блокують трансляцію. Проте, як і раніше, залишається відкритим питання про те, чи є інгибування функції DNMT1 достатньою умовою для збільшення експресії генів-супресорів, негативна регуляція транскрипції яких здійснюється метилюванням ДНК?

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Як відбувається регуляція реплікації плазмід?
2. Що таке реплікон? Які він несе детермінанти?
3. Характеристика репліконів у еукаріот?
4. Що таке метилювання ДНК?
5. Роль метилювання ДНК в регуляції реплікації?
6. Метилювання ДНК у людини.

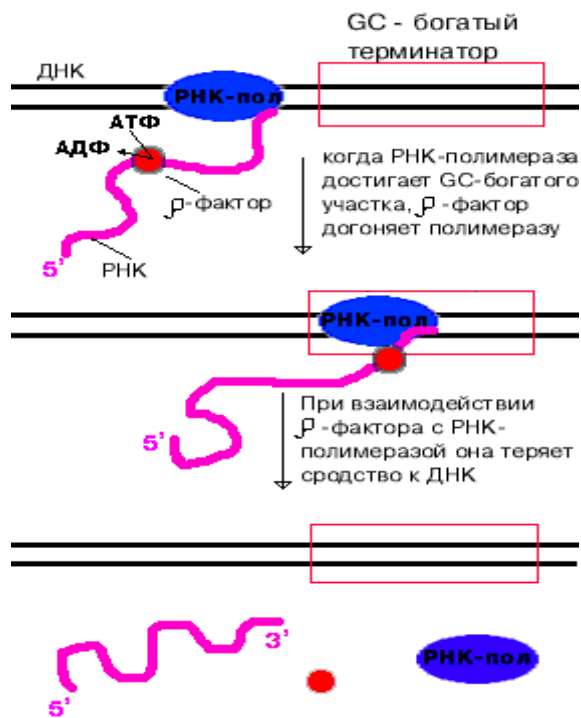
19. Термінація.

Специфічна термінація буває ρ - незалежною і ρ - залежною.



При ρ - незалежній термінації в термінаторі присутній палиндром. У РНК, що синтезується формується шпилька. Шпилька змінює конформацію РНК-полімерази і фермент втрачає спорідненість до ДНК.

ρ-залежна термінація.



ρ- фактор - це білок, що має чвертинну структуру, і володіючий АТФ-азною активністю. Він здатний впізнавати 5`-кінець РНК, що синтезується довжиною приблизно 50 нуклеотидів, сідати на нього і рухатися по РНК з такою ж швидкістю, з якою РНК-полімераза рухається по ДНК.

У термінаторі багато Г-Ц пар (з трьома водневими зв'язками), внаслідок чого РНК-полімераза уповільнює хід, ρ- фактор її наздоганяє, змінює конформацію ферменту - і синтез РНК припиняється.

Реплікація плазмід

Плазміда (*лат.*, *англ.* *plasmid*) — молекула ДНК, окрема від хромосомної ДНК та здатна до автономної реплікації. Вона звичайно кругла і дво-ланцюжкова. Плазміді в природі частіше за все зустрічаються у бактерій (ймовірно і архей), іноді в еукаріотів (наприклад, 2-мікронне кільце гриба Дріжджів пивних (*Saccharomyces cerevisiae*)). Розмір плазмід може бути від 1 до 400 kbp (тисяч пар основ). У одній клітині може бути від однієї копії (особливо для великих плазмід) до кількох сотень або навіть тисяч копій тієї ж плазміді (особливо для певних штучних плазмід, сконструйованих для отримання високого числа копій, наприклад, плазміді серії pUC). Термін «плазміда» був вперше введений американським молекулярним біологом Д. Ледербаргом у 1952 році.

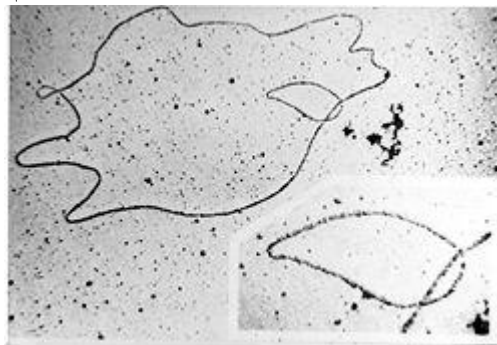


Рис. 18. Кільцева дволанцюгова ДНК плазмід під растровим електронним мікроскопом.

Реплікація плазмід відбувається незалежно від реплікації хромосоми, причому на одну хромосому в бактерії може припадати одна або кілька однакових плазмід. *Епісоми* - це плазмиди, здатні включатися в хромосому бактерії. Деякі позахромосомні елементи можуть вести себе як епісоми в одних бактеріях і, як плазмиди в інших. Плазмиди можуть бути інфекційними (переносимими) або неінфекційними. У першому випадку вони містять гени для синтезу - статевих пілей і здатні переносити свою ДНК в іншу клітину. Якщо плазміда здатна інтегруватися з хромосоною, а потім і виходити з неї, захоплюючи з собою при цьому інші гени, то таку плазмиду називають фактором статі.

Для своєї реплікації плазмиди використовують реплікативну машину клітини-господаря, однак реплікація плазмід відбувається незалежно від хромосоми. Кожна плазміда є самостійним репліконом, сама контролює власну реплікацію і підтримується в клітині в певному, характерному для неї числі копій. Для характеристики плазмідних репліконів їх прийнято розбивати на групи несумісності.

Вивченню механізмів контролю реплікації і числа копій: бактеріальних плазмід присвячено безліч робіт. Було виявлено, що число копій плазмід приблизно однакове в клітинах, які розмножуються з різною швидкістю. З цього випливає, що реплікація плазмід якимось пов'язана з ростом бактерій. Така координація досягається за участі механізмів, контролюючих початок реплікації. Якщо вже реплікація почалася, то вона йде з відносно постійною швидкістю при будь-якому темпі розмноження бактерій. При високій швидкості розмноження реплікація індукується частіше в разі багатокопійних плазмід, ніж малокопійних.

Двонаправлена реплікація (bidirectional replication) [лат. replicatio - повторення] - один із способів реплікації, при якому в одній точці молекули ДНК утворюються дві різноспрямовані реплікативних виделки.

Помилки реплікації та репарації

Помилкове включення нуклеотидів під час реплікації є досить вагомим причиною виникнення точкових мутацій і хромосомних перебудов. Утворення некомплементарних пар нуклеотидів (місметчів) під час реплікації відбувається з частотою 1 на 10 тис. нуклеотидних пар.

Основною причиною помилкового приєднання нуклеотидів під час реплікації є *таутомерія* азотистих основ. Спонтанні перебудови електронних систем гетероциклів приводять до існування кожної основи у вигляді двох таутомерних форм: аміно- чи іміноформи для А, С; енольної чи кетоформи для G, T. Рівновага зсунута в бік аміно-та кетоформ, які й присутні у складі подвійних спіралей і для яких реалізуються правила компліментарності А-Т, G-С. Але спарювання основ підпорядковується іншим правилам для мінорних таутомерних форм: наприклад, іміноформа А та аміноформа С утворюють між собою два водневих зв'язки (рис. 19), що

може відбутися під час розпізнавання матриці черговим нуклеотидом при реплікації.

Аналогічно, енольна форма тиміну є комплементарною гуаніну. У результаті швидкого повернення до мажорної таутомерної форми, у складі ДНК залишиться некомплементарна пара нуклеотидів. Якщо система редагування помилок під час синтезу ДНК і потім система репарації місметчів не спрацює, у наступному реплікативному циклі така некомплементарна пара зафіксується у вигляді мутації в одній із двох дочірніх молекул.

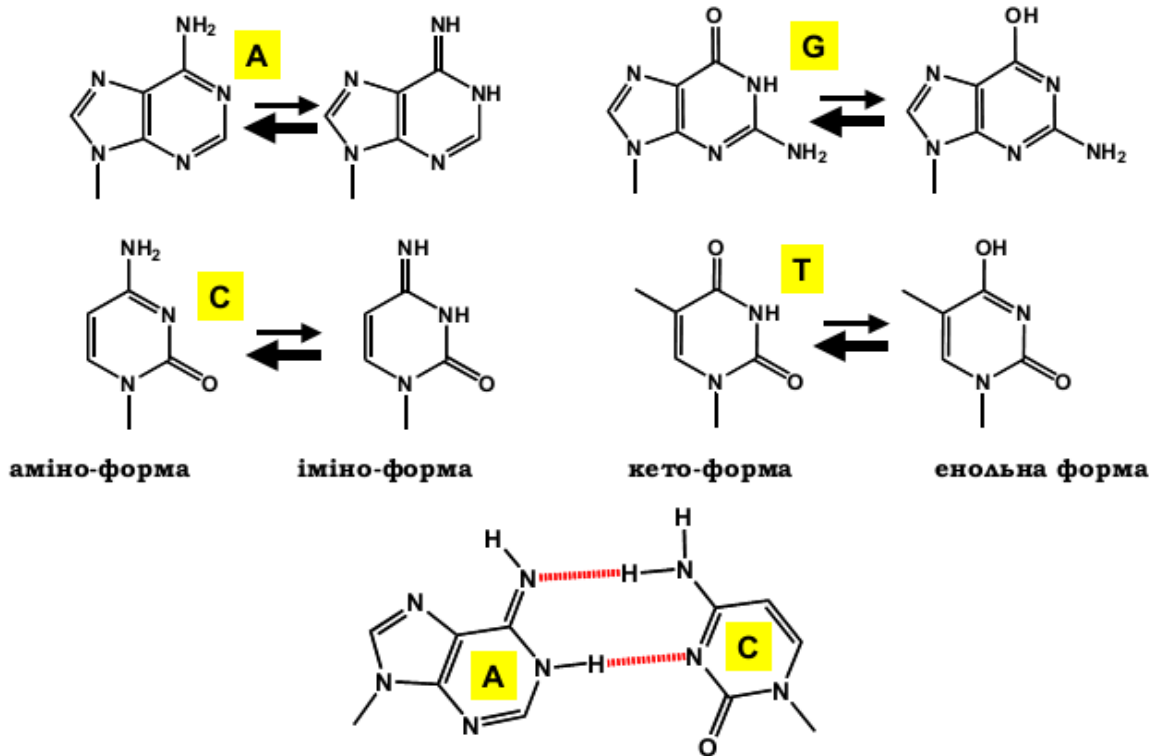


Рис. 19. Таутомерні форми азотистих основ, внизу - комплементарна пара іміноформи аденіну та аміноформи цитозину

На ділянках мікросателітних тандемних повторів (повторів елементів послідовності довжиною 1-15 пар основ) спостерігається специфічна помилка ДНК-полімеразного комплексу - проковзування (slippage) ДНК-полімерази. На ділянці матричного або новосинтезованого ланцюгів ДНК інколи відбувається утворення мікропетель або мікрошпильок за рахунок внутрішньоланцюгових комплементарних взаємодій. У випадку появи мікропетлі на матричному ланцюзі ДНК дочірній ланцюг буде коротшим на кілька нуклеотидів, і отже, після наступного раунду реплікації буде спостерігатися делеція. Якщо така мікропетля утворюється в дочірньому ланцюзі, кількість нуклеотидів у ньому збільшиться, що приведе до вставки одного або декількох повторів.

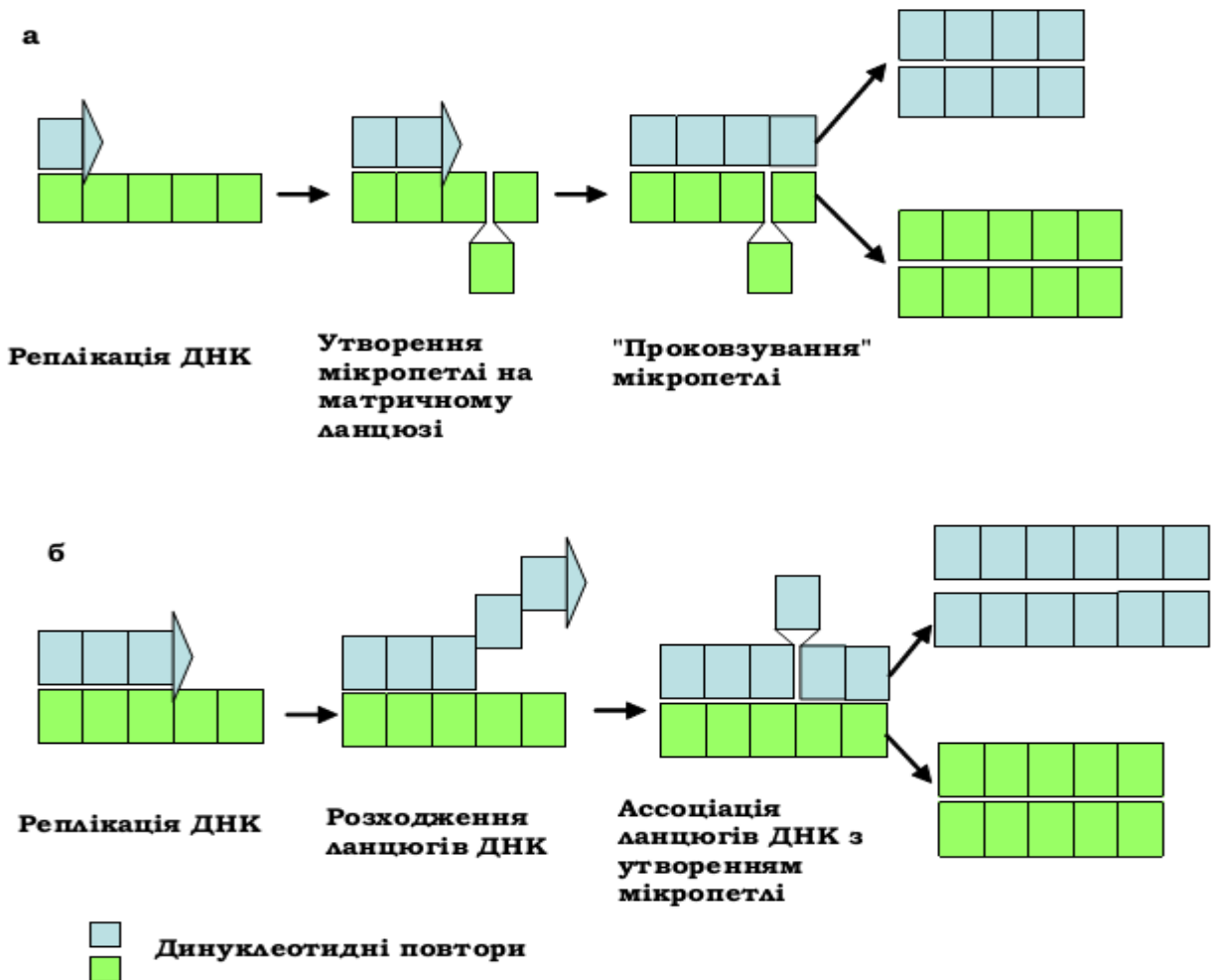


Рис. 20. Зменшення(а) і збільшення(б) кількості повторів при утворенні мікропетлі в ДНК під час реплікації.

Мутації виникають не тільки внаслідок недостатньо ефективної репарації, а деякі процеси репарації ДНК самі є причинами мутацій. Насамперед це стосується неточних систем репарації: SOS-репарації, яка зумовлює неточний синтез ДНК у разі великої кількості пошкоджень, що викликає ще більше зростання мутацій, і системи репарації дволанцюгових розривів за рахунок негомологічного з'єднання кінців NHEJ. Саме NHEJ вважаються основною причиною реалізації хромосомних перебудов, оскільки забезпечують з'єднання кінців будь-яких молекул ДНК.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Види термінації.
2. Що таке плазміда?
3. Що таке двонаправлена реплікація?
4. Вкажіть помилки реплікації та репарації.

20. Транскрипція у прокариотів та еукаріотів

РНК-полімераза здійснює транскрипцію всіх бактеріальних генів і складається з кількох субодиниць: α -35кДа, β '-165кДа, β -155кДа, σ -частіше 70кДа (σ 70). РНК-полімераза складу $\alpha\alpha\beta\beta'\sigma$ 70 називається *holo*-фермент ($E\sigma$ 70), складу $\alpha\alpha\beta\beta'$ -*core*-фермент (E).

σ - змінний фактор специфічності, який дисоціює після ініціації транскрипції. Елонгації і термінації здійснюються *core*-ферментом. У *E.coli* ~ 10 видів σ -субодиниць. Транскрипція генів теплового шоку, оперонів *gln* або *pir* здійснюється σ 54 у складі *holo*-ферменту $E\sigma$ 54 (54 кДа). Всі субодиниці заряджені негативно: $\sigma > \alpha > \beta > \beta'$ - розташовані за зниженням заряду. У кожній субодиниці мається кластер (+)-заряджених ділянок, якими вони зв'язуються з ДНК. Найбільше число кластерів у - β' , який бере участь у зв'язуванні ферменту із ДНК, β -субодиниця містить активні центри - ініціації і елонгації, α -субодиниці забезпечують правильну взаємодію ферменту з промоторами. *Рифампіцин* - блокує ініціацію, *стрептолідигін* - блокує елонгацію, що говорить про рознесення активних центрів в РНК-полімерази.

Розпізнавання і зв'язування RNA-pol з промотором здійснюється *holo*-ферментом.

Одночасно в клітині присутньо близько 7000 молекул РНК-полімерази. Тільки *holo*-фермент володіє високою спорідненістю до специфічної послідовності нуклеотидів - промотор, спорідненість до решти випадкових послідовностей ДНК у нього знижений в 10000 разів. У *core*-ферменту однакова спорідненість до будь-якої послідовності нуклеотидів. Сам по собі сигма - фактор володіє найменшою спорідненістю до ДНК порівняно з іншими субодиницями РНК-полімерази, однак він надає *holo*-ферменту таку конформацію, що володіє підвищеною спорідненістю до промотору.

Стадії розпізнавання і зв'язування, а також ініціації здійснюються *holo*-ферментом. Елонгація і термінація здійснюються *core*-ферментом. Дві α субодиниці - каркас РНК-полімерази. До них кріпляться інші субодиниці. β' - субодиниця відповідає за міцне зв'язування з ДНК за рахунок кластеру позитивно заряджених амінокислот. В β - субодиниці знаходяться два каталітичних центри. Один відповідає за ініціацію, а інший - за елонгацію. Один центр працює в *holo*-, а інший - в *core*-ферменті.

РНК-полімераза — фермент, що здійснює синтез молекул РНК. У вузькому сенсі, РНК-полімеразою зазвичай називають ДНК-залежні РНК-полімерази, що здійснюють синтез молекул РНК на матриці ДНК, тобто здійснюють транскрипцію. Ферменти класу РНК-полімераз дуже важливі для функціонування клітини, тому вони є у всіх організмах і в багатьох вірусах. Хімічно РНК-полімерази є нуклеотиділ-трансферазами, що полімеризують рибонуклеотиди на 3'-кінці ланцюжка РНК.

Промотор - це попередня гену послідовність нуклеотидів, яку розпізнає фермент РНК-полімераза. Основний елемент промотора - місце

зв'язування РНК-полімерази, яке вона займає перед початком синтезу РНК. До складу промоторів можуть входити також ділянки зв'язування білків-регуляторів.

У вищих багатоклітинних еукаріотів, у тому числі і в людини, в межах 100-200 п.н. перед стартом транскрипції була виявлена складна мозаїка промоторних елементів, представлених короткими нуклеотидними послідовностями («мотивами»): ТАТА, СААТ і GC-блоки. Ці три мотиви були виявлені тільки перед генами, які транскрибувалися РНК-полімеразою II.

Транскрипція генів, що зчитуються РНК-полімеразою III, взагалі не залежить від послідовностей, розташованих перед геном, а визначається промотором, який лежить всередині цих генів. Промотор для РНК-полімерази III - це в більшості випадків розчленований промотор.

Промотор для РНК-полімерази I охарактеризований недостатньо добре. Хоча ділянки спейсерів, відповідні за своїми властивостями промоторам, вдається виявити, але неможливо дати для них усереднену послідовність.

Стадії транскрипційного циклу

Процес транскрипції поділяють на 4 основні стадії: 1) зв'язування молекул РНК-полімерази з ДНК і розпізнавання промотора; 2) ініціація; 3) елонгація; 4) термінація.

1) Зв'язування. Механізм пошуку промоторів на ДНК молекулами РНК-полімерази до кінця не з'ясований. Вважають, що після початкового нетривалого зв'язування з ДНК у випадкових місцях молекули РНК-полімерази переміщуються вздовж подвійної спіралі ДНК до тих пір, поки не виявляють послідовності нуклеотидів промоторів, на яких взаємодія ферменту з ДНК стає більш міцним. Під час руху молекули РНК-полімерази можуть періодично відділятися від ДНК і зв'язуватися з нею на новому місці, що прискорює процес пошуку промоторів.

У зв'язуванні з ДНК бере участь бета-субодиниця РНК-полімерази *E. coli*, а альфа-і особливо сигма-субодиниці необхідні для специфічного розпізнавання промоторів. Встановлено, що холофермент РНК-полімерази *E. coli* (мінімальний фермент, що містить сигма-субодиницю) закриває в області промотора ділянку ДНК довжиною близько 50 п.о. При цьому альфа-субодиниці контактують з ДНК в області-35-го нуклеотиду промотору.

2) Ініціація вимагає наявності субстратів РНК-полімерази - нуклеозидтрифосфатів - і полягає в утворенні перших декількох ланок ланцюга РНК. Перший нуклеотид входить до складу ланцюга, зберігаючи свою трифосфатну групу, а наступні приєднуються до 3'-ОН-групи попереднього із звільненням пірофосфату. На стадії ініціації РНК-продукт пов'язаний з матрицею і РНК-полімеразою неміцно і з високою ймовірністю може звільнитися з комплексу. У цьому випадку РНК-полімераза, не покидаючи промотора, знову ініціює РНК. Такий синтез ди-, три-і більш довгих олігонуклеотидів називають *абортивною ініціацією* - на противагу

продуктивній (тобто тієї, що завершується утворенням повноцінного РНК-продукту) ініціації. Коли РНК-продукт досягає критичної довжини (від 3 до 9 нуклеотидів на різних промоторах), абортивна ініціація повністю припиняється, транскрибуючий комплекс стабілізується і вже не розпадається до тих пір, поки синтез молекули РНК не буде доведений до кінця. Приблизно в цей же момент, який вважається кінцем ініціації і початком елонгації, від бактеріальної РНК-полімерази відділяється сигма-субодиниця.

Ефективність ініціації на різних промоторах, їх «сила», істотно розрізняється: якщо з деяких промоторів ініціюється всього одна-дві молекули РНК за період поділу клітини, то з інших (наприклад, з промоторів генів рибосомних РНК) ініціація відбувається раз в одну-дві секунди. Частота, з якою ініціюється транскрипція при насичуючій концентрації субстратів, залежить, головним чином, від рівноважної константи утворення закритих промоторних комплексів і константи швидкості перетворення закритого комплексу у відкритий. Для найсильніших промоторів зазвичай характерні високі значення обох констант (висока спорідненість РНК полімерази до промотора і швидкий перехід промоторного комплексу в активний відкритий стан). Для слабких промоторів характерні низькі значення цих величин. Слабкість промоторів з низькою спорідненістю до РНК-полімерази особливо помітна при низьких концентраціях РНК-полімерази і може бути скомпенсовано при її високих концентраціях.

Промотор з низькою спорідненістю до РНК-полімерази може бути досить сильним, якщо йому властива висока швидкість переходу у відкритий стан. Сила більшості промоторів збільшується зі збільшенням ступеня негативної зверхспіралізації ДНК. Це пояснюється тим, що негативна зверхспіралізація полегшує розплітання ДНК і тим самим перехід у відкритий промоторний комплекс. Однак, існують промотори, сила яких не залежить або навіть зменшується зі збільшенням ступеня зверхспіралізації. Цьому ефекту пояснення поки не знайдено.

Ініціація транскрипції починається зі складання на промоторі предініціаційного комплексу, до складу якого входять молекули РНК-полімерази і матричної ДНК. Якщо у випадку РНК-полімерази *E. coli* та інших прокариотів для здійснення цього процесу немає необхідності в присутності інших білкових факторів, то механізм збірки ініціаційного комплексу за участю РНК-полімерази II носить більш складний характер.

Існують дві моделі ініціації транскрипції РНК-полімеразою II. Відповідно до однієї з них на промоторі відбувається поступова (ступінчаста) збірка ініціаційного комплексу з окремих компонентів. Інша модель акцентує увагу на те, що ρ II може входити до складу ініціаційного комплексу у вигляді холофермента, що складається з багатьох субодиниць. Збірка такого комплексу починається з послідовного зв'язування за промотором основних факторів транскрипції.

3) Елонгація. Під час елонгаційної фази транскрипції відбувається додавання рибонуклеотидів до ланцюжка і перехід структури РНК-

полімеразного комплексу від відкритої до транскрипційної. По мірі збірки молекули РНК, ділянка ДНК перед РНК-полімеразою розкручується далі, і 13-парний відкритий комплекс перетворюється на 17-парний комплекс транскрипції. У цей момент промотор (ділянка ДНК –10...35 нуклеотидів) завершується, і σ -фактор відділяється від РНК-полімерази. Це дозволяє РНК-полімеразному комплексу почати рух вперед, оскільки σ -фактор утримував його на місці.

17-парний комплекс транскрипції містить гібрид ДНК і РНК, що містить 8 пар нуклеотидів — 8-крокову ділянку РНК, сполучену з шаблонним ланцюжком ДНК. По мірі виконання транскрипції, рибонуклеотиди додаються до 3'-кінця збираної РНК, і РНК-полімеразний комплекс рухається ланцюжком ДНК. Хоча в РНК-полімеразі не виявлено властивостей, характерних для 3'-екзонуклеази, аналогічних перевіірчій діяльності ДНК-полімерази, є свідчення того, що деякі РНК-полімерази зупиняються і коректують помилки у випадках помилкового формування пар нуклеотидів ДНК-РНК.

Додавання рибонуклеотидів до РНК має механізм, дуже близький до полімеризації ДНК. Вважається, що ДНК- і РНК-полімерази можуть бути еволюційно пов'язані. Аспарагінові залишки в РНК-полімеразі зв'язуються з іонами Mg^{2+} , які, у свою чергу, здійснюють вирівнювання фосфатних груп рибонуклеотидів: перший Mg^{2+} утримує α -фосфат нуклеотидтрифосфату, що підлягає додаванню в ланцюжок. Це дозволяє здійснити зв'язування нуклеотида з 3' ОН-групою кінця збираного ланцюжка і, таким чином, додати НТФ в ланцюжок. Другий Mg^{2+} утримує пірофосфат НТФ. Загальне рівняння реакції таким чином має вигляд: $(НМФ)_n + НТФ \rightarrow (НМФ)_{n+1} + ПФ_i$

4) Термінація. Термінація транскрипції РНК може бути р-незалежною або р-залежною. р-незалежна термінація здійснюється без допомоги р-фактора. Транскрипція паліндромної ділянки ДНК призводить до формування шпильки з РНК, яка зациклена і зв'язана сама на себе. Ця шпилька багата на гуанін і цитозин, що робить її стабільнішою, ніж гібрид ДНК-РНК. В результаті 8-парний гібрид ДНК-РНК в комплексі транскрипції скорочується до 4-парного. У випадку, якщо ці 4 останніх пари нуклеотидів сформовані слабкими аденином і уридином, молекула РНК відділяється

НАДСПІРАЛІЗАЦІЯ

Походження терміну «надспіралізація» пов'язане зі спостереженнями, що циркулярні ДНК часто під електронним мікроскопом мають форму перекручених плектоном – конфігурацій з ненульовим райзингом. Але слід мати на увазі, що в таких циркулярних ДНК завжди присутні також і торсійні деформації. Відповідно, загальною мірою надспіралізації (тобто мірою деформацій подвійної спіралі, замкненої в кільце) є величина $\Delta Lk = Lk - Lk_0$, розподілена між двома внесками. У принципі, уся надспіралізація може бути реалізована як тільки зміна твіста – конкретний

розподіл ΔLk по ΔTw та Wr залежить від механічних властивостей подвійної спіралі й контурної довжини кільця.

Позитивна та негативна надспіралізація. Поряд із абсолютною мірою надспіралізації ΔLk часто використовують також питому величину – щільність надспіралізації:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0}$$

Величина σ , є еквівалентною – вважалось, що оберти одного кінця ДНК відносно іншого можуть бути реалізовані, як торсійні деформації (ΔTw) і плектономічні витки (Wr), а кількість обертів дорівнювала ΔLk . Отже, відразу зрозуміло, що негативне значення ΔLk є топологічно еквівалентним розкручуванню, а позитивне – закручуванню подвійної спіралі. Виділені з бактерій циркулярні плазмідні зазвичай характеризуються величиною $\sigma -0,06 \div -0,05$.

Оскільки, як правило, Lk_0 за даних умов не дорівнює цілому числу, замикання ДНК у кільце майже завжди пов'язане з виникненням тієї чи іншої надспіралізації, і ця надспіралізація буде тим більшою за абсолютною величиною, чим більше обертів здійснив один кінець молекули навколо іншого перед замиканням. При цьому для збільшення надспіралізації не обов'язково обертати дволанцюговий кінець – того самого ефекту можна досягти, обертаючи в місці одноланцюгового розриву один кінець навколо інтактного ланцюга. Проілюструємо це на простому прикладі (рис. 21), використавши планарне кільце з $Lk = Lk_0 = 20$.

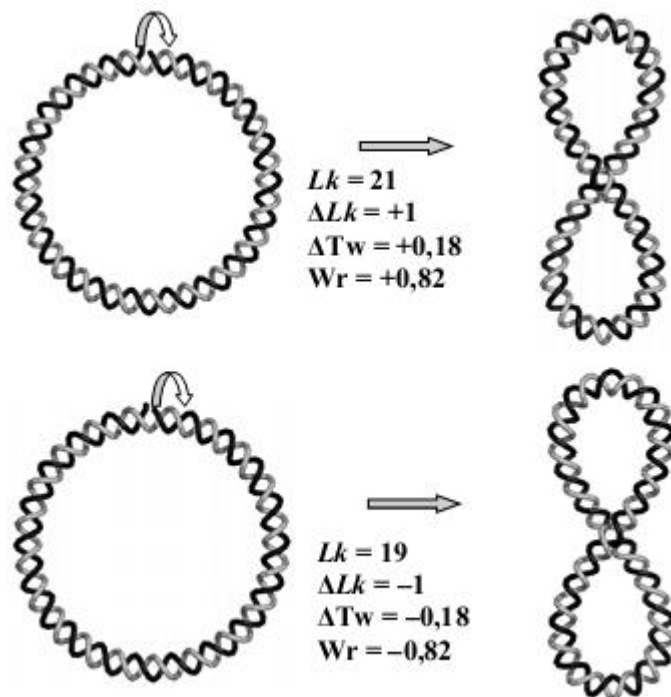


Рис. 21. Збільшення(угорі) чи зменшення(унизу) ступеня закручування подвійної спіралі на один оберт приводить, відповідно, до позитивної чи негативної надспіралізації циркулярної ДНК із $Lk_0 = 20$

Якщо зробити одноланцюговий розрив, збільшити кількість витків подвійної спіралі на 1 (закрутити подвійну спіраль торсійно) і зашити розрив, відновивши ковалентний зв'язок, то тим самим число зачеплень зросте на 1: ΔLk набуде значення +1, яке розподілиться між зміною твіста та райзингом. У цьому випадку кажуть про позитивну надспіралізацію, яка є топологічно еквівалентною до зростання закручування по-двійної спіралі. Відповідно, розкручування подвійної спіралі після розриву та наступне відновлення цілісності ланцюга приведе до негативної надспіралізації з $\Delta Lk = -1$. Однакові циркулярні молекули ДНК, які різняться лише числом зачеплень (як 3 молекули з $Lk = 19, 20$ та 21 на рис. 21), називаються *топоізомерами*.

Значення Lk певного топоізомеру залишається незмінним тільки за умови цілісності обох полінуклеотидних ланцюгів. Якщо внести навіть один розрив у хоча б один із ланцюгів, два кінці ланцюга в місці розриву отримують свободу обертатися навколо інтактного ланцюга. У результаті будь-яка надспіралізація і пов'язана з нею еластична напруга зникнуть – відбудеться релаксація циркулярної ДНК.

Аттенуація транскрипції

Аттенуація - це передчасне припинення транскрипції генів. Триптофановий оперон *trp* (*Trp*) складається з оператора, промотора і 5 структур генів. Окремий ген кодує білок-репресор. Білки структурних генів беруть участь у біосинтезі триптофану. У міру збільшення концентрації триптофану настає момент, коли подальший синтез цієї амінокислоти неможливий. Триптофан зв'язується з білком-репресором і у вигляді комплексу приєднується до оперону. При цьому відбувається конформаційна зміна у білку-репресорі, така, що він може зв'язатися з оператором. Транскрипція блокується. Крім того, в *Trp*-опероні є ДНК-ділянка, розташована перед першим структурним геном (*trpL*) і звана *аттенуатором*.

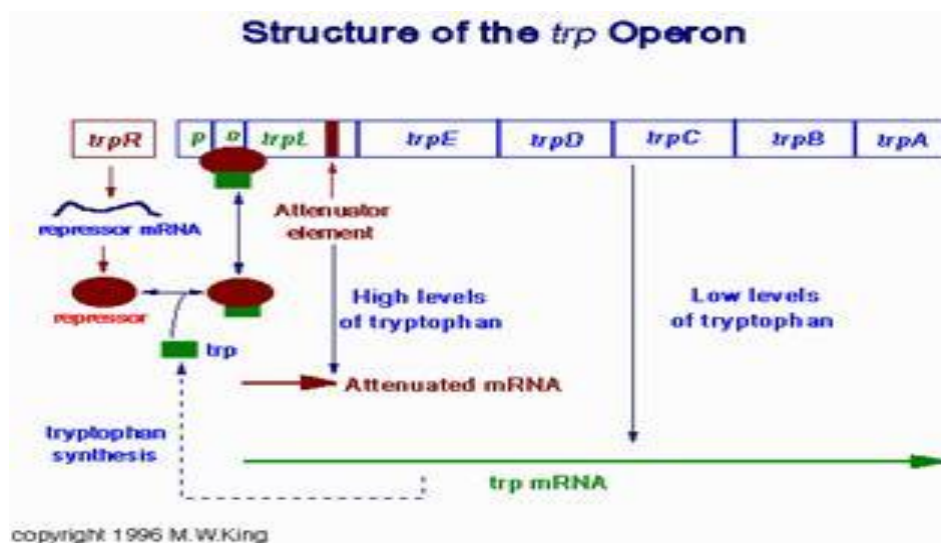
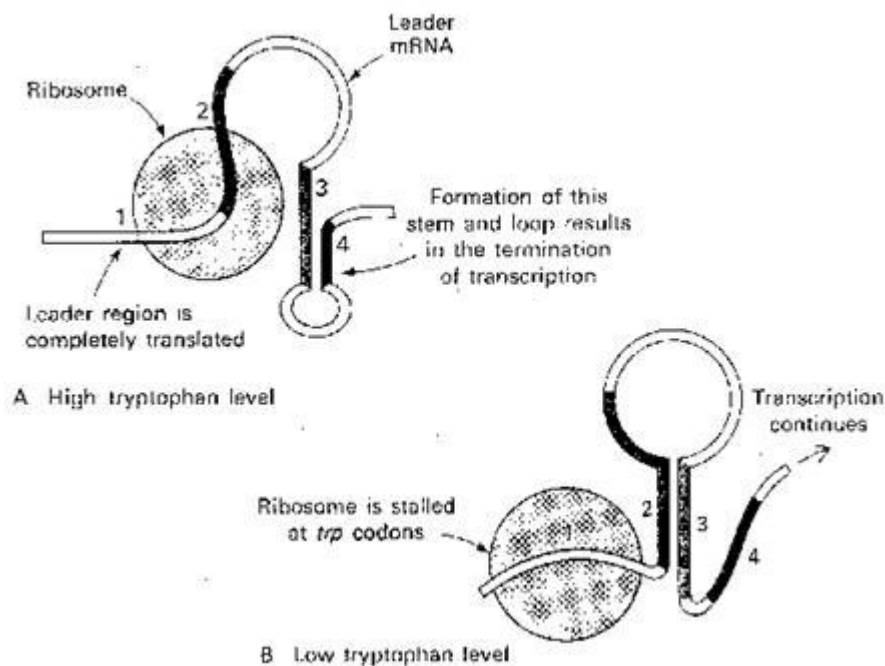


Рис. 22. Структура триптофанового оперону

Аттенуатор являє собою нуклеотидну послідовність, яка містить команду, по якій відбувається передчасна термінація транскрипції.

У прокаріотів транскрипція і трансляція відбуваються одночасно. РНК-полімераза починає транскрипцію і доходить до дев'яностого нуклеотиду, де робить тимчасову зупинку. В цей час до 5'-кінця транскрипту приєднується ліпосома і синтезується пептид з 14 амінокислот. Починаючи з 54 нуклеотиду у транскрипті розташовуються 3 кодони триптофану, тому для продовження транскрипції необхідні триптофанові т-РНК. Ліпосома зупиняється при нестачі цієї т-РНК і проходить далі при надлишку. Положення ліпосоми визначає вторинну структуру матричної РНК. Можливе формування двох різних шпильок.



При надлишку триптофану, тобто триптофан-РНК формується така структура, при якій відкривається стоп-кодон на м-РНК і спостерігається передчасна термінація транскрипції.

Фактори термінації транскрипції

Хоча всі фактори термінації транскрипції розпізнають різні послідовності нуклеотидів, для них характерна наявність в С-кінцевих частинах двох ДНК-зв'язуючих доменів довжиною у 80 амінокислот кожний, гомологічних ДНК-зв'язуючих послідовностей онкобілку с-Муб. Хоча більше половини поліпептидного ланцюга з N-кінця ТТФ-І можуть бути видалені без втрати його функцій, одних лише ДНК-зв'язуючих доменів недостатньо для забезпечення білком термінації транскрипції, і для цього потрібні прилеглі послідовності амінокислот.

Для кожної з форм РНК-полімераз виявлений свій специфічний білковий фактор, необхідний для правильного звільнення транскриптів з

комплексів що елонгуються. Однак, цим не обмежуються механізми, що забезпечують термінацію транскрипції в еукаріот. Дійсно, одним з основних факторів термінації транскрипції у цієї групи організмів є складний білковий комплекс, що забезпечує процесинг 3'-кінцевих послідовностей у попередників мРНК, синтезованих РНК-полімеразою II. У цьому випадку термінація транскрипції тісно поєднана з процесингом пре-мРНК поки невідомим молекулярним механізмом.

Фактори термінації транскрипції TTF-I мишей і Rib-1 дріжджів можуть припиняти елонгацію ланцюгів РНК на будь-якій з цих ДНК. Це вказує на високу еволюційну консервативність механізму термінації транскрипції Pol I.

Функціональна роль фактору TTF-I не обмежується лише участю в термінації транскрипції. Один з термінаторів транскрипції РДНК, Так, розташований за 170 п.о. перед точкою ініціації транскрипції генів рРНК. Взаємодіє з Т_о фактор TTF-I сильно стимулює транскрипцію генів рРНК, викликаючи перебудову структури хроматину в межах відповідного промотора.

Лактозний оперон

Лактозний оперон (lac-оперон) *E. coli* став у свій час, завдяки дослідженням Жакоба і Моно (François Jacob, Jacques Monod), першою детально вивченою системою регуляції транскрипції. До складу оперона (рис. 23) входять три структурні гени, що кодують ферменти, залучені до утилізації (катаболізму) лактози. Транскрипція всіх трьох генів здійснюється з одного промотора (синтезується єдина, так звана поліцистронна, молекула мРНК, яка має три послідовні відкриті рамки зчитування). Промотор оточують дві однакові операторні ділянки (lac-оператори), що мають спорідненість до lac-репресора, і сайт зв'язування CAP (Catabolite Activator Protein).

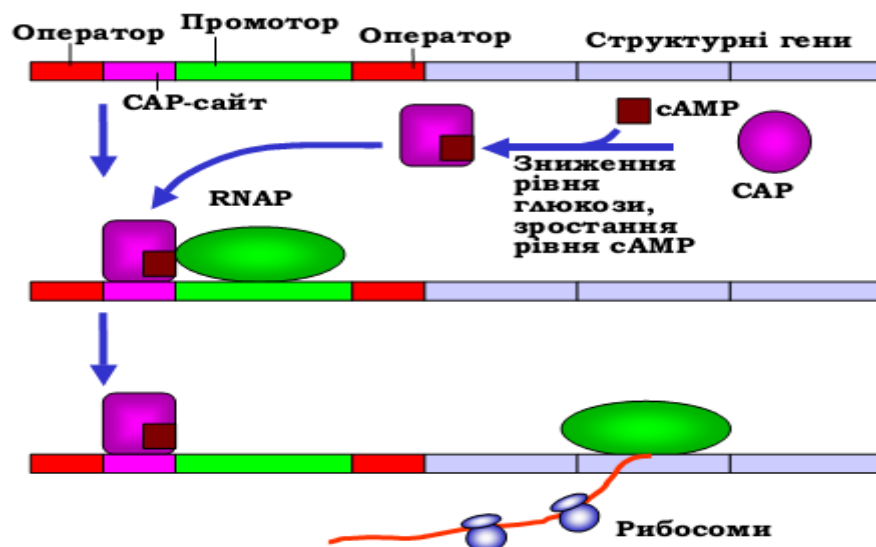
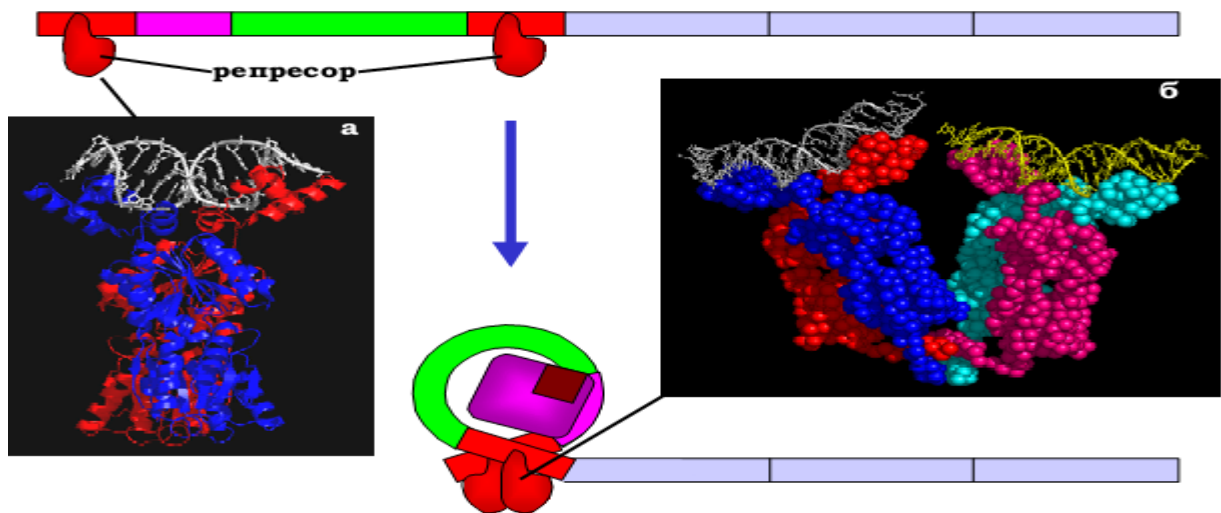


Рис. 23. Позитивна регуляція lac-оперона катаболітним активаторним білком CAP

Промотор *lac*-оперона є слабким і має досить низьку власну спорідненість до РНК-полімерази. Навіть, якщо в середовищі є лактоза, але присутня також глюкоза (кращий харчовий субстрат для бактерій), транскрипція *lac*-оперона майже не здійснюється. Зниження рівня глюкози приводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації сАМР(циклічного аденозинмонофосфату), зв'язування якого з САР індукує конформаційну перебудову білку та появу його специфічної спорідненості до відповідного сайту на ДНК. Взаємодія САР із РНК-полімеразою підсилює її спорідненість до промотора і САР рекрутує полімеразу, яка далі розпочинає синтез мРНК.

Описаний сценарій позитивної регуляції реалізується лише за тієї умови, що *lac*-оператори не взаємодіють з *lac*-репресором. У разі відсутності лактози (коли відповідні ферменти її утилізації напевно не потрібні) гомодимери репресора (незалежно від можливої присутності САР) зв'язуються з двома операторами і при цьому взаємодіють між собою: утворюється тетрамерний комплекс, що утримує петлю ДНК. У середині петлі розташований промотор, і це абсолютно запобігає зв'язуванню з ним РНК-полімерази. Коли з'являється лактоза, її невелика кількість перетворюється на алолактозу, яка спрацьовує як індуктор *lac*-оперона: зв'язування алолактози з репресором індукує втрату його спорідненості до оператора. Унаслідок руйнування петлі РНК-полімераза зв'язується з промотором і оперон починає працювати.



*Рис. 24. Негативна регуляція *lac*-оперона *lac*-репресором*

На вставках: структура димеру репресора в комплексі з оператором(а, 1JWL) і тетрамерний комплекс із двома операторами(б, 1LBG)

РНК - полімерази I, II, III.

В еукаріотичних клітинах функціонують РНК-полімерази трьох типів:

- РНК-полімераза I працює на кластерах генів рибосомної РНК і здійснює синтез рРНК 18S, 28S та 5,8S.
- РНК-полімераза II транскрибує білкові гени, а також гени маленьких ядерних РНК та інших РНК, що не транскрибуються.
- РНК-полімераза III здійснює синтез тРНК, рибосомної РНК 5S і кількох інших низькомолекулярних РНК.

Кожна з цих полімераз містить чотири гомологічні корові субодиниці, які є водночас гомологами субодиниць α , β і β' прокариотичної полімерази. Крім того, до складу полімераз входять п'ять спільних для всіх трьох ферментів субодиниць, а також певний набір специфічних субодиниць (у кількостях 5, 3 і 7 для РНК-полімераз I, II та III відповідно). Загальна архітектура еукаріотичних полімераз (наявність щелеп, між якими зв'язується ДНК, каналу виходу РНК, вторинного каналу для входу нуклеозидтрифосфатів) дуже схожа на таку прокариотичної полімерази. Між про- та еукаріотичними полімеразами спостерігається також висока гомологія внутрішньої поверхні щілини щелеп та активного центру; спільними є й основні механізми роботи полімераз. Проте відсутня гомологія зовні: додаткові до чотирьох корових субодиниць еукаріотичних полімераз створюють специфічну поверхню для взаємодії з елементами еукаріотичної системи транскрипції.

Поняття про цис-і транс-регуляції транскрипції.

Зрозуміло, що гени не транскрибуються постійно, а вмикаються/вимикаються в певні моменти залежно від зовнішніх умов, стадій клітинного циклу тощо. Головними елементами, взаємодія між якими зумовлює активацію чи репресію транскрипції, є цис- і транс-елементи.

Цис-елементи – це регуляторні елементи послідовності ДНК, які фізично зв'язані з даним геном; у прокариотів часто називаються операторами і перебувають у безпосередній близькості до промоторів.

Транс-елементи – білкові фактори транскрипції, які вільно дифундують (транспортуються) у просторі клітини, шукаючи свій цис-елемент, до якого вони мають специфічну спорідненість. Якщо зв'язування транс-елементу з оператором приводить до активації транскрипції (часто за рахунок прямих білок-білкових взаємодій транскрипційного фактору з РНК-полімеразою, які підвищують її спорідненість до промотора), кажуть, що фактор є активатором і здійснює позитивну регуляцію.

Якщо фактор блокує зв'язування РНК-полімерази (часто за рахунок зниження доступності промотора), його називають репресором і йдеться про негативну регуляцію. Ці загальні принципи регуляції, які, ускладнюючись, зберігаються також в еукаріотів, реалізуються на стадії ініціації. Крім того, для регуляції використовуються інші моменти процесу транскрипції. Зокрема, для регуляції певних генів застосовується механізм антитермінації, коли активатори транскрипції запобігають розпізнання РНК-полімеразою сигналів термінації, що містяться всередині кодуєчої частини гена. Якщо

фактори відсутні, ген неактивний: наявність термінуючого сигналу зумовлює термінацію транскрипції та визволення нефункціонального РНК-продукту.

Регуляторні Білки (від лат. *Regulo*-приводжу в порядок, налагоджую), група білків, які беруть участь у регуляції різних біохімічних процесів. Регуляторні білки - білки, які взаємодіють з ДНК і керують експресією генів (вираз гена в ознаках і властивостях організму). Переважна більшість таких регуляторних білків функціонує на рівні транскрипції (синтез матричних РНК, або мРНК, на ДНК-матриці) і відповідає за активацію або репресію (придушення) синтезу мРНК (відповідно білки-активатори і білки-репресори).

Відомо близько 10 репресорів. Найбільше вивчені серед них репресори прокариотів (бактерії, синьозелені водорості), що регулюють синтез ферментів, що беруть участь у метаболізмі лактози (lac-репресор) в *Escherichia coli* (*E.coli*), і репресор бактеріофага λ , їх дія реалізується шляхом зв'язування зі специфічними ділянками ДНК (операторами) відповідних генів і блокування ініціації транскрипції кодованих цими генами мРНК.

Репресор, зазвичай, являє собою димер з двох ідентичних поліпептидних ланцюгів, орієнтованих у взаємно протилежних напрямках. Репресор фізично перешкоджає РНК-полімеразі приєднатися до ДНК в промоторні ділянці (місце зв'язування ДНК-залежної РНК-полімерази-ферменту, що каталізує синтез мРНК на ДНК-матриці) і почати синтез мРНК. Припускають, що репресор перешкоджає тільки ініціації транскрипції і не впливає на елонгацію мРНК.

Репресор може контролювати синтез будь-якого одного білку або цілого ряду білків, експресія яких носить координований характер. Як правило, це ферменти, що обслуговують один метаболічний шлях; їх гени входять до складу одного оперону (сукупність пов'язаних між собою генів і прилеглих до них регуляторних ділянок).

Багаточислені репресори можуть існувати як в активній, так і в неактивній формі залежно від того, пов'язані вони чи ні з індукторами або корепресорами (відповідно субстрати, у присутності яких специфічно підвищується або знижується швидкість синтезу певного ферменту); ці взаємодії мають нековалентну природу.

Для ефективної експресії генів необхідно не тільки, щоб репресор був інактивований індуктором, але також реалізувався і специфічний позитивний сигнал включення, який опосередкує регуляторні білки, працюючими «в парі» з циклічним аденозинмонофосфатом (цАМФ). Останній зв'язується зі специфічними регуляторними білками (так званними CAP-білок-активатор катаболічних генів, або білковий активатор катаболізму-БАК). Це димер з молекулярною вагою 45 тис. Після зв'язування з цАМФ він набуває здатність приєднуватися до специфічних ділянок на ДНК, різко збільшуючи ефективність транскрипції генів відповідного оперона. При цьому CAP не впливає на швидкість росту ланцюга мРНК, а контролює стадію ініціації транскрипції-приєднання РНК-полімерази до промотора. На противагу репресору CAP (в комплексі з цАМФ) полегшує зв'язування РНК-полімерази

з ДНК і робить акти ініціації транскрипції більш частими. Ділянка приєднання CAP до ДНК примикає безпосередньо до промотору з боку протилежного до того, де локалізований оператор.

Позитивну регуляцію (наприклад, *lac*-оперону *E.coli*) можна описати спрощеною схемою: при зниженні концентрації глюкози (основне джерело вуглецю) збільшується концентрація цАМФ, який зв'язується з CAP, а утворений комплекс – з *lac*-промотором. В результаті стимулюється зв'язування РНК-полімерази з промотором і зростає швидкість транскрипції генів, які кодують ферменти, що дозволяють клітині перемикатися на використання іншого джерела вуглецю – лактози. Існують інші спеціальні регуляторні білки (наприклад, білок C), функціонування яких описується більш складною схемою; вони контролюють вузький спектр генів і можуть виступати в ролі як репресорів, так і активаторів.

Інший різновид регуляторних білків змінює каталітичні властивості РНК-полімерази (т.наз білки-антитермінатори). Так, у бактеріофага X відомі два таких білка, які модифікують РНК-полімеразу так, що вона не підкоряється клітинним сигналам термінації (закінчення) транскрипції (це необхідно для активної експресії фагових генів).

Коактиватори і корепресори

Коактиватор транскрипції (transcriptional coactivator): кофактор транскрипції, який активує транскрипцію, не зв'язуючись з ДНК безпосередньо. Активація обумовлена зв'язуванням коактиватора з чинниками транскрипції і з комплексом РНК-полімерази з промотором. Коактиватор утворює «міст» між чинниками транскрипції і комплексом транскрипції.

Коактиватори транскрипції були виявлені у дріжджів при дослідженні фактора транскрипції TFIID, який необхідний для повноцінної ініціації транскрипції РНК-полімеразою II. Було встановлено, що один з основних компонентів TFIID - ТАТА-зв'язуючий білок ТВР здатний забезпечувати базальну, але не індуквану транскрипцію *in vitro*. На підставі цього було висловлено припущення, що він додатково повинен містити ТВР-асоційовані фактори (ТАФ), які відрізняються від основних факторів і активаторів транскрипції. Після клонування генів ТАФ-факторів та очищення кодованих цими генами білків з'ясувалося, що ТАФ-білки забезпечують фізичну взаємодію між активаторами транскрипції і основними чинниками, оскільки вони мають здатність зв'язувати білки обох груп. Ті ж функції властиві SRB-білкам дріжджів. Таким чином, коактиватори транскрипції є білками-адаптерами, що забезпечують перенесення регуляторного сигналу від тканино специфічних білків-активаторів транскрипції до РНК-полімерази II.

Послідовності нуклеотидів промоторних ділянок генів, з якими взаємодіють молекули репресора, отримали назву операторів. У багатьох випадках репресор зв'язується з оператором тільки в присутності низькомолекулярного ліганда, який специфічно взаємодіє з репресором.

Такі низькомолекулярні ефектори отримали назву **корепресорів**. Вони часто потрібні для функціонування білків-активаторів транскрипції. Найпростіший механізм репресії полягає в 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 можуть надавати негативну дію на етапи ініціації, що відбуваються після зв'язування РНК-полімерази з промотором. Наприклад, молекули репресора gal-оперону *E. coli*, пов'язані з операторами OE і OI, центри послідовностей яких розташовані відповідно на відстанях -60,5 і +53,5 по відношенню до точки ініціації транскрипції, викликають утворення петлі ділянки ДНК, укладеного між ними, але не перешкоджають взаємодії РНК-полімерази з промотором. Вони діють на етапи ініціації, що передують утворенню першого фосфодиефірного зв'язку. Якщо тільки одна молекула репресора зв'язується із зовнішнім оператором OE, він частково інгібує транскрипцію шляхом взаємодії з альфа-субодиницею РНК-полімерази. Це супроводжується зниженням рівня, але не повним припиненням синтезу РНК gal-оперону, тобто більш тонким зміною рівня експресії відповідних генів.

Хроматин — комплекс молекул ДНК та специфічних білків, що складає хромосоми. В клітинах еукаріотів хроматин знаходиться в ядрі, а в клітинах бактерій та архей — у нуклеоїді. Основні білки, що входять до складу хроматину еукаріотів та архей — гістони; бактерії, що не мають гістонів, мають менш щільно упакований хроматин. Багато інших білків також грають важливі ролі, їх роль заключаються у зберіганні ДНК, контролі доступності ДНК, її модифікаціях, реплікації та експресії генів. Слово «хроматин» походить від лат. *chroma* — «колір», і виникло через його контрастне фарбування деякими барвниками.

За допомогою гістонів ДНК упакована у так називаємі нуклеосоми, структури на яких намотані нитки молекул ДНК. Нуклеосоми розташовуються досить регулярно, так що структура, що утворюється, нагадує намисто. Нуклеосома складається з білків чотирьох типів: H2A, H2B, H3 і H4. В одну нуклеосому входять по два білки кожного типу — всього вісім білків. Гистон H1, більший чим інші гістони, зв'язується з ДНК в місці її входу на нуклеосому. Нуклеосома разом з H1 називається *хроматосомой*.

Нитка ДНК з нуклеосомами утворює нерегулярну соленоїд-подібну структуру завтовшки близько 30 нанометрів, так звану 30 нм фібрилу. Подальша упаковка цієї фібрили може мати різну щільність. Якщо хроматин упакований щільно, його називають конденсованим або гетерохроматином, він добре видимий під мікроскопом. ДНК знаходиться в гетерохроматині не доступна для транскрипції, звичайно цей стан характерний для незначущих ділянок, або «замовчених» ділянок, не потрібних на даній стадії розвитку клітини. В інтерфазі клітинного циклу гетерохроматин зазвичай розташовується по периферії ядра (пристіночний гетерохроматин). Повна конденсація хромосом відбувається перед поділом клітини. Якщо хроматин

упакований нещільно, його називають eu- або інтерхроматином. Цей вид хроматину набагато менш щільний при спостереженні під мікроскопом і зазвичай характеризується наявністю активності транскрипції. Щільність упаковки хроматину багато в чому визначається модифікаціями гістонів — *ацетилюванням і фосфорилуванням*.

Вважається, що в ядрі клітин еукаріотів існують так звані функціональні домени хроматину, ДНК одного домену містить приблизно 30 тисяч пар основ, тобто кожна ділянка хромосоми має власну «територію». Вважається, що існує специфічне зв'язування хромосом із ділянками ядерної мембрани, проте питання просторового розподілу хроматину в ядрі вивчене поки недостатньо. Наприклад, запропоновано теорію, що теломерні (кінцеві) і центромерні (що відповідають за скріплення сестринських хроматид в мітозі) ділянки хромосом закріплені на білках ядерної ламіни.

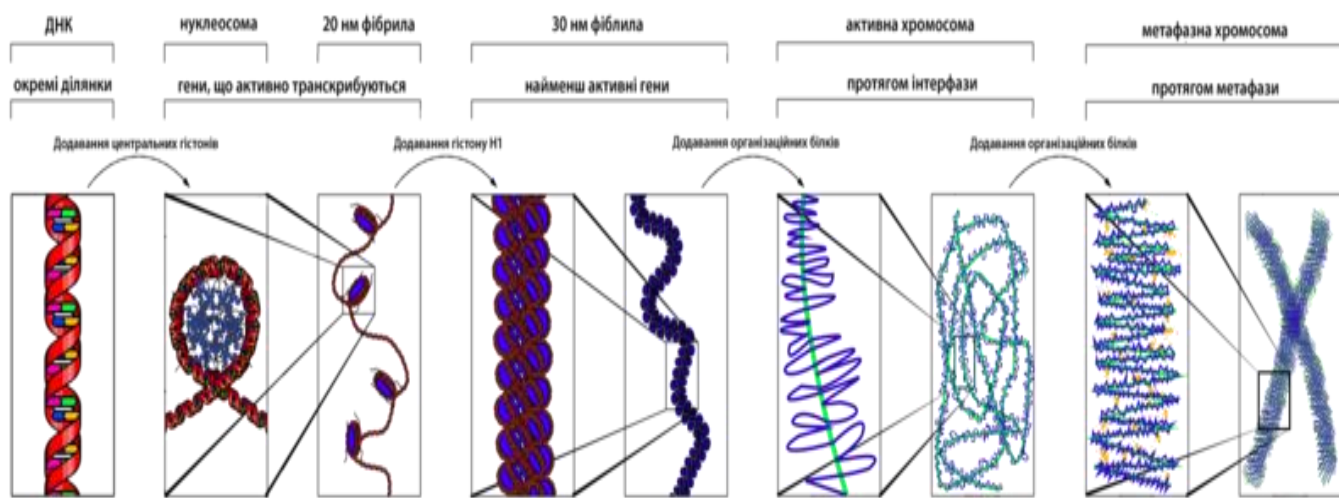


Рис. 25. Основні структури упаковки ДНК: ДНК, нуклеосома, 10 нм фібрила, 30 нм фібрила і хромосома під час метафази.

Процес реалізації спадкової інформації - складний процес, що вимагає постійної регуляції активності генів. Кожна клітина організму має повний набір інформації, що надійшов в зиготу з гаметами батьків. Однак у різних клітинах організму, а також в одній і тій же клітині, але в різні періоди її життєдіяльності якісний і кількісний склад білків різний. Ці відмінності обумовлені тим, що в кожній даній момент часу в клітинах організму в активному стані знаходиться лише невелика частина (близько 10%) всього генома. Причому в різних клітинах в різні періоди життя функціонують різні гени, що обумовлюють синтез різних білків. Навіть у функціонуючих генів активність постійно змінюється залежно від потреб клітини в білках, що синтезуються. Таким чином, регуляція активності генів є найважливішим моментом в процесі реалізації укладеної в них спадкової інформації. Регуляція може здійснюватися за принципом зворотного зв'язку, коли продукт діяльності гена, наприклад білок-фермент, що каталізує синтез будь-якої речовини, забезпечує накопичення цієї речовини в таких кількостях, що

воно починає пригнічувати активність відповідного гену. Зменшення синтезованої речовини, пов'язане з нестачею білку-ферменту, знову активує діяльність гену, відповідального за цей білок-фермент. У процесах регуляції генетичної активності більшу роль відіграють гени-регулятори, які керують активністю структурних генів, що визначають синтез структурних білків або білків-ферментів, а також різних видів тРНК і рРНК

Нуклеосома. Білковий компонент нуклеосоми - гістони, які є одним з найбільш еволюційно консервативних класів білків. Усі корові гістони (містять від 102 до 135 амінокислотних залишків) мають спільну схему будови. У первинній структурі виділяють дві частини: глобулярну та N-кінцеву невпорядковану (хвіст) довжиною від 20 (H2A) до 40 (H3) амінокислотних залишків. Гістон H2A має також помітний C-кінцевий хвіст довжиною близько 15 залишків. Невпорядковані хвости практично не містять гідрофобних залишків, збагачені позитивно зарядженими амінокислотами і є субстратами для численних посттрансляційних модифікацій. Глобулярна частина всіх корових гістонів, у свою чергу, також має спільну структуру. Вона виглядає як характерний триспиральний гістоновий мотив (histone fold), у якому одна довга α -спіраль фланкована двома короткими (див. рис. 26, а). Гістон H3 містить також додаткову α -спіраль з боку N-кінця мотиву (α N-спіраль), а гістон H2B додаткову α C-спіраль. Гістоновий мотив не формує гідрофобного ядра, закранованого від розчинника, значна кількість гідрофобних залишків опиняється на поверхні.

Унаслідок цього одна молекула корового гістону не може існувати як окремий глобулярний білок у водному середовищі. Мінімальними стабільними структурними одиницями є гетеродимери H2A-H2B та H3-H4. Два гістонові мотиви формують у складі димерів щільне гідрофобне ядро, а специфічність формування димерів залежить від наявності додаткових α N- та α C-спіралей у гістонах H3 та H2B відповідно. На поверхні димеру розташовані три зони скупчення позитивно заряджених амінокислотних залишків, які, відповідно до електростатичного механізму, здатні взаємодіяти з ДНК. У межах кожного такого сайту є принаймні один залишок аргініну, який відіграє найважливішу роль у взаємодії з ДНК. Разом ці три сайти створюють платформу для зв'язування ділянки ДНК довжиною 27 та 28 пар основ.

Два гетеродимери H3-H4 взаємодіють між собою за рахунок утворення чотириспирального пучка між гістоновими мотивами двох молекул H3. У результаті формується тетраметр (H3-H4)₂ - центральний комплекс у структурі нуклеосоми. Структура тетрамеру нагадує підкову, яка характеризується хіральною - утворює елемент лівої спіралі. Вісь симетрії тетрамерного комплексу (яка водночас є і віссю симетрії всієї нуклеосоми) проходить через інтерфейс між двома молекулами H3.

Аналогічний за своєю структурою чотириспиральний пучок між гістоновими мотивами молекул H4 та H2B забезпечує взаємодію між тетраметром (H3-H4)₂ і димером H2A-H2B. Таким чином, і підкова -

тетрамеру симетрично продовжується двома димерами Н2А-Н2В в обидва боки, результатом чого є утворення октамеру (Н2А-Н2В-Н3-Н4)₂. Отже, глобулярні частини гістонів утворюють октамерний комплекс, який і служить білковим кором нуклеосоми. На глобулярній поверхні октамеру існує своєрідний трек позитивно заряджених амінокислотних залишків, який використовується для взаємодії з нуклеосомною ДНК довжиною 145 пар основ.

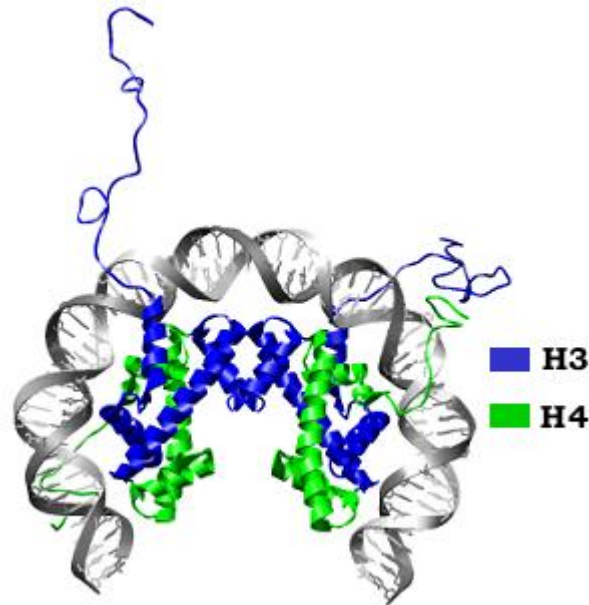


Рис. 26. Тетрамер пістонів (Н3-Н4)₂ у комплексі з ДНК у складі нуклеосоми (1КХ5)

Окрема нуклеосома (нуклеосомна кор-частинка) - октамер пістонів + 145 пар основ ДНК може бути вилучена з хроматину за допомогою мікрококової нуклеази: вона робить дволанцюговий розріз у ДНК, а оскільки один із ланцюгів нуклеосомної ДНК завжди взаємодіє з гістонами (рис. 27), доступною для нуклеази є лише ДНК за межами нуклеосоми. У хроматині вся ДНК формує нуклеосоми із середньою щільністю одна нуклеосома на 200 пар основ, сусідні нуклеосоми з'єднані міжнуклеосомними лінкерними (linker) ділянками. Нуклеосомна ДНК разом з лінкерною ділянкою складають так званий нуклеосомний повтор, довжина якого (середнє значення 200 пар основ) варіює як уздовж полінуклеосомного ланцюга, так і залежно від функціонального стану, типу клітин тощо.

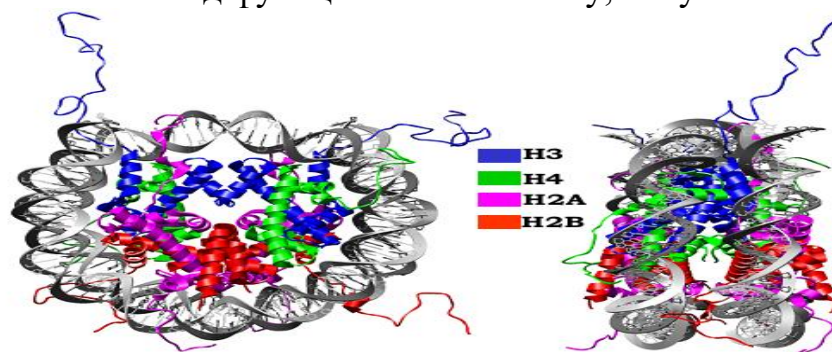


Рис. 27. Структура нуклеосоми у двох проєкціях(1КХ5)

Хромосома — це велика молекулярна структура, де міститься близько 90 % ДНК клітини. Всі хромосоми містять дуже довгий безперервний полімеризований ланцюг ДНК (єдину ДНК-молекулу), що містить гени, регуляторні елементи та проміжні нуклеотидні послідовності.

Слово «хромосома» походить від грецьких слів «хрома» — колір та «сома» — тіло. Хромосоми еукаріот складаються з лінійної макромолекули ДНК, що намотана на специфічні білки-гістони, формуючи матеріал під назвою «хроматин». В клітинах прокаріот звичайно міститься єдина хромосома, яка, на відміну від еукаріот, є кільцевою та позбавленою гістонів. Втім, це правило не є абсолютним: існують бактерії з більше, ніж одною хромосомою; у деяких бактерій хромосоми є лінійними; у кількох видів архей виявлені специфічні гістони.

Хромосоми можуть перебувати в двох структурно-функціональних станах: в конденсованому (спіралізованому) та деконденсованому (деспіралізованому). В інтерфазі хромосоми живої клітини невидимі, спостерігати можна лише гранули хроматину, бо в цей період хромосоми частково або повністю деконденсовані. Це є їхнім робочим станом, бо в більш дифузному хроматині активніші процеси синтезу. Під час мітотичного поділу клітини, коли відбувається конденсація хроматину, хромосоми добре помітні.

Будова Хромосоми

Хроматином називають комплекс ДНК та білків. До складу хроматину входять два типи білків — **гістонові** та **негістонові**.

ДНП. Найменшими структурними компонентами хромосом є нуклеопротейдні фібрили, їх видно винятково в електронний мікроскоп. Хромосомні нуклеопротейди — ДНП (дезоксирибонуклеопротейди) — складаються з ДНК і білків (переважно гістонів).

Нуклеосоми, хромонеми, хроматиди. Молекули гістонів утворюють групи — нуклеосоми. Кожна нуклеосома містить в собі 8 білкових молекул. Розмір нуклеосоми приблизно 8 нм. З кожною нуклеосомою пов'язана ділянка ДНК, що спіралью обплітає нуклеосому ззовні. В такій ділянці ДНК знаходиться 140 нуклеотидів загальною довжиною 50 нм, але завдяки спіралізації довжина скорочується в 5 разів.

В хроматині близько 87 — 90 % довжини ДНК зв'язано з нуклеосомами. Фібрили ДНП попарно закручуються, утворюючи **хромонеми** (від гр. chroma — колір, nema — струна), які входять до комплексів вищого порядку — також спіралью закручених **напівхроматид**. Пара напівхроматид утворює **хроматиду**, а пара хроматид - **хромосому**. На різних ділянках однієї хромосоми спіралізація, компактність її основних елементів неоднакова; із цим пов'язана різна інтенсивність окрашування окремих ділянок.

Гетерохроматичні ділянки. Ті ділянки хромосоми, які інтенсивно сприймають барвники, називають **гетерохроматичними** (складаються з гетерохроматину); вони навіть в інтерфазі залишаються компактними і видимі в світловий мікроскоп.

Гетерохроматин виконує переважно структурну функцію. Він перебуває в інтенсивно конденсованому (спіралізованому) стані і займає одні й ті самі ділянки в гомологічних хромосомах, утворює ділянки, які прилягають до центромери та кінці хромосоми. Втрата гетерохроматинових ділянок може й не позначатися на життєдіяльності клітини.

Гетерохроматин і тільця Барра. Вирізняють також факультативний гетерохроматин, який виникає при спіралізації та інактивації двох гомологічних хромосом. Так, зокрема, утворюється тільце Барра (Х-статевий хроматин), що його утворює одна з Х-хромосом жіночих особин ссавців, в тому числі людини.

Еухроматичні ділянки. Незабарвлені та менш ущільнені ділянки хромосоми, які деконденсуються та стають невидимими в період інтерфази, містять еухроматин і тому називаються еухроматичними. Вважають, що саме в них розміщено найбільше генів.

Хромосоми під час поділу клітини, в період метафази, мають вигляд ниток, палочок тощо. Будова однієї хромосоми на різних ділянках неоднакова. В хромосомі розрізняють первинну перетяжку і два плеча.

Первинна перетяжка, або центромера, — найбільш спіралізована частина хромосоми. На ній розміщений **кінетохор** (гр. kinesis — рух, phoros — той, що несе), до якого під час поділу клітини кріпляться нитки веретена поділу. Місце розташування центромери в кожній парі хромосом постійне, воно обумовлює їхню форму.

В залежності від розташування центромери виділяють три типи хромосом: **Метацентричні**, **субметацентричні** і **acroцентричні**. **Метацентричні** хромосоми мають плечі майже однакової довжини; в **субметацентричних** плечі нерівні; **acroцентричні** хромосоми мають палочковидну форму з дуже коротким, майже непомітним другим плечем. Можуть виникати і **телоцентричні** хромосоми — як результат відриву одного плеча, коли центромера розташована на кінці хромосоми. В нормальному каріотипі такі хромосоми не зустрічаються.

Теломери. Кінці плечей хромосоми називають теломерами, це спеціалізовані ділянки, які перешкоджають з'єднанню хромосом між собою або з їхніми фрагментами. Кінець хромосоми, який не має теломери, стає «ненасиченим», «липким», і легко приєднує фрагменти хромосом або з'єднується з подібними ділянками. У нормі ж **теломери** зберігають хромосому як дискретну індивідуальну одиницю.

Супутники. Деякі хромосоми мають глибокі вторинні перетяжки, що відділяють окремі ділянки хромосоми — супутники. Такі хромосоми можуть зближуватись і утворювати асоціації, а тонкі нитки, які з'єднують супутники з плечами хромосом, при цьому беруть участь в утворенні ядерця. Саме ці ділянки в хромосомах людини є організаторами ядерця. У людини вторинні перетяжки є на довгому плечі 1, 9 та 16 хромосом та на кінцевих ділянках коротких плечей 13, 14, 15, 21, 22 хромосом.

Хромомери. В плечах хромосом видно товстіші та інтенсивніше забарвлені ділянки — хромомери, які чергуються із міжхромомерними

нитками. Внаслідок цього хромосома може нагадувати низку нерівномірно нанизаного намиста.

Нуклеосоми і транскрипція. Суттєвою особливістю еукаріотів є та обставина, що ДНК клітинного ядра організована у складні хроматинові структури. Нуклеосоми та хроматинова фібрила в цілому виступають як загальний репресор генної активності. Тим самим вони допомагають забезпечити загальну інактивацію більшості генів в еукаріотичній клітині, за винятком тих, чия активація здійснюється за участю АТФ. Активація транскрипції потребує перебудов структури хроматину в напрямку деконденсації хроматинової фібрили та визволення цис-елементів від нуклеосом. Для реалізації таких перебудов є два основні інструменти, які діють у тісній координації один з одним: система посттрансляційних модифікацій гістонів і АТР-залежні комплекси ремоделювання хроматину, що проводять репозиціонування нуклеосом. Специфічна картина (патерн) гістонових модифікацій відіграє також і зворотню роль у здійсненні гарантованої репресії певних ділянок хроматину.

Серед інших модифікацій, ацетилювання залишків Lys (у певних консервативних позиціях) майже завжди корелює з активацією транскрипції, ацетильовані гістон-ацетилтрансферазами (НАТ) гістони акумулюються в активних промоторах, і навпаки, дія гістон-деацетилаз приводить до інактивації. Ацетилтрансферази та деацетилази постійно безадресно працюють у хроматині, підтримуючи певний базовий баланс ацетилювання/деацетилювання гістонів. При активації певного промотора ацетилтрансферази здійснюють адресне гіперацетилювання, а після зникнення активуючого сигналу деацетилази повертають промотор до базового неактивного стану. Деацетилази також можуть бути адресно рекрутовані до промоторів репресорами транскрипції для підтримання гарантованого деацетильованого статусу.

НАТ входять до складу мультібілкових комплексів, які часто є компонентами енхансом. Часто у складі НАТ присутні *бромодомени* - структурні модулі, що мають специфічну спорідненість до ацетильованих лізинів. Тобто НАТ упізнають Lys, уже ацетильовані іншими НАТ, і здійснюють ацетилювання сусідніх нуклеосом, підтримуючи, таким чином, ацетильований статус певної ділянки хроматину. Ацетилювання гістонів сприяє деконденсації хроматинової фібрили за рахунок зниження позитивного заряду головних факторів конденсації, якими є гістонові хвости. Розгортання фібрили та тимчасова дисоціація гістона H1 створює «вікно можливості» для зв'язування регуляторних факторів із міжнуклеосомною лінкерною ДНК. Крім того, ацетильовані лізинові залишки гістонів можуть безпосередньо впізнаватися факторами і кофакторами транскрипції. Наприклад, наявність бромодомену у складі TFIID сприяє підвищенню локальної концентрації цього базального фактора транскрипції в ацетильованих ділянках хроматину.

Підвищення доступності промоторів під час їхньої активації потребує також інших спеціальних механізмів. Справа в тому, що за фізіологічної

іонної сили електростатичні взаємодії ДНК і гістонів дуже міцні й нуклеосома зберігає високу стабільність, яка практично виключає навіть переміщення нуклеосоми вздовж ДНК. Оскільки переміщення нуклеосом є необхідним для експонування регуляторних сайтів на ДНК до дії транскрипційних факторів, у клітині існує спеціальна система: комплекси ремоделювання хроматину (КР), які часто є компонентами енхансосома. КР є АТР-залежними мультибілковими молекулярними машинами, які забезпечують переміщення нуклеосом уздовж хроматинової фібрили (репозиціювання) і сприяють тимчасовому видаленню нуклеосом із активних промоторів на білки, що є проміжними переносниками гістонів. КР здатні здійснювати численні взаємодії з нуклеосомною ДНК, гістоновими хвостами, специфічними та загальними факторами транскрипції, гістон-ацетильтрансферазами тощо. Слід зауважити, що дія комплексів ремоделювання приводить не обов'язково до активації транскрипції, а також і до репресії - залежно від контексту інших функціонально важливих впливів, у кооперації з якими працює даний комплекс.

Експресія гістонових генів та збирання нуклеосом. Під час реплікації материнські гістони випадково розподіляються по обом ланцюгам ДНК. Знову синтезовані гістони доповнюють нуклеосоми. Поділ нуклеосом і додавання нових гістонів, ступінь реплікації і синтез гістонів чітко координуються.

Під час S-фази відбувається синтез ДНК, синтез гістонів та утворення нуклеосом. Ці три події починаються одночасно на початку S-фази. Якщо пригнічувати синтез ДНК інгібіторами, то пригнічується і синтез гістонів. Механізм точного контролю невідомий. При інгібуванні синтезу гістонів або збірки хроматину також відбувається інгібування синтезу ДНК. Людський білок HIRA (histone regulator A) відповідальний за контроль синтезу гістонів. Hir1p, Hir2p-репресор транскрипції гістонів Sc. В фібробластах Hs HIRA локалізується з HDAC4. HIRA - субстрат цикліну A або E/cdk2 в S-фазі. Фосфорилування HIRA цикліном/cdk2 регулює експресію гістонів під час клітинного циклу. SLBP - стабілізуючий білок гістонових мРНК. CAF1 (Chromatin Assembly Factor) - білковий комплекс з 3 субод: 150, 60, 50 кДа знову пов'язує гістони H3 і H4 з ДНК з утворенням тетрамера, містить p150, p60 і p48. Активність CAF1 залежить від зв'язку p150CAF1 з p60CAF1 і з допоміжними факторами реплікації, PCNA. Знову синтезовані H3 і H4 зв'язуються першими двома субодинами (150, 60), з яких 150 кДа володіє зарядженим доменом, а інший містить в своєму складі WD-повтор (TrpAsn). Потім до нуклеосоми додаються H2A і H2B так само за участю шаперонів з утворенням октамерів. Шаперони здатні запасати гістони, переміщати до ядра, обмінювати гістони на ДНК, укладати гістони в нуклеосому. Транскрипція ДНК в нуклеосомі пригнічується Swi-Snf комплексом.

Гістони — основний клас білків, необхідних для збірки й упаковки молекул ДНК у хромосоми. В еукаріотів гістони є нуклеопротеїнами, тобто знаходяться в клітинному ядрі, в архей типу Euarchoeota гістони знаходяться в цитоплазмі. Бактерії та решта архей не мають гістонів, хоча інколи мають

дещо відмінні гістоноподібні білки. Існує п'ять різних типів гістонів, а саме Н1, Н2А, Н2В, Н3 та Н4. Послідовність амінокислот у цих білках мало відрізняється серед еукаріотів різного рівня організації. Така консервативність їхньої структури свідчить про їхню виняткову важливість для організму.

Характеристика гістонів

гістон	акт	N-плече	C-плече
Н3	135	41	25
Н4	102	32	-
Н2А	129	24	16
Н2В	125	30	23
Н1			

Виділяють 5 фракцій гістонів

Фракція	Лізін	Аргінін	ліз./арг	осн.АК/кис.АК	Мол. вага (Да)
Н1 (дуже багата на лізін)	29%	1%	>20	5.4	23000
Н2В (помірно багата на лізін)	16%	6%	~2.5	1.7	13774
Н2А (помірно багата на лізін і аргінін)	11%	9%	~1	1.4	13960
Н4 (багата на аргінін і глі)	11%	14%	~0.8	2.5	11282
Н3 (дуже багата на аргінін); є цис, в інших – нема	10%	13%	~0.7	1.8	15348

Гістони прокариотів. Нуклеоїд прокариотів представляє ~ 100 петель. Ці петлі конденсовані основними протеїнами та іншими погано вивченими факторами. НУ білки (Nu-1 і Nu2) ~ 18кДа існують як гетеродимери. Н-NS білок 16,5 кДа формує димер зв'язуючий ДНК. Є ~ 20000 Н-NS молекул, що складає один димер на ~ 400пн ДНК.

Структура хроматину в районах ініціації реплікації. Зрозуміло, що нуклеосоми є суттєвим бар'єром на шляху реплісоми. Попереду реплікативної вилки відбувається деком-пактизація хроматинової фібрили й тимчасове видалення відносно легко взаємодіючого з ДНК гістону Н1. Нуклеосоми руйнуються у два етапи (рис. 28): спочатку видаляється димер гістонів Н2А-Н2В, потім найміцніше зв'язаний із ДНК тетрамер (Н3-Н4)². Процес видалення гістонових комплексів забезпечується активністю комплексів ремоделювання хроматину і присутністю проміжних акцепторів гістонів - гістонових шаперонів. Такі шаперони зв'язують гістонові комплекси, що витісняються реплісомою, а потім виконують роль факторів збирання нуклеосом позаду реплікативної вилки. Необхідність таких

факторів визначається надзвичайно високою спорідненістю гістонів до ДНК (рис. 28)

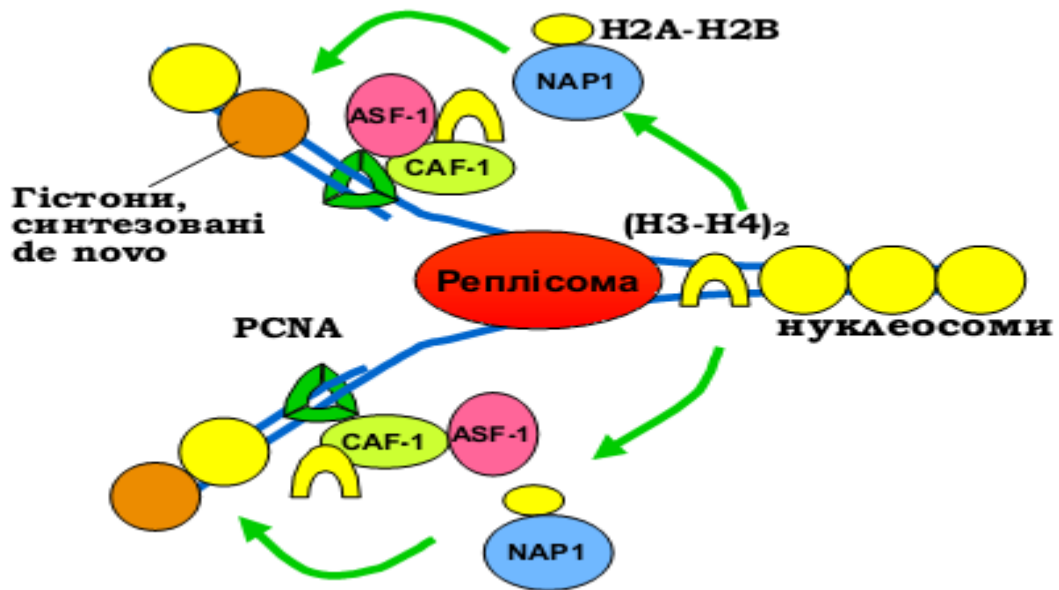


Рис. 28. Руйнування та відновлення нуклеосом у реплікативній вилці.

До найбільш вивчених факторів збирання нуклеосом, що працюють під час реплікації, відносять, зокрема: NAP1 (Nucleosome Assembly Protein), що має підвищену спорідненість до димерів H2A-H2B; CAF1 (Chromatin Assembly Factor) та ASF1 (Anti-Silencing Function) - споріднені до гістонів H3-H4 і PCNA, за рахунок чого тетрамери (H3-H4)₂ спрямовуються до основи реплікативної вилки (рис. 28); RSF (Remodeling and Spacing Factor), який є проміжним акцептором гістонів, а також сприяє регулярному розподілу відновлених нуклеосом на ДНК. Відновлення нуклеосом позаду реплікативної вилки відбувається також у дві стадії: першим на ДНК повертається тетрамер (H3-H4)₂, який зв'язує два димери H2A-H2B. По двох дочірніх ланцюгах ДНК гістонові комплекси розподіляються випадково, до них додаються гістони, синтезовані в цитоплазмі de novo під час реплікації.

Таким чином, «старі» гістони, що несуть на собі певні характерні модифікації, повертаються на ту саму ділянку ДНК обох ланцюгів, на якій вони були присутні на материнській молекулі. До ділянок хроматину рекрутуються відповідні ферменти, котрі здійснюють аналогічні модифікації щойно синтезованих гістонів - патерн модифікацій відновлюється, що сприяє збереженню певного функціонального стану ділянки хроматину в дочірніх клітинах.

Подовження кінців еукаріотичної хромосоми. Ще одна характерна відмінність еукаріотичної хромосоми полягає в тому, що вона, на відміну від прокаріотичної, є лінійною - має два кінці. Унаслідок цієї простої обставини на 3'-кінцях матричних ланцюгів ДНК залишаються одноланцюгові хвости (рис. 29): два РНК-праймери на 5'-кінцях синтезованих ланцюгів видаляються, а прогалина не може бути заповненою, оскільки немає 3'-

кінця, який міг би бути використаним як праймер. Одноланцюгові хвости піддаються швидкій нуклеазній деградації і після кожної реплікації хромосома має вкоротитися.

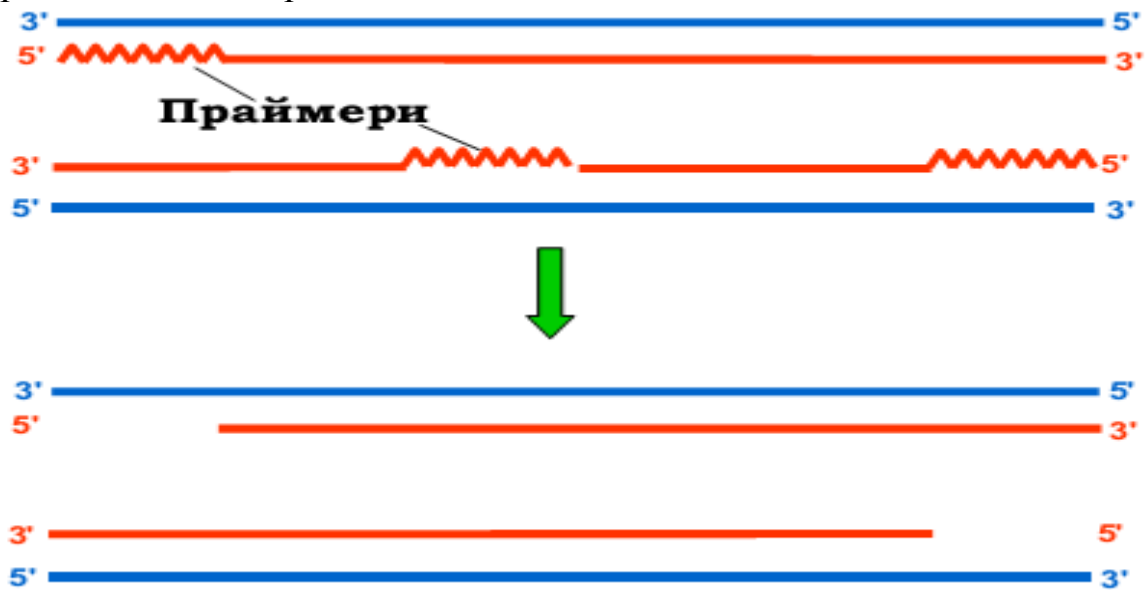


Рис. 29. Дві дочірні лінійні молекули ДНК після реплікації

Кінцеві ділянки ДНК еукаріотичної хромосомий теломери - складаються з невеликих елементів послідовності, що тандемно повторюються - теломерних повторів. Подовження теломер після реплікації здійснюється за допомогою спеціального ферменту - теломерази, яка є РНК-залежною ДНК-полімеразою. РНК-матриця входить до складу самого ферменту і містить ділянку, комплементарну теломерному повтору (рис. 30). Використовуючи цю ділянку як матрицю і 3'-кінець як праймер, теломераза покроково добудовує до 3'-кінця кілька копій теломерного повтору. Далі подовжений одноланцюговий хвіст використовується як матриця для синтезу іншого ланцюга за звичайним реплікативним механізмом. Видалення РНК-праймера після цього не є проблемою, оскільки хромосома вже є подовженою.

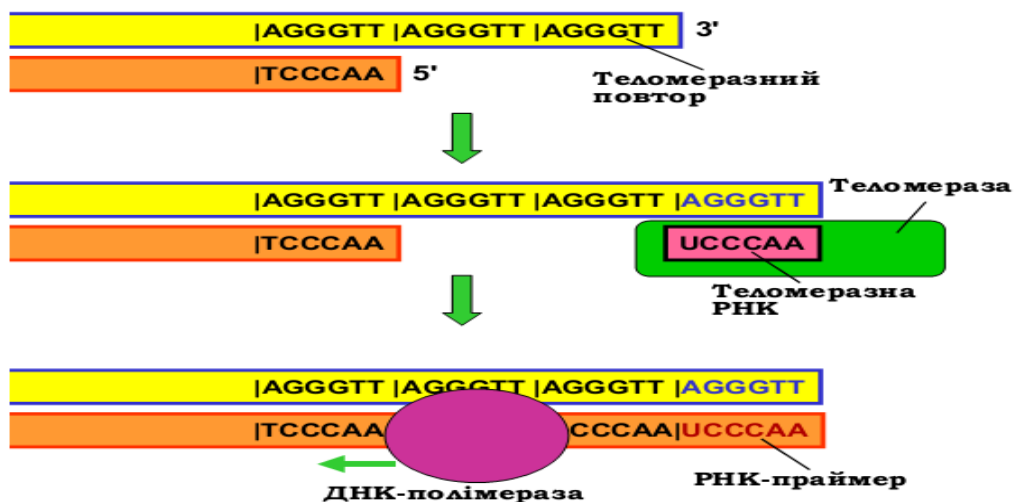


Рис. 30. Подовження кінців хромосоми за допомогою теломерази

Теломераза є активною в клітинах, що розвиваються, і зляккісно трансформованих клітинах і неактивною у диференційованих соматичних клітинах вищих еукаріотів. Відповідно, певне критичне скорочення теломерів, яке відбувається в таких клітинах після кількох десятків клітинних поділів, є одним із механізмів активації програми їхньої загибелі.

Репарація ДНК. Репарація (repair) ДНК - один із загальних біологічних процесів, який спрямований на виправлення помилок синтезу ДНК при реплікації, а також численних пошкоджень, котрі виникають у ДНК унаслідок дії хімічних і фізичних факторів. До таких пошкоджень відносять різноманітні хімічні модифікації азотистих основ, ковалентні зшивки сусідніх піримідинів (утворення піримідинових, найчастіше тимінових, димерів) під дією ультрафіолетового випромінювання, одно- і дволоанцюгові розриви під дією іонізуючої радіації та вільних радикалів тощо. Часто системи репарації працюють під час або відразу після реплікації. Більшість репараційних процесів передбачає видалення пошкодженої одноланцюгової ділянки з наступним синтезом ДНК за допомогою ДНК-полімераз. Але існують і процеси, пов'язані з безпосереднім «виправленням» пошкодженого елемента за рахунок прямої дії певних ферментів.

Пряма репарація. Найочевиднішим випадком прямої репарації є зшивання одноланцюгового розриву ДНК лігазою. Іншим спільним для всіх живих організмів (за винятком ссавців) шляхом прямої репарації є фотореактивація - руйнування піримідинових димерів, які були індуковані ультрафіолетовим світлом, ферментом фотоліазою. Фотоліаза (або її власні амінокислотні залишки, або зв'язані з білком протетичні групи) здатна поглинати світло, що призводить до активації ферменту. Тобто світло, яке викликає утворення піримідинових димерів, одночасно активує фотоліазу, котра каталізує розрив ковалентних зв'язків між сусідніми піримідинами, а отже, відновлення структури ДНК.

Одним із загальних пошкоджуючих впливів на ДНК є алкілування азотистих основ - ковалентне приєднання метильних чи етильних груп до атомів О або N. Пряма репарація таких пошкоджень є можливою за рахунок активності специфічних метилтрансфераз, що відщеплюють метильні групи (таким шляхом репаруються O⁶-метилгуанін та O⁴-метилтимін). Ці метилтрансферази не є ферментами: вони відщеплюють метильну групу й необернено ковалентно приєднують її до залишку Cys у своєму активному центрі - для нового акту деметилювання необхідна нова молекула білка.

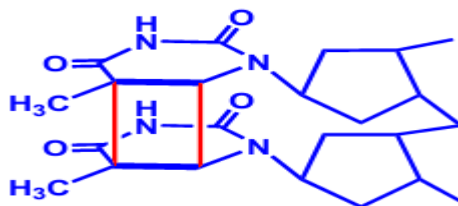


Рис. 31. Тиміновий димер

Ексцизійна репарація. Більш радикальним і ефективним шляхом виправлення порушень нуклеотидів є ексцизійна репарація (excision repair), коли пошкоджена одноланцюгова ділянка вирізається з ДНК, а інший ланцюг використовується далі як матриця для нового синтезу. Існує два варіанти такої репарації. При ексцизійній репарації азотистих основ (Base Excision Repair - BER), що відбувається в усіх організмів, модифікована азотиста основа видаляється ферментом глікозилазою. Існує певна кількість специфічних глікозилаз, що розпізнають різноманітні модифіковані основи. Глікозилаза руйнує глікозидний зв'язок між основою та С1'-атомом дезоксирибози. У ДНК залишається так званий АП-сайт (апуриний/апіримідиновий), який упізнається ендонуклеазою, що гідролізує фосфодієфірний зв'язок між 5'-фосфатом звільненої від основи дезоксирибози та попереднім нуклеотидом. Нарешті фосфодіестераза відщеплює цю фосфодезоксирибозу, і в ДНК залишається прогалина довжиною в один нуклеотид. Ця прогалина заповнюється ДНК-полімеразою β (в еукаріотів), яка приєднує нуклеотид до 3'-ОН групи попереднього нуклеотиду ланцюга.

Фосфодієфірний зв'язок приєднаного нуклеотиду з наступним нуклеотидом ланцюга відновлюється лігазою. У прокариотів заповнення прогалини здійснюється ДНК-полімеразою I. При цьому, за рахунок своєї 5'-екзонуклеазної активності, полімераза може руйнувати певну ділянку з 5'-кінця прогалини, одночасно продовжуючи 3'-кінець. Ексцизійна репарація нуклеотидів (Nucleotide Excision Repair - NER) - процес, пов'язаний із вирізанням ділянки ДНК, яка містить пошкодження (модифіковану основу, тиміновий димер тощо).

У клітинах *E. coli* за цей шлях відповідає система *uvr ABC* (*uvr* - ultra violet repair/ ультрафіолетова репарація). Комплекс білка *uvrB* і двох білків *uvrA* впізнає пошкодження та зв'язується з ДНК у цьому місці (рис. 32). На наступному кроці відбувається АТФ-залежна зміна конформації *uvrB*, вигин ДНК і дисоціація *uvrA*. До комплексу рекрутується білок *uvrC*. Обидва білки у складі комплексу набувають ендонуклеазної активності: *uvrC* робить одноланцюговий розріз у пошкодженому ланцюзі за кілька нуклеотидів у напрямку до 5'-кінця від пошкодження (ліворуч на рис. 32); *uvrB* - розріз з іншого боку від пошкодження. Довжина ділянки між розрізами дорівнює 12 (або 13 у випадку для тимінового димеру) нуклеотидам. Далі геліказа *uvrD* руйнує подвійну спіраль між двома розрізами, тобто видаляє пошкоджену ділянку. Прогалина, що залишилася, заповнюється ДНК-полімеразою I, лігаза остаточно відновлює цілісність ланцюга.

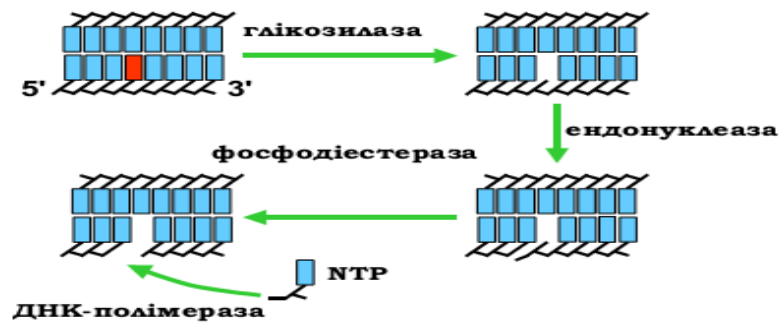


Рис. 32. Екцизійна репарація азотистих основ. Пошкоджена основа забарвлена червоним

Аналогічна система екцизійної репарації працює в еукаріотичних клітинах. До неї залучено близько 17 білків, причому за руйнування подвійної спіралі відповідає геліказна частина загального фактора транскрипції TFIIH. Це забезпечує тісну координацію репарації з транскрипцією: і підвищена ймовірність пошкоджень, і першочергова необхідність виправляти їх виникає насамперед у транскрипційно активних ділянках. Пошкодження розпізнаються або особливими білковими факторами, або РНК-полімеразою, яка робить зупинку на пошкодженому нуклеотиді. Після цього геліказа руйнує ділянку подвійної спіралі довжиною 24-32 пари основ, пошкоджена ділянка вирізається ендонуклеазами, і прогалина заповнюється ДНК-полімеразами δ/ϵ .

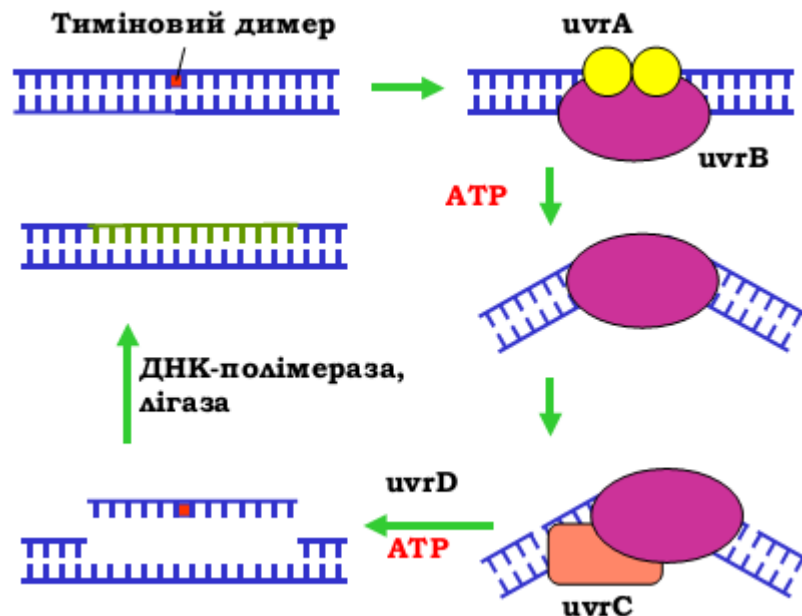


Рис. 33. Система uvrABC екцизійної репарації нуклеотидів у *E. coli*

Репарація некомплементарних пар основ – місметчів. Незважаючи на редагування помилок під час реплікації, певна кількість невірно спарених основ залишається в синтезованих ланцюгах ДНК. Зрозуміло, що при репарації таких місметчів (mismatch) із двох некомплементарних нуклеотидів замінити слід саме той, що входить до синтезованого, а не до матричного ланцюга.

У бактеріальній клітині за репарацію місметчів відповідає так звана система mut HLSU. По бактеріальному геному розподілені (на середній відстані 256 пар основ) короткі паліндромні послідовності CTAG, у складі яких аденін піддається постреплікативному метилюванню. Але певний час після реплікації метильованим є лише матричний (материнський) ланцюг. Саме за цей час і спрацьовує система репарації (рис. 34): білок, що позначається як mutS, упізнає місметч і рекрутує білок mutL, останній взаємодіє з двома білками mutH, які зв'язуються з тетра nukлеотидними паліндромними сайтами по обидва боки від місметча. У складі утвореного комплексу mutH набуває ендонуклеазної активності й робить одноланцюговий розріз у *неметилюваному ланцюзі* в межах одного із сайтів (один із двох сайтів обирається випадково). Далі геліказа mutU (той самий білок, що й uvrD) розплітає подвійну спіраль, а екзонуклеаза руйнує ланцюг від розрізу до місметча й трохи далі. Нарешті прогалина заповнюється ДНК-полімеразою III, і одноланцюговий розрив зшивається лігазою. Система mutHLSU є консервативною, гомологічні білки присутні також і в еукаріотів. Метилювання аденіну не використовується для дискримінації ланцюгів: білки еукаріотичної системи репарації місметчів пов'язані з реплісомою та ланцюгами ДНК, що синтезуються, тобто спрацьовують безпосередньо під час реплікації.

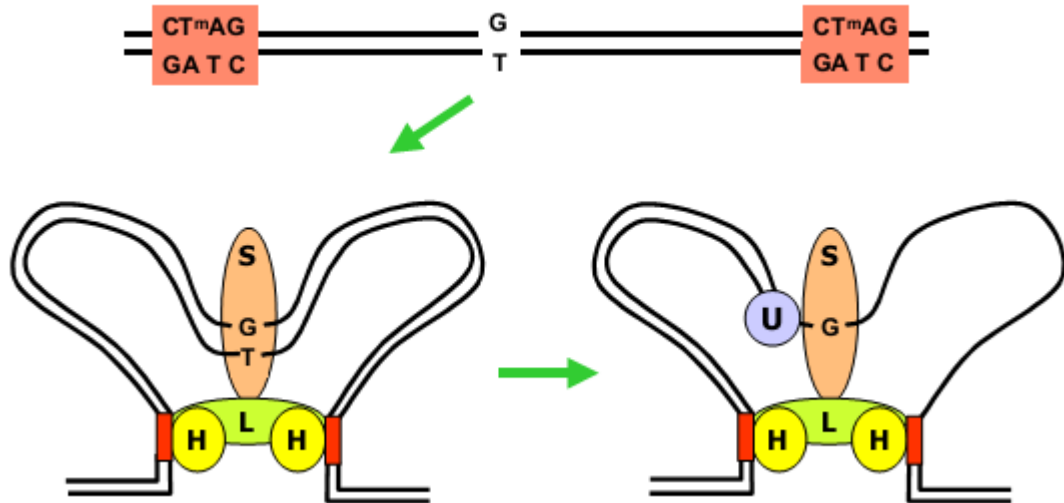


Рис. 34. Система репарації місметчів mutHLSU

Репарація без репарації. Іноді в клітині активуються процеси, які прийнято також називати репарацією, хоча насправді вони є засобом здійснення реплікативного синтезу ДНК, «не звертаючи уваги» на пошкодження її структури. Реплікативна машинерія зазвичай зупиняється, зустрічаючи пошкодження у складі матриці. Якщо таких пошкоджень надто багато, й істинні репараційні системи не встигають їх виправити, перемикання на неточний синтез ДНК дає клітині шанс на виживання. Пошкодження при цьому залишаються і, як наслідок, дають велику кількість мутацій. Усі процеси такого типу зазвичай об'єднують під назвою SOS-

репарації або (що точніше) - механізмів синтезу ДНК, толерантних до пошкоджень (damage tolerance mechanisms).

У прокариотів перемикання на неакуратний синтез, який дозволяє долати перешкоди, відбувається завдяки заміні ДНК-полімерази III на полімераза низької точності синтезу - ДНК-полімераза V (полімераза активується у відповідь на несприятливі умови, наприклад, ультрафіолетове опромінювання). Ця полімераза вставляє напроти тимінового димеру дві довільні нуклеотиди (виникає мутація), після чого замінюється на ДНК-полімераза III, яка продовжує точний синтез. Крім того, долати невеликі одноланцюгові прогалини при SOS-репарації допомагає ДНК-полімераза II полімераза низької точності синтезу. Аналогічно перемикання на полімераза низької точності відбувається і в еукаріотів за наявності в матриці пошкоджених основ, піримідинових димерів тощо.

Інший шлях здійснення реплікації через тиміновий димер у складі матриці отримав назву постреплікативної (рекомбінаційної) репарації. У разі наявності тимінового димеру реплісома може його обійти, залишивши прогалину в ланцюзі, що синтезується (рис. 35). У цьому випадку на місце прогалини шляхом гомологічної рекомбінації вставляється ділянка сестринської молекули ДНК.

Прогалина, що залишається при цьому в сестринській молекулі, легко заповнюється ДНК-полімеразою. Таким чином, як і при SOS-репарації, пошкодження залишається і може бути виправлено пізніше завдяки ексцизійній репарації.

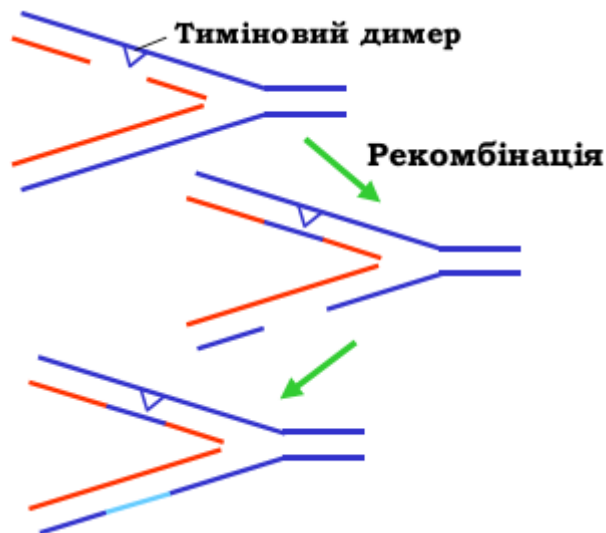


Рис. 35. Постреплікативна (рекомбінаційна) репарація

Репарація дволанцюгових розривів. Точна репарація дволанцюгового розриву ДНК можлива лише під час реплікації, коли розірвана ділянка може бути відновлена завдяки використанню сестринської молекули як матриці за механізмом гомологічної рекомбінації.

В інших випадках цілісність розірваних молекул ДНК відновлюється в консервативному для всіх організмів процесі негомологічного з'єднання кінців (NHEJ - Non-Homologous End Joining\ Не гомологічне об'єднання

кінців). З'єднуються при цьому будь-які кінці ДНК, що, за наявності великої кількості розривів, призводить до об'єднання ділянок різних хромосом, транслокацій тощо.

Ключову роль у процесі NHEJ відіграють білки Ku, які (у гетеродимерній формі) упізнають кінці ДНК, об'єднують їх у нековалентний комплекс і рекрутують до цього комплексу низку інших білків. У складі комплексу відбувається розплітання кінцевих ділянок ДНК і пошук мікрогомології - коротких комплементарних (чи майже комплементарних) одноланцюгових ділянок, які належать різним молекулам (рис. 36). У результаті утворюється короткий дуплекс, зайві одноланцюгові ділянки відщеплюються нуклеазами, лігаза зшиває одноланцюгові розриви. Таким чином, у процесі з'єднання відбувається втрата кількох пар основ. Ця особливість NHEJ-системи використовується при рекомбінації імуноглобулінових генів з метою підвищення розмаїття їхніх послідовностей.

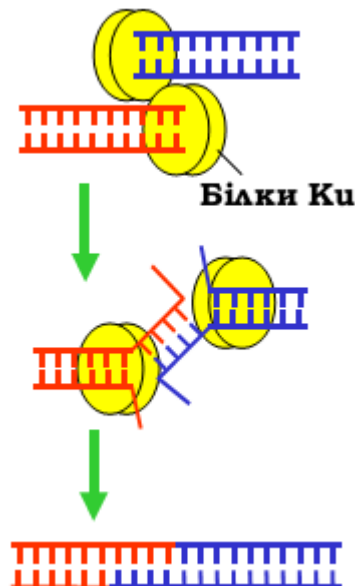


Рис. 36. Негомологічне з'єднання кінців ДНК

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Як відбувається транскрипція у прокаріот і еукаріот?
2. Вкажіть стадії транскрипційного циклу та охарактеризуйте їх?
3. Що таке надспіралізація? Її види.
4. Що таке аттенуація транскрипції?
5. Вкажіть фактори термінації транскрипції.
6. Що таке лактозний оперон?
7. Що таке цис- і транс- регуляції транскрипції?
8. Що таке регуляторні білки?
9. Що таке коактиватори і корепресори?
10. Що таке хроматин?
11. Що таке нуклеосома?

12. Що таке хромосома?
13. Яка будова хромосоми?
14. Що таке гетерохроматин?
15. Що таке еухроматин?
16. Що таке центромера?
17. Що таке теломера?
18. Що таке супутники?
19. Що таке хромери?
20. Що таке експресія гістонових генів та збирання нуклеосом?
21. Що таке гістони?
22. Що таке репарація ДНК? Її види.

21. Короткі РНК або РНК - інтерференція

РНК інтерференція (англ. *RNA interference, RNAi*) — система контролю активності генів еукаріотичних клітин, що здійснюється за допомогою коротких (20-25 нуклеотидів) молекул рибонуклеїнової кислоти. Ключовими молекулами в РНКі є короткі інтерферуючі РНК (англ. *small interfering RNA, siRNA*) та мікроРНК (англ. *microRNA*), ці молекули можуть вступати у взаємодію із комплементарними послідовностями в інших молекулах РНК, наприклад у матричних РНК і підвищувати або пригнічувати їхню активність. Одним найпоширеніших та найкраще вивчених механізмів дії РНКі є посттранскрипційне пригнічення експресії генів шляхом руйнування або деаденілювання мРНК.

РНК інтерференція виявлена у клітинах більшості еукаріот (тварин, рослин, грибів). Вона є важливим механізмом захисту клітини від паразитуючих генів — вірусів та транспозонів, також бере участь у регуляції експресії власних генів організму, зокрема у процесі ембріогенезу.

Вибірковий і потужний характер впливу РНК і на експресію генів, дозволяє використовувати це явище як зручний інструмент біологічних досліджень, як у культурах клітин, так і в живих організмах. Використання цього шляху також є багатообіцяючим для біотехнології та медицини, зокрема розробки та впровадження.

Історично РНК інтерференція була відома під іншими назвами, зокрема косупресія та посттранскрипційне пригнічення експресії генів. Тільки після детальнішого дослідження цих процесів, які спочатку здавались непов'язаними, стало зрозуміло, що всі вони є прикладами РНК інтерференції. У 2006 році Ендрю Фаєр та Крейг Мело отримали Нобелівську премію з фізіології та медицини за роботу присвячену механізмам РНК інтерференції у *Caenorhabditis elegans*, яку вони опублікували у 1998 році.

Відкриттю РНК інтерференції передувало спостереження пригнічення експресії генів у рослин під впливом антисенс РНК. Пізніше вчені в Нідерландах та США отримали несподівані результати при введенні трансгену у рослини петунії. Річард Йоргенсен та співробітники намагались модифікувати рослини таким чином, щоб їхні квіти мали більш глибокий

колір. Для цього вчені ввели у клітини додаткові копії гену ферменту халконсинтази, що відповідає за утворення фіолетового пігменту. Проте, як з'ясувалось, збільшення копійності цього гену не призвело до прояву темнішого забарвлення віночка петунії, навпаки — рослини утворювали менше пігменту і квіти ставали повністю або частково білими. Ці результати свідчили про значне зниження активності халконсинтази, при чому пригнічувалась робота як транс гену, так і ендогенної копії гена цього ферменту. Це явище у рослин було назване **косупресія**. Згодом аналогічний явище було відкрите і в грибів *Neurospora crassa*. Спочатку аналогії між цими двома випадками не було проведено, і у випадку *N.crassa* такий ефект називався іншим терміном — **квелінг** (англ. *Quelling* - Пригнічення). Подальші дослідження показали, що косупресія у рослин зумовлена посттранскрипційним пригніченням експресії гену внаслідок підвищення рівня деградації мРНК.

Незабаром схожий несподіваний ефект був описаний при спробі підвищити стійкість рослин до вірусних інфекцій. На той час було відомо, що рослини, які експресують вірусні білки, мають нечутливі до інфікування відповідним вірусом. Несподіванкою стало те, що для отримання такої стійкості достатньо було ввести у геном рослини короткі некодуєчі послідовності вірусної РНК. Припускалось, що вірусна РНК, яка утворювалась у рослинних клітинах також пригнічувала реплікацію вірусу. У зворотному експерименті короткі ділянки рослинних генів вводились у геном вірусу. В цьому випадку спостерігалось пригнічення експресії відповідного гену в рослинній клітині після її зараження модифікованим вірусом. Цей феномен отримав назву «вірус-індуковане пригнічення експресії генів» (англ. *virus-induced gene silencing, VIGS*), а всю сукупність подібних явищ називали пост-транскрипційним пригніченням експресії генів (англ. *post transcriptional gene silencing*). У 1998 році у журналі *Nature* була опублікована робота Ендрю Фаєра та Крейга Мело, у якій вони описували спробу пригнічення експресії генів *C.elegans* із використанням методики антисенс РНК. Ці вчені показали, що ведення антисенс або сенсРНК у клітини нематоди, мало як мінімум у 10 разів слабший ефект на експресію гену, ніж введення суміші антисенс і сенсРНК, які утворювали дволанцюгову РНК. Таким чином, було показано, що причиною виникнення пост-транскрипційного пригнічення генів є саме наявність у клітині дволанцюгової РНК. Результатом цих робіт було створення самого терміна РНК інтерференція. Фаєр та Мело отримали Нобелівську премію з фізіології та медицини у 2006 році «за відкриття РНК інтерференції — пригнічення експресії генів дволанцюговою РНК».

Молекулярний механізм

РНКі — це РНК-залежне пригнічення експресії генів, що здійснюється завдяки ефекторному білковому РНК-індукованому сайленсінг комплексу (англ. *RNA-induced silencing complex, RISC*) та ініціюється короткими дволанцюговими РНК (длРНК), які взаємодіють із цим комплексом у

цитоплазмі клітини. Існує два шляхи РНКі: екзогенний та ендогенний. У випадку екзогенного шляху длРНК походить із геному вірусу або є результатом лабораторних маніпуляцій. Такі длРНК у цитоплазмі ріжуться на короткі фрагменти ферментом із активністю РНКазиди III дайсер (англ. *Dicer* - шинкувальник).

Ендогенні дволанцюгові РНК утворюються внаслідок експресії власних генів організму, наприклад генів пре-мікроРНК. Процесинг первинних транскриптів цих генів передбачає утворення характерних структур стебло-петля у ядрі, які пізніше транспортуються у цитоплазму і розрізаються ферментом дайсер, внаслідок чого утворюються мікроРНК, що можуть взаємодіяти з RISC комплексом. Таким чином, шляхи екзогенних та ендогенних длРНК сходяться на рівні RISC.

Малі інтерферуючі РНК

Малі інтерферуючі РНК (англ. *siRNA*) — це дволанцюгові РНК довжиною 21-25 нуклеотидів із двонуклеотидними виступами на 3'-кінцях. Кожен ланцюг має фосфатну групу на 5'- і гідроксильну на 3'-кінці. Така структура утворюється в результаті дії ферменту дайсер на довгі дволанцюгові РНК або РНК, що містять шпильки. Після розщепленням дайсером дволанцюгові siRNA потрапляють у каталітичний RISC комплекс. У цьому комплексі білок аргонавт (англ. *Argonate*) розплітає дуплекс РНК, в результаті чого у RISC залишається тільки один із двох ланцюгів — «направляючий». Направляючий ланцюг siRNA дозволяє ефекторному комплексу знайти специфічну мРНК-мішень, оскільки він комплементарний до певної її ділянки. Приєднання комплексу siRNA-RISC до мРНК призводить до деградації останньої. На відміну від мікроРНК малі інтерферуючі РНК, як правило, гібридизуються із єдиним типом мРНК-мішені дуже точно і призводять до її ендонуклеотичного розщеплення.

МікроРНК (англ. *microRNA*, *miRNA*) — молекули РНК довжиною 21-22 нуклеотиди ендогенного походження, що беруть участь у регуляції експресії генів, зокрема у процесі індивідуального розвитку організмів. Гени мікроРНК транскрибуються із утворенням довгих первинних транскриптів pri-miRNA (англ. *primordial miRNA*), ці РНК процесуються у ядрі, внаслідок чого вони перетворюються у pre-miRNA — структури у вигляді стебло-петля довжиною приблизно 70 нуклеотидів. Комплекс процесингу pri-miRNA у pre-miRNA містить фермент із активністю РНКазиди III, який називають Drosha, та білок що зв'язує дволанцюгову РНК — Pasha. Після процесингу pre-miRNA транспортується із ядра у цитоплазму, де вона стає субстратом для ферменту дайсер (у *Drosophila melanogaster* та *C.elegans* siRNA та miRNA процесуються різними ізоформами ферменту дайсер). Зріла молекула мікроРНК може зв'язуватись із ферментативними RISC комплексом. Відомий також шлях процесингу мікроРНК не залежний від дайсер. У цьому випадку pre-miRNA ріжеться білком аргонавт 2. Принципова різниця між siRNA та miRNA полягає у тому, що у тварин послідовність мікроРНК не

повністю комплементарна до послідовності мРНК-мішені, таким чином мікроРНК можуть інгібувати трансляцію із кількох різних мРНК, що містять схожі послідовності (у рослин як miRNA так і siRNA зазвичай повністю комплементарні до РНК-мішені). МікроРНК приєднуються до 3'-UTR (3'-кінцевої ділянки, що не транслюється) мРНК і викликають видалення полі(А)-хвоста або пригнічення трансляції іншим шляхом



Рис. 37. Квіти *Petunia hybrida*, в клітинах якої експресія генів, що відповідають за забарвлення знижена РНК інтерференцією.

Зліва рослина дикого типу; рослини справа містять трансгени, експресія яких пригнічена, як і експресія власних генів організму, що відповідають за забарвлення віночка

Пригнічення транскрипції

Крім того, що РНКі діє на рівні пригнічення трансляції, вона також може впливати і на транскрипцію генів. Багато еукаріот використовують цей шлях для підтримання структури геному. Модифікація гістонів дозволяє зменшити експресію генів із певної ділянки, оскільки ця ділянка переходить у стан гетерохроматину. Деколи цей процес пов'язаний із РНК інтерференцією, тоді його називають RITS (англ. *RNA-induced transcriptional silencing*, РНК-індуковане пригнічення транскрипції). Вивчення явища RITS, в основному, було обмежене дослідженням експресії ділянки, що відповідає за тип спарювання у *Schizosaccharomyces pombe*, але отримані дані можуть не справджуватись для геномів інших організмів.

У дріжджів *S.pombe* пригнічення транскрипції забезпечує RITS комплекс, який містить білок аргонавт, білок Chp1 із хромодоменом (домен, який знаходять у білків, пов'язаних із організацією і перебудовою хроматину), та білок із невідомою функцією Tas3. Для індукції утворення ділянок гетерохроматину необхідний фермент дайсер, а також білок аргонавт і РНК-залежна РНК-полімераза. Делеція цих генів у *S.pombe* порушує метилювання гістонів і формування центромер, через що поділ клітини зупиняється або сповільнюється в анафазі.

Для підтримання вже сформованих ділянок гетерохроматину RITS формує комплекс із siRNA, комплементарними до генів у даній ділянці і стабільно зв'язується із метильваними гістонами. Цей комплекс забезпечує котранскрипційну деградацію будь-яких пре-мРНК, синтез яких ініціює РНК-полімераза. Вважається, що ділянки гетерохроматину підтримуються на

основі позитивного зворотного зв'язку, так як нові siRNA формуються РНК-залежною РНК-полімеразою із випадкових транскриптів і включаються в комплекс RITS. Всі описані дані були отримані тільки для *S.pombe*, у ссавців підтримання ділянок гетерохроматину може бути РНКі-незалежним.

Зв'язок із редагуванням РНК

Найбільш розповсюдженою формою редагування РНК у вищих еукаріот є перетворення аденозину в інозин у дволанцюгових РНК, яке здійснюється ферментом аденозиндеаміназою. В 2000 році було припущено, що шлях РНК інтерференції і шлях редагування РНК А→І можуть конкурувати за спільний субстрат — дволанцюгову РНК. Справді, деякі pre-miRNA можуть підлягати редагуванню А→І, при чому цей механізм може регулювати процесинг та експресію зрілих молекул мікроРНК. У ссавців описаний як мінімуму один фермент РНК-редагування, що може вивести молекули siRNA із системи РНКі. Дослідження лінії *C.elegans*, що не має генів редагування А→І показали, що редагування РНК може запобігати пригніченню експресії ендогенних генів і трансгенів по шляху РНКі.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке РНК-інтерференція, її характеристика?
2. Молекулярний механізм РНК-інтерференції.
3. Що таке малі інтерферуючі РНК?
4. Що таке мікро РНК?
5. В чому полягає суть пригнічення транскрипції?
6. В чому полягає суть зв'язку із редагуванням РНК?

22. Природа генів і генетичний код.

Гени. Відкрита рамка зчитування (кодуюча послідовність), яка містить інформацію про амінокислотну послідовність білка, є найважливішою змістовною частиною гена (gene). Але для того, щоб відбулась експресія генетичної інформації (через синтез РНК і далі її білка), не менш важливими є регуляторні послідовності ДНК, які за рахунок спорідненості до специфічних білків використовуються для вмикання/вимикання транскрипції як першої стадії експресії гена. Отже, визначення гена можна сформулювати так: ген — це ділянка ДНК, яка є необхідною і достатньою для повноцінного синтезу функціональної молекули РНК. Ділянка ДНК, яка може вважатися геном, має містити кодуючу послідовність, де записана інформація про продукт, а також певний набір регуляторних елементів послідовності, від яких залежить запуск/блокування процесу транскрипції, шлях зчитування інформації тощо. Згідно з визначенням міжнародного консорціуму онтології

послідовностей (Sequence Ontology Consortium), ген - це «певна визначена зона послідовності ДНК, яка відповідає одиниці спадковості та асоційована з регуляторними ділянками, що транскрибуються, та/або іншими функціональними ділянками послідовності».

Одним із найважливіших типів продуктів транскрипції генів є мРНК - матричні РНК (messenger RNA, mRNA), які використовуються далі як матриці для синтезу білків. У цьому випадку білок є кінцевим продуктом гена, який, відповідно, називається білковим. Крім того, досить велика кількість генів кодує різноманітні молекули РНК, які не піддаються трансляції (є кінцевими продуктами): рРНК - рибосомні РНК (ribosome RNA, rRNA); тРНК- транспортні РНК (transfer RNA, tRNA); маленькі ядерні РНК (small nuclear RNA, snRNA); маленькі ядерцеві РНК (small nucleolar RNA, snoRNA); мікро-РНК (micro RNA, miRNA), молекули РНК, які є компонентами деяких ферментів; інші види РНК, не для всіх із яких з'ясовано їхні функції.

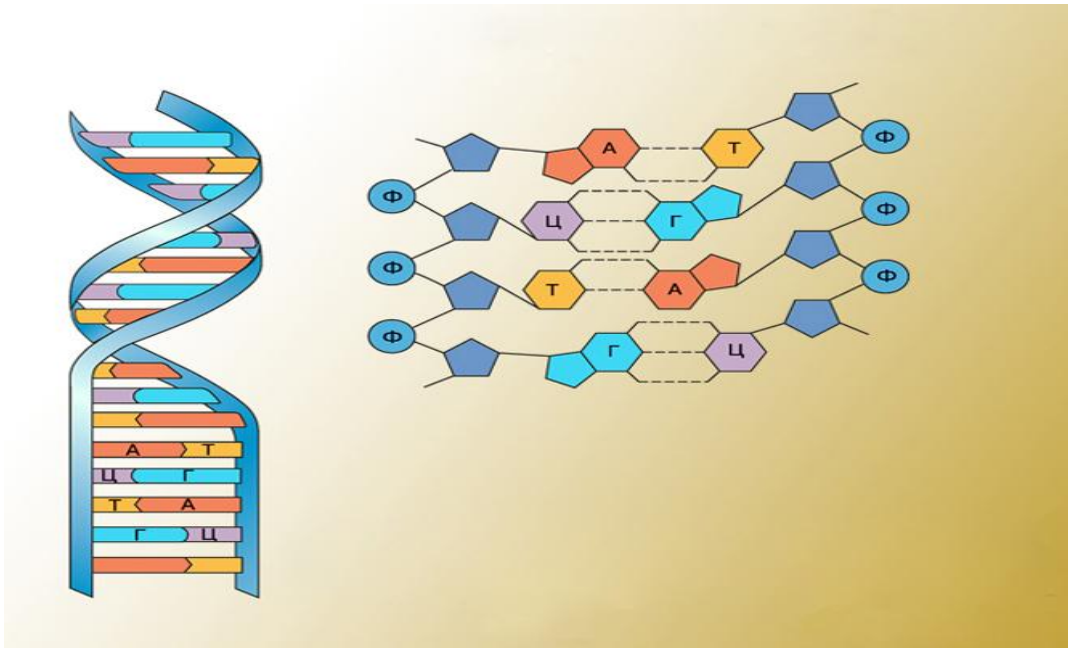
Комплементарність - взаємна відповідність молекул біополімерів або їх фрагментів, забезпечує утворення зв'язків між просторово взаємодоповнюючими (комплементарними) фрагментами молекул або їх структурних фрагментів внаслідок супрамолекулярних взаємодій (утворення водневих зв'язків, гідрофобних взаємодій, електростатичних взаємодій заряджених функціональних груп і т.п.).

Взаємодія комплементарних фрагментів або біополімерів не супроводжується утворенням ковалентного хімічного зв'язку між комплементарними фрагментами, проте через просторової взаємної відповідності комплементарних фрагментів призводить до утворення безлічі відносно слабких зв'язків (водневих і Ван-дер-Ваальса) з досить великою сумарною енергією, що приводить до утворення стійких молекулярних комплексів.

Разом з тим слід зазначити, що механізм каталітичної активності ферментів визначається комплементарністю ферменту і перехідного стану або проміжного продукту реакції, що каталізується - і в цьому випадку може відбуватися оборотне утворення хімічного зв'язку.

Комплементарність нуклеїнових кислот

У разі нуклеїнових кислот - як оліго-так і полінуклеотидів азотисті основи нуклеотидів здатні внаслідок утворення водневих зв'язків формувати парні комплекси аденін-тимін (або урацил в РНК) і гуанін-цитозин при взаємодії ланцюгів нуклеїнових кислот.



Така взаємодія відіграє ключову роль у ряді фундаментальних процесів збереження і передачі генетичної інформації: реплікації ДНК, що забезпечує передачу генетичної інформації при діленні клітини, транскрипції ДНК в РНК при синтезі білків, кодованих ДНК гена, зберіганні генетичної інформації в дволанцюжковій ДНК і процесах репарації ДНК при її пошкодженні.

Матрична рибонуклеїнова кислота (мРНК, синонім — інформаційна РНК або іРНК) — РНК, що відповідає за перенесення інформації про первинну структуру білків від ДНК до місць синтезу білків. мРНК синтезується на матриці ДНК в ході процесу транскрипції, після чого, у свою чергу, використовується в ході трансляції як матриця для синтезу білків. Тим самим мРНК грає важливу роль в експресії («прояві») генів. Довжина типової зрілої мРНК складає від кількох сотень до кількох тисяч нуклеотидів. Щонайдовші мРНК відмічені у (+)оц РНК-містячих вірусів, наприклад пікорнавірусів, проте слід пам'ятати, що у цих вірусів мРНК утворює весь їхній геном.

Гіпотеза про значення РНК в синтезі білків була висловлена Торбйорном Касперсоном (*Torbjörn Caspersson*) на основі досліджень 1937—1939 років, в результаті яких було показано, що клітини, які активно синтезують білки, містять велику кількість РНК. Підтвердження гіпотези було отримане Юбером Шантреном (*Hubert Chantrenne*).

Життєвий цикл молекули мРНК починається транскрипцією і завершується деградацією. Молекула мРНК протягом свого життя може бути також оброблена і «відредагована» перед трансляцією. Еукаріотичні молекули мРНК часто вимагають складної обробки (процесингу) і транспортування, тоді як прокаріотичні молекули мРНК зазвичай цього не вимагають.

Транскрипція. Транскрипцією називають процес копіювання генетичної інформації з ДНК на мРНК. Він здійснюється ферментом РНК-полімеразою, що «розплітає» подвійну спіраль ДНК і будує, згідно з принципом комплементарності, копію ділянки ДНК на основі одного з ланцюжків подвійної спіралі. Цей процес як у еукаріотів, так і у прокаріотів організований однаково. Основна відмінність між про- і еукаріотами полягає в тому, що у еукаріотів РНК-полімераза під час транскрипції асоціюється з мРНК-оброблювальними ферментами, тому у них процесинг мРНК і транскрипція можуть проходити одночасно. Короткоживучі необроблені або частково оброблені продукти транскрипції називаються *передвісниками мРНК* або *пре-мРНК*, після повного завершення процесингу — *зрілою мРНК*.

Процесинг еукаріотичної пре-мРНК. Тоді як мРНК прокаріотів (бактерій і архей), за рідкісними виключеннями, відразу готові до трансляції і більше не вимагають ніяких змін, еукаріотичні пре-мРНК вимагають значного процесингу. У процесі сплайсингу з пре-мРНК видаляються інтрони, на 5'-кінець додається *кеп*, на 3'-кінець додається поліаденіновий хвіст.

Сплайсинг — процес, в якому з мРНК видаляються послідовності, що не кодують білок, так звані інтрони; послідовності, що залишаються, включають кодуєчі білки нуклеотиди, і називаються екзонами. Іноді пре-мРНК можуть бути сполучені різними способами, дозволяючи одному гену кодувати декілька білків. Цей процес називається альтернативним сплайсингом. Сплайсинг зазвичай проводиться РНК-білковим комплексом, що називається сплайсосома, але деякі молекули мРНК також можуть каталізувати сплайсинг.

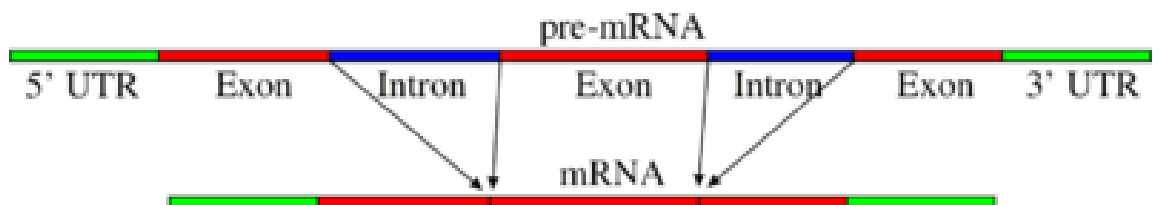


Рис. 38. Схема сплайсингу, в процесі якого пре-мРНК редагується в зрілу мРНК.

Зелений — нетрансльовані ділянки (UnTranslated Regions, UTR), синій інтрони, червоний — трансльовані (ділянки, що кодують білок).

Транспорт. Інша відмінність між еукаріотами і прокаріотами — транспорт мРНК. Через те, що еукаріотичні транскрипція і трансляція просторово розділені, еукаріотичні мРНК повинні бути виведені з ядра в цитоплазму. Зрілі мРНК розпізнаються за наявністю модифікацій і покидають ядро через ядерні пори, в цитоплазмі мРНК утворюють нуклеопротейдні комплекси — інформосоми, у складі яких транспортується до рибосом.

Трансляція. Оскільки прокаріотичні мРНК не потребують процесингу і транспортування, трансляція рибосомою може початися негайно після транскрипції. Отже, трансляція у прокаріот у більшості випадків суміщена з транскрипцією і відбувається ко-транскрипційно.

Еукаріотична мРНК повинна бути оброблена і доставлена з ядра в цитоплазму, і лише тоді може бути трансльована рибосомою. Трансляція може відбуватися як на рибосомах, що знаходяться в цитоплазмі у вільному стані, так і на рибосомах, що асоціюються із стінками ендоплазматичного ретикулума. Таким чином, у еукаріотів трансляція ніколи не суміщена безпосередньо з транскрипцією.

Оскільки у прокаріотів транскрипція зазвичай суміщена з трансляцією, прокаріотична клітка може швидко реагувати на зміни в навколишньому середовищі шляхом синтезу нових білків, тобто регуляція відбувається, в основному, на рівні транскрипції. У еукаріотів через необхідність редагування і транспорту мРНК, відповідь на зовнішні стимули займає більше часу. Тому їхній синтез білків також інтенсивно регулюється і на пост-транскрипційному рівні. Не всяка зріла мРНК трансльовується або трансльовується на різному рівні, якраз через ці механізми регуляції експресії білків, наприклад РНК-інтерференція.

Деградація. Після деякого часу, визначеного її нуклеотидною послідовністю, зокрема, довжиною поліаденінової ділянки на 3'-кінці молекули, мРНК руйнується на нуклеотиди, з яких вона збудована, за участю РНКаз. Як правило, руйнування починається з видалення кеп на 5'-кінці, поліаденінового хвоста на 3'-кінці і потім екзонуклеази одночасно руйнують мРНК в 5' -> 3' і 3' -> 5' напрямках. мРНК, в якій сигнал завершення синтезу білка, стоп-кодон, в результаті помилки транскрипції знаходиться в середині кодуєчої послідовності, схильна до особливої швидкої форми деградації, НМД (nonsense-mediated decay), що проходить через зв'язування багатих на AU мотивів із специфічними білками.

Будова зрілої мРНК

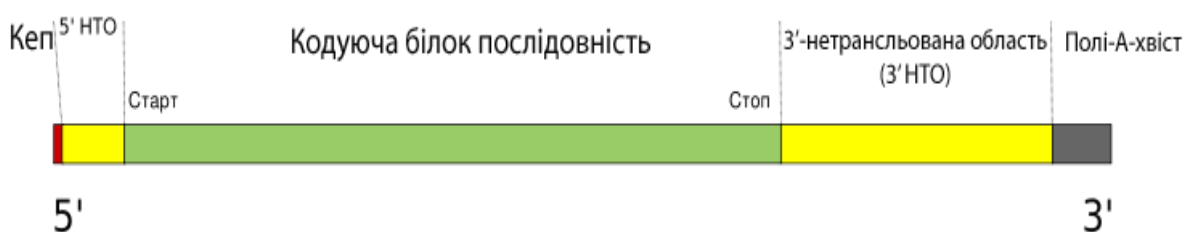


Рис. 39. Схема будови зрілої мРНК людини

Зріла мРНК складається з кількох ділянок, що розрізняються за функціями: «5' кеп», 5' нетрансльована область, кодуєча (трансльована) область, 3' нетрансльована область і 3' поліаденіновий «хвіст».

5' Кеп. 5' кеп (або кап) (від англ. *cap* — шапочка) — це модифікований гуаніновий нуклеотид, який додається на 5' (передній) кінець незрілої мРНК. Ця модифікація дуже важлива для пізнавання мРНК при ініціації трансляції, а також для захисту від 5'-нуклеаз — ферментів, що руйнують ланцюжки нуклеїнових кислот з незахищеним 5'-кінцем.

Кодуючі області складаються з кодонів — послідовностей з трьох нуклеотидів, що слідують безпосередньо одна за одною, кожна з яких відповідає в генетичному коді певній амінокислоті або початку і кінцю синтезу білка. Кодуючі області починаються із старт-кодона і закінчуються одним з можливих стоп-кодонів. Зчитування послідовності кодонів і збірка на її основі послідовності амінокислот молекули білка, що синтезується, здійснюється рибосомами за участю транспортних РНК в процесі трансляції. На додаток до кодування білків, частини кодуючих областей можуть служити управляючими послідовностями. Наприклад, вторинна структура РНК в деяких випадках визначає результат трансляції.

Моноцистронна і поліцистронна мРНК. мРНК називають моноцистронною, якщо вона містить інформацію, необхідну для трансляції тільки одного білка (один цистрон). Поліцистронна мРНК кодує декілька білків. Гени (цистриони) в такій мРНК розділені інтергенними, некодуючими послідовностями. Поліцистронні мРНК характерні для прокариотів і вірусів, у еукаріотів більша частина мРНК є моноцистронними.

Нетрансльовані області. Нетрансльовані області — ділянки РНК, розташовані до старт-кодона і після стоп-кодона, які не кодують білок. Вони називаються 5'-нетрансльованою областю і 3'-нетрансльованою областю, відповідно. Ці області транскрибуються у складі того ж самого транскрипту, що і кодуєча ділянка. Нетрансльовані області мають кілька функцій в життєвому циклі мРНК, включаючи регуляцію стабільності мРНК, локалізації мРНК і ефективності трансляції. Стабільність мРНК може контролюватися 5'- і/або 3'-область через різну чутливість до ферментів, які відповідають за деградацію РНК — РНКаз і регуляторних білків, які прискорюють або уповільнюють деградацію.

3' поліаденіновий хвіст. Довга (часто декілька сотень нуклеотидів) послідовність аденінових основ, присутня на 3' «хвості» мРНК еукаріотів, синтезується ферментом поліаденілат-полімеразою. У вищих еукаріотів полі-А-хвіст додається до транскрибованої РНК, яка містить специфічну послідовність, AAUAAA. Важливість цієї послідовності можна побачити на прикладі мутації в гені людського 2-глобіну, яка змінює AAUAAA на AAUAAG, що приводить до недостатньої кількості глобіну в організмі.

Окрім первинної структури (послідовності нуклеотидів), мРНК характеризується і вторинною структурою. На відміну від ДНК, вторинна структура якої заснована на міжмолекулярних взаємодіях (подвійна спіраль ДНК утворена двома лінійними молекулами, сполученими одна з одною на

всій довжині водневими зв'язками), вторинна структура мРНК заснована на внутрішньомолекулярних взаємодіях (лінійна молекула «складається», і водневі зв'язки виникають між різними ділянками однієї і тієї ж молекули). Прикладами вторинної структури можуть служити стебло-петля і псевдовузол.

Вторинні структури в мРНК служать для регуляції трансляції. Наприклад, вставка в білки нестандартних амінокислот, селенометіоніну і пірролізіну залежить від стебла-петлі, розташованою в 3'-нетрансльованій області. Псевдовузли служать для програмірованої зміни рамки зчитування генів.

У вірусних мРНК складні вторинні структури (IRES) направляють трансляцію, не залежну від розпізнавання кепа і факторів ініціації трансляції.

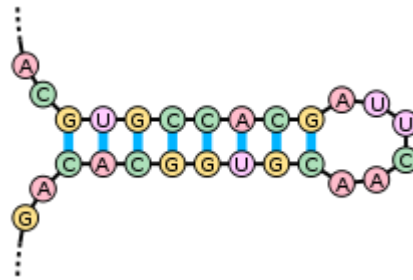


Рис. 40. «Стебло-петля» — елемент вторинної структури мРНК, схематичне зображення

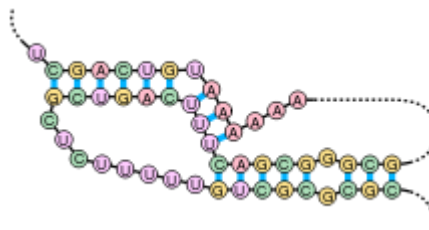


Рис. 41. «Псевдовузол» — елемент вторинної структури мРНК, схематичне зображення

Відкриття генетичного коду

Сьогодні ні для кого не секрет, що програма життєдіяльності усіх живих організмів записана на молекулі ДНК. Найпростіше представити молекулу ДНК у вигляді довгих сходів. Вертикальні стійки цих сходів складаються з молекул цукру, кисню і фосфору. Уся важлива робоча інформація в молекулі записана на перекладинах сходів - вони складаються з двох молекул, кожна з яких кріпиться до однієї з вертикальних стійок. Ці молекули - азотисті основи - називаються аденін, гуанін, тимін і цитозин, але зазвичай їх означають просто буквами А, Г, Т і Ц. Форма цих молекул дозволяє їм утворювати зв'язки - закінчені сходинки - лише певного типу. Це зв'язки між основами А і Т і між основами Г і Ц (утворену таким чином пару

називають «парою основ»). Інших типів зв'язку в молекулі ДНК бути не може.

Спускаючись по сходах вздовж одного ланцюга молекули ДНК, ви отримуєте послідовність основ. Саме це повідомлення у вигляді послідовності основ і визначає потік хімічних реакцій в клітині і, отже, особливості організму, що має цю ДНК. Згідно з центральною догмою молекулярної біології, на молекулі ДНК закодована інформація про білок, які, у свою чергу, виступаючи в ролі ферментів, регулюють усі хімічні реакції в живих організмах.

Строга відповідність між послідовністю пар основ в молекулі ДНК і послідовністю амінокислот, що становлять білкові ферменти, називається **генетичним кодом**. Генетичний код був розшифрований незабаром після відкриття двоспіральної структури ДНК. Було відомо, що нещодавно відкрита молекула інформаційної, або матричної РНК (іРНК, або мРНК), несе інформацію, записану на ДНК. Біохіміки Маршалл Уоррен Ниренберг (Marshall W. Nirenberg) і Дж. Генріх Маттеї (J. Heinrich Matthaei) з Національного інституту охорони здоров'я в містечку Бетезда під Вашингтоном, округ Колумбія, поставили перші експерименти, які привели до розгадки генетичного коду.

Вони почали з того, що синтезували штучні молекули І-РНК, що склалися тільки з азотистої основи урацила (який є аналогом тиміну, "Т", і утворює зв'язки тільки з аденином, "А", з молекули ДНК), що повторюється. Вони додавали ці І-РНК в тестові пробірки з сумішшю амінокислот, причому в кожній пробірці лише одна з амінокислот була помічена радіоактивною міткою. Дослідники виявили, що штучно синтезована ними І-РНК ініціювала утворення білку лише в одній пробірці, де знаходилася мічена амінокислота фенілаланін. Так вони встановили, що послідовність " - У-У-У-" на молекулі І-РНК (і, отже, еквівалентну їй послідовність " - А-А-А-" на молекулі ДНК) кодує білок, що складається тільки з амінокислоти фенілаланіну. Це було першим кроком до розшифровки генетичного коду. Сьогодні відомо, що три пари основ молекули ДНК (такий триплет дістав назву кодон) кодують одну амінокислоту в білці. Виконуючи експерименти, аналогічні описаному вище, генетики врешті-решт розшифрували увесь генетичний код, в якому кожному з 64 можливих кодонів відповідає певна амінокислота. У 1968 році Ниренберг, разом зі своїми колегами Робертом Холлі і Гобіндом Кораною отримав Нобелівську премію за розшифровку генетичного коду і встановлення механізму білкового синтезу.

Дослідження вчених відкрило принципово нові можливості в області вивчення спадкових захворювань та пошуку методів їх лікування.

Властивості генетичного коду

Дослідження генетичного коду розкрили його основні властивості:

Триплетність - кожна амінокислота кодується послідовністю із трьох нуклеотидів - триплетом або кодоном (серед 64 кодонів 61 - змістовний і 3 незмістовні кодони - УАА, УГА та УАГ).

Специфічність - один кодон відповідає лише одній амінокислоті.

Виродженість (надлишковість) - одній амінокислоті відповідають кілька кодонів (наприклад серину чи лейцину відповідають 6 кодонів, метіоніну - всього 1).

Колінеарність - послідовність нуклеотидів в молекулі і-РНК точно відповідає амінокислотній послідовності у поліпептидному ланцюгу.

Односпрямованість - зчитування інформації в процесі транскрипції і трансляції відбувається лише в напрямку 5' - 3' кінець.

Неперекриваємість - останній нуклеотид попереднього кодону не належить наступному триплету.

Безперервність - між триплетними «словами» відсутні «розділові знаки».

Універсальність - в усіх організмах одні і ті самі амінокислоти кодуються одними і тими ж нуклеотидами (проте така властивість характерна лише для ядерного генетичного коду; мітохондріальний генетичний код має деякі відмінності від ядерного).

Варіанти генетичного коду

Більшість організмів переважно користуються одним варіантом коду, так званим «стандартним кодом», 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 включаючи різноманітні альтернативні мітохондріальні коди, наприклад, прочитування стоп-кодону стандартного коду UGA як кодону, що визначає триптофан у мікоплазм. У бактерій і архей GUG і UUG часто використовуються як стартові кодони. В деяких випадках гени починають кодувати білок із старт-кодона, який відрізняється від зазвичай використовуваного даним видом. У деяких білках нестандартні амінокислоти, такі як селенцистеїн і пірролізін вставляються рибосомами, під час считування стоп-кодону за умовами наявності певних послідовностей в мРНК після кодону. Селенцистеїн часто розглядається як 21-а, а пірролізін 22-й амінокислоти, що входять до складу білків. Незважаючи на ці виключення, у усіх живих організмів генетичний код має загальні риси: кодон складаються з трьох нуклеотидів, де два перших є визначальний, кодони транслуються тРНК і рибосомами в послідовність амінокислот. Відхилення від стандартного генетичного коду.

Таблиця прикладів варіантів генетичного коду

Приклад	Кодон	Звичайне значення	Читається як:
Деякі види дріжджів роду <i>Candida</i>	CUG	Лейцин	Серин
Мітохондрії, в тому числі і <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CU (U, C, A, G)	Лейцин	Серин
Мітохондрії вищих рослин	CGG	Аргінін	Триптофан
Мітохондрії (у всіх без виключення організмів, що досліджувалися)	UGA	Стоп	Триптофан
Мітохондрії ссавців, дрозофіли, <i>S. cerevisiae</i> і багатьох найпростіших	AUA	Ізолейцин	Метіонин = Старт
Прокаріоти	GUG	Валин	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 дрозофіли	AGA	Аргінін	Стоп
Мітохондрії ссавців	AG (A, G)	Аргінін	Стоп

Генетичний код як система

«Найважчим в проблемі коду було зрозуміти, що код існує. На це знадобилося ціле століття. Коли це зрозуміли, то для того, щоб розібратися в деталях, вистачило які-небудь десять років».

Проблема генетичного коду - це ключова проблема. У кінці 50-х - початку 60-х років вона приковувала до себе увагу, збуджувала активність умів, спонукала віру у велич і мудрість загадок науки. У широкому сенсі генетичний код - це спосіб запису генетичної інформації в послідовностях нуклеїнових кислот (ДНК або РНК) про структуру поліпептидів (білків). У конкретному сенсі генетичний код - ця відповідність між триплетними кодонами матричної РНК (М-РНК) і амінокислотами кодованого білку, що задається кодовою таблицею.

Розвиток проблеми генетичного коду пройшов в декілька етапів. Предтечами цієї проблеми можна вважати багатьох видатних дослідників. Зокрема, Н.К. Кольцов (1927, 1935) запропонував в загальній формі ідею молекули-гена і матричний принцип її дублювання. Е. Шредингер (1944) явно сформулював необхідність кодування генетичної інформації в структурі генів-молекул. П. Колдуэлл і С. Хиншельвуд (1950) запропонували ідею матричного синтезу білків на ДНК. А. Даунс (1952) сформулював гіпотезу про синтез білків на РНК.

Наукові уявлення про генетичний код як про реальну проблему експерименту і теорії були сформульовані Г.А. Гамовим відразу ж після обґрунтування Дж. Уотсоном і Ф. Криком (1953) моделі будови подвійної

спіралі ДНК. Перший етап вивчення проблеми (1953-1961) можна назвати гіпотетичним. З моделі Уотсона-Крика витікало уявлення про лінійну послідовність ДНК - текст, побудований з чотирьох типів нуклеотидів (А, Т, G і С - чотири символи алфавіту (або А, Г, Ц і Т)). Але кодовані білки теж мають лінійну первинну структуру - текст, побудований з 20 типів канонічних амінокислот (алфавіт з 20 символів). Тому Г. А. Гамору (1954) відразу ж сформулював ідею генетичного коду в конкретному сенсі - як відповідність двох текстів, записаних за допомогою двох різних алфавітів. Крім того, він запропонував використовувати технічні засоби криптографії (розшифровки невідомих кодів) для вирішення центральної проблеми генетики.

Генетичний код відразу ж придбав вигляд великої загадки природи, ребусу для дотепних. Багато сотень математиків, фізиків, хіміків, біологів, включаючи Г. А. Гамова, Ф. Крику та ін., запропонували гіпотетичні варіанти генетичного коду, які представляють тепер лише історичний інтерес. Реальний код виявився зовсім іншим. Науковими результатами першого етапу можна вважати:

- 1) постановку проблеми генетичного коду;
- 2) формування понять лінійного тексту, алфавіту для нуклеїнових кислот і білків, генетичної інформації, записаної в цих текстах за допомогою символів алфавіту;
- 3) уявлення про матричну роль РНК в трансляції;
- 4) поняття про кодони і доказ їх неперекривання;
- 5) припущення про триплетності кодонів і колінеарності гена і білку, доведене лише надалі, і так далі.

Другий етап (1961-1966) можна назвати експериментальним, оскільки в цей період генетичний код був розшифрований в прямому експерименті. У 1961 році Ф. Крик із співробітниками в блискучій роботі показали, що: а) кодони триплетні; б) між ними немає розділових знаків («ком»); в) гени, що кодують структуру білків (цистрини), мають фіксований початок, орієнтований напрям і фіксований кінець; г) існує невелике число некодуючих триплетів («нонсенсу», безглузких кодонів), а код в цілому сильно вироджений. У 1964 році Ч. Янофски із співробітниками і С. Бреннер із співробітниками показали, що ген і кодований ним білок взаємно колінеарні, тобто є послідовна відповідність між кодонами гена і амінокислотами білка.

Пряма розшифровка генетичного коду *in vitro* виявилася можливою завдяки техніці білкового синтезу в безклітинних системах, тобто в клітинних екстрактах, що містять усі необхідні компоненти апарату трансляції (Т-РНК, рибосоми, амінокислоти, ферменти, джерело енергії і так далі), окрім М-РНК. Вводячи в такі системи природні М-РНК або штучні невеликі олігорибонуклеотиди, можна було вивчати специфічність включення мічених амінокислот в поліпептиди, що будуються. М. Ниренберг і Ф. Ледер подавали в безклітинну систему трансляції *E. coli* різні олігорибонуклеотиди і показали, що індивідуальні фракції

тририбонуклеотидів, що асоціюються з рибосомами, зв'язують певні фракції Т-РНК, заряджені певними міченими амінокислотами. За допомогою такого методу генетичний код був розшифрований повністю. Влітку 1966 року на симпозіумі по кількісній біології в Колд-Спринг-Харборе (США) усі отримані дані були зведені Ф. Криком воєдино. Розшифрований генетичний код *E. coli*, досліджений *in vitro*, повністю узгоджувався також з іншими незалежними даними, отриманими *in vivo* і для інших видів. Цей висновок підтверджується також результатами секвенування останніх років, коли знайдено, що тисячі генів і кодованих ними білків дійсно відповідають один одному за правилами генетичного коду.

З 64 можливих триплетів 61 є смисловим кодоном, тобто кодує амінокислоту. Усі кодони триплетні, нерозривні і не перекриваються в тексті, а також не розділені межкодонними знаками (комами). Усі кодони однозначні, тобто кожен кодує єдину амінокислоту. Інакше кажучи, в напрямі кодон - амінокислота генетичний код однозначний.

Зворотна відповідність в напрямі амінокислота - кодон неоднозначно, і ця властивість називається виродженістю. Окремі амінокислоти кодуються групами (серіями) кодонів-синонімів. 18 серій з 20 містять від двох до шести кодонів, дві серії (Met і Trp) не вироджено, містять по одному кодону. Середня виродженість генетичного коду приблизно три кодони на серію.

Виродженість називається систематичною, якщо кодони-синоніми розрізняються в третій позиції або пуринами ($R = A$ або G), або пиримидинами ($Y = U$ або C), або взагалі будь-якими з чотирьох нуклеотидів ($N = A, G, U$ або C). Цим принципам задовольняють 30 пар кодонів з 32, а також вісім тетрад з 16. Усі ці пари зв'язні, а тетради повністю зв'язані. Інші варіанти виродженості називають несистематичними. Вони відносяться до великих серій: Leu і Arg – зв'язні серії, Ser – незв'язна серія, Ile - три кодони, повнозв'язна серія.

Генетичний код містить також знаки пунктуації (початку і кінця) трансляції. Кодони AUG, GUG і UUG у прокариот окрім кодування амінокислот кодують також ініціацію трансляції. Проте однозначність кодування при цьому не порушується, оскільки знаки, що ініціюють, локалізовані в певному оточенні (контексті), здатному утворювати самокомплементарні "шпильки". У еукаріот ініціюють триплети AUG і слабше, - UUG, AUA і ACG. Три "вакантні" триплети у *E. coli* - UAA (ochre), UAG (amber) і UGA (opal) - не кодують амінокислот, а виконують роль термінальних знаків трансляції (стоп-кодонів, нонсенс-кодонів або термінального нонсенсу). У нормі ними закінчуються усі цистрони, тобто трансльовані гени, одиниці трансляції. Мутаційне виникнення нонсенсу усередині гена призводить до передчасної термінації трансляції і обриву білку. Нонсенс теж утворює зв'язну серію. Розшифровка генетичного коду була одним з найвидатніших наукових відкриттів ХХ століття.

Третій етап вивчення проблеми генетичного коду (після 1966 року) пов'язаний з поглибленим дослідженням молекулярних механізмів кодування, системних властивостей генетичного коду: симетрії,

регулярності, завадостійкої, універсальності, а також шляхів його виникнення і еволюції. Молекулярною системою, що забезпечує відповідність кодонів М-РНК і амінокислот, являється набір адапторних молекул транспортних РНК (Т-РНК) і набір кодуєчих ферментів аміноацил-т-РНК-синтетаз (АРС-аз). Кожна специфічна молекула Т-РНК має антикодон, що взаємодіє з кодоном М-РНК, а також специфічний сайт взаємодії з певною АРС-азой і неспецифічний сайт зв'язування амінокислоти. Кожна АРС-аза пізнає усі ізоакцепторні (що переносять одну амінокислоту) фракції Т-РНК, одну певну амінокислоту і сполучає їх макроергічним (енергобагатою) зв'язком. Тому відповідність антикодону Т-РНК і амінокислоти визначається саме АРС-азой. Фракції Т-РНК виконують функції адапторів (специфічних посередників) між кодонами М-РНК і амінокислотами.

Багато властивостей генетичного коду забезпечуються властивостями молекул Т-РНК і АРС-аз. Триплетний і нерозривний антикодон виділений в антикодонній петлі Т-РНК спеціальними модифікованими нуклеотидами. Цим забезпечуються триплетність і нерозривність впізнаних кодонів матриці. Усі антикодони однаково триплетні, тому, починаючи від знаку, що ініціює, трансляція здійснюється триплетними кроками, тобто формується певна рамка (фаза) трансляції - одна з трьох можливих. В цьому випадку міжкодонні знаки (коми) не потрібні, а кодони не перекриваються. Кодони, що ініціюють, у *E. coli* пізнаються спеціальною фракцією т-РНК^f - Met, що переносить модифіковану амінокислоту форміл-метіонін. Термінальний нонсенс взагалі не має своїх фракцій Т-РНК, а пізнаються спеціальними білковими чинниками термінації.

Однозначність коду в напрямі кодон - амінокислота забезпечується строгою специфічністю АРС-аз. Кожна АРС-аза дізнається єдину амінокислоту, тому неоднозначність виключена або маловірогідна. У основі систематичної виродженості лежать правила неоднозначності спаровування кодон-антикодон, встановлені Ф. Криком. Один антикодон може дізнаватися один, два або три кодони, що розрізняються по третій позиції. Згідно з правилами неоднозначного спаровування, систематична виродженість в парах кодонів забезпечується окремими фракціями Т-РНК, U, що мають, G або I (інозин) в трьох позиціях антикодонів. Виродженість 3 у ізолейцину (Ile) вимагає фракцію Т-РНК з I в третій позиції антикодону. Такий нуклеотид там дійсно є. Виродженість 4 вимагає не менше двох фракцій Т-РНК, виродженість 6 - не менше трьох фракцій. Всього генетичний код *E. coli* вимагає не менше 32 фракцій Т-РНК. Реально у *E. coli* повне число генів Т-РНК дорівнює 86 для 79 фракцій з різними антикодонами. Отже, багато фракцій Т-РНК частково дублюють один одного.

Тепер розглянемо не менш вражаючу властивість симетрії генетичного коду. Генетичний код можна зображувати в круговій формі, де внутрішній круг відповідає першим позиціям кодонів, середнє кільце - другим позиціям і зовнішнє кільце - третім позиціям. Сильні основи зображені невідокремленими секторами зовнішнього кільця, а слабкі - підокремленими.

Властивість симетрії полягає в наступній:

- 1) проведемо вісь симетрії через центр круга перпендикулярно площини листа і повернемо круг на 180° в площині листа. При цьому усі сильні і слабкі основи зберігають свої позиції, тобто поєднуються з однойменними;
- 2) проведемо через центр площину симетрії, перпендикулярну площині листа і рядкам тексту. При дзеркальному віддзеркаленні круга в цій площині усі сильні основи міняються місцями із слабкими і навпаки;
- 3) проведемо через центр площину симетрії, перпендикулярну площині листа і паралельну рядкам тексту. При дзеркальному віддзеркаленні круга в цій площині сильні основи міняються на слабкі і навпаки.

Генетичний код універсальний в тому сенсі, що його основна частина однакова для усіх форм життя на Землі. Цей висновок обґрунтований досвідом масового секвенування генів і білків. Майже завжди колінеарна відповідність генів і білків узгоджується з правилами генетичного коду. Проте в деяких екзотичних системах трансляції (мітохондрії тварин, рослин і грибів, хлоропласти рослин, найдрібніші бактерії - мікоплазми, війчасті прості та ін) знайдені мінорні відхилення в генетичному коді, а також зміни правил неоднозначного спаровування і наборів антикодонів і фракцій Т-РНК. Це своєрідні «діалекти» генетичного коду, що відбивають специфіку їх еволюції і функціонування.

Таким чином, генетичний код *E. coli* є не випадковим конгломератом відповідностей між кодонами і амінокислотами, а високоорганізовану систему відповідностей, що підтримується складними молекулярними механізмами. По вираженню Френціса Крика, що вніс вирішальний вклад у відкриття і вивчення коду, це ключ до молекулярної біології, оскільки він показує, як дві великі мови полімерів - мова полінуклеотидів і мова поліпептидів пов'язані між собою.

Некодуючі РНК (нкРНК) є функціональними молекулами РНК, що не транслюються в білок. Менш часто використовувані синоніми - не кодуєча білок-РНК (нкбРНК), не інформаційна РНК (ніРНК) і функціональна РНК (фРНК). Термін малі РНК (мРНК) часто використовується для коротких бактеріальних нкРНК. Послідовність ДНК, з яких некодируючі РНК транскрибуються часто називають геном РНК.

Некодуючі РНК гени включають дуже численні і функціонально важливі РНК, такі як транспортна РНК (тРНК) і рибосомальна РНК (рРНК), а також РНК, такі як snoРНК, мікроРНК, siРНК, snRNAs, і піРНК і довгі нкРНК, які включають такі приклади, як Xist і HOTAIR. Число нкРНК закодованих в геномі людини невідоме, проте останні транскриптомні та біоінформатичні дослідження показують існування тисяч нкРНК. Оскільки багато з нововиявлених нкРНК не були підтверджені для їх функціонування, цілком можливо, що чимало з них є нефункціональними.

Перша некодуєча РНК, виявлена була аланінового тРНК з пекарських дріжджів, її структура була опублікована 1965 році. Для отримання очищеного аланінового тРНК зразка, Роберт Холлі і співавт.

використовували 140 кг дріжджів для отримання лише 1 г очищеного тРНК для аналізу. 80 нуклеотидна тРНК була секвенована, Перша перетравленням з панкреатичної рибонуклеази (продукуючи фрагменти, що закінчуються на цитозин або уридин), а потім з такадіастазної рибонуклеази Т1 (продукуючи фрагменти які закінчуються Гуанозином). Хроматографія та ідентифікація 5' і 3' кінців допомогли організувати фрагменти для встановлення послідовності РНК. З цих трьох структур, спочатку запропонованих для цієї тРНК, структура "лист конюшини" була незалежно запропонована у декількох наступних публікаціях. Вторинна структура у вигляді листа конюшини була завершена після рентгенівської кристалографії, проведеної двома незалежними групами дослідників у 1974 році.

Рибосомальна РНК була відкрита наступною, а згодом і УРНК - на початку 1980-х років. З тих пір відкриття нових некодуєчих РНК продовжується з snoРНК, Xist, CRISPR і багатьох інших. Останні помітні доповнення включають рибоперемикачі і мікроРНК, відкриття механізму РНК-інтерференції, зробили Craig C. Mello і Andrew Fire в 2006 році, отримавши Нобелівську премію з фізіології і медицини.

Біологічна роль нкРНК. Некодуєчі РНК належать до декількох груп і беруть участь у багатьох клітинних процесах. Вони варіюються від нкРНК центрального значення, які зберігаються впродовж або в більшості клітинного життя до більш перехідних нкРНК специфічних для одного або декількох близьких видів. Більш консервативні нкРНК - молекулярні копаліни або реліквії з LUCA і світу РНК.

РИБОСОМНІ РНК (рРНК) (грец. *soma* — тіло) — клас клітинних РНК, які входять до складу рибосом прокариотичних та еукаріотичних клітин. рРНК становлять близько 80% усієї РНК клітини; вони локалізовані в основному в цитоплазмі, а також у мітохондріях. рРНК разом зі специфічними білками становлять основу структури рибосом — нуклеопротейнових структур, призначених для синтезу білка по РНК-матриці. Рибосома забезпечує специфічний контакт матричної і транспортних РНК, унаслідок якого відбувається трансляція нуклеотидної послідовності, зчитаної з певного гена, в амінокислотну послідовність відповідного білка. Прокариотичні рибосоми містять приблизно 65% рРНК і близько 35% білка. Найбільш повно вивчені рибосоми *E.coli*. Коефіцієнт седиментації такої рибосоми — 70S, мол. м. — $2,5 \cdot 10^6$. Прокариотичні рибосоми складаються з двох субодиниць — великої з коефіцієнтом седиментації 50S і малої — з коефіцієнтом седиментації 30S; маса великої субодиниці — $1,8 \cdot 10^6$ Дал, а малої — $1,0 \cdot 10^6$ Дал. До складу 50S-субодиниці входить одна молекула 23S-рРНК, одна молекула 5S-рРНК і 34 молекули білка. Субодиниця 30S містить одну молекулу 16S-рРНК і 21 білка. Рибосоми еукаріотів також складаються з двох субодиниць — великої з константою седиментації 60S та мол. м. $2,8 \cdot 10^6$ Дал і малої, що має константу седиментації 40S і мол. м. $1,4 \cdot 10^6$ Дал. Субодиниці рибосом відрізняються набором рРНК, а також кількістю і структурою білків. Існує кілька видів рРНК, які відрізняються за первинною структурою, нуклеотидним складом, мол. м. та іншими

показниками. Функції окремих рРНК ще з'ясовуються. 60S-субодиниця містить 5S-рРНК, 5,8S-рРНК і 28S-рРНК та більше 50 різних поліпептидів. Мала 40S-субодиниця має одну 18S-рРНК і близько 30 поліпептидних ланцюгів. Усі рРНК, за винятком 5S-рРНК, мають загального попередника — 45S-РНК, який локалізується в ядерці. У молекули 5S-рРНК є свій власний попередник. В ядерці відбувається упаковка рРНК з рибосомними білками. У цитоплазмі рибосоми досить стійкі й здатні здійснювати велику кількість циклів трансляції. рРНК — високометильовані полірибонуклеотиди, в яких метильні групи зв'язані або з азотистими основами, або з 2'-гідроксильними групами рибози.

Просторова структура рРНК повністю не вивчена. Кожна з рРНК має специфічну тривимірну структуру, зумовлену характером внутрішньомолекулярної взаємодії азотистих основ. Установлено, що в одноланцюгових молекулах рРНК є багато спіралізованих ділянок («шпильок»). рРНК є важливим компонентом системи, яка необхідна для нормального процесу синтезу білка на рибосомах.

Транспортна РНК, тРНК - рибонуклеїнова кислота, функцією якої є транспортування амінокислот до місця синтезу білка. тРНК також беруть безпосередню участь у нарощуванні поліпептидного ланцюга, приєднуючись - будучи в комплексі з амінокислотою - до кодону мРНК і забезпечуючи необхідну для утворення нового пептидного зв'язку конформацію комплексу. Для кожної амінокислоти існує своя тРНК. тРНК є одноланцюжковою РНК, однак у функціональній формі має конформацію «листа конюшини». Амінокислота ковалентно приєднується до 3'-кінця молекули за допомогою специфічного для кожного типу тРНК ферменту аміноацил-тРНК-синтетази. На ділянці С знаходиться антикодон, відповідний амінокислоті. тРНК синтезуються звичайною РНК-полімеразою в разі прокариотів і РНК-полімеразою III у разі еукаріот. Транскрипти генів тРНК піддаються багатостадійному процесингу, який врешті-решт призводить до формування типової для тРНК просторової структури. Процесинг тРНК включає 5 ключових етапів: видалення 5'-лідерної нуклеотидної послідовності; видалення 3'-кінцевої послідовності; додавання послідовності ССА на 3'-кінець; вирізання інтронів (в еукаріот і архей); модифікації окремих нуклеотидів.

По закінченні дозрівання еукаріотичні тРНК повинні бути перенесені в цитоплазму, де вони беруть участь у біосинтезі білка. Транспорт тРНК здійснюється по Ran-залежному шляху за участю транспортного фактора експортіна t (Los1 у дріжджів), який розпізнає характерну вторинну і третинну структуру зрілої тРНК: короткі двоспіральні ділянки і правильно процесовані 5'-і 3'-кінці. Такий механізм забезпечує експорт з ядра тільки зрілих тРНК. Імовірно, експортін 5 може бути допоміжним білком, здатним переносити тРНК через ядерні пори поряд з експортіном t.

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 (на відміну від ДНК, що містить замість урацила містить тимін). РНК містяться головним чином в цитоплазмі клітин. Ці молекули синтезуються в клітинах всіх клітинних живих організмів, а також містяться в віроїдах та деяких вірусах. Основні функції РНК в клітинних організмах — шаблон для трансляції генетичної інформації в білки та поставка відповідних амінокислот до рибосом. В вірусах є носієм генетичної інформації (кодує білки оболонки та ферменти вірусів). Віроїди складаються з кільцевої молекули РНК та не містять в собі інших молекул. Існує гіпотеза світу РНК, згідно з якою, РНК виникли до білків й були першими формами життя.

Клітинні РНК утворюються в ході процесу, що зветься транскрипцією, тобто синтезу РНК на матриці ДНК, що здійснюється спеціальними ферментами - РНК-полімерази. Потім матричні РНК (мРНК) беруть участь у процесі, що називається трансляцією. Трансляція - це синтез білка на матриці мРНК за участю рибосом. Інші РНК після транскрипції піддаються хімічним модифікаціям, і після утворення вторинної та третинної структур виконують функції, що залежать від типу РНК.

Для **одноланцюжкових РНК** характерні різноманітні просторові структури, в яких частина нуклеотидів одного і того ж ланцюга спарені між собою. 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.

Однак функції РНК в сучасних клітинах не обмежуються їх роллю в трансляції. Так малі ядерні РНК беруть участь у сплайсингу еукаріотичних матричних РНК та інших процесах.

Крім того, що молекули РНК входять до складу деяких ферментів (наприклад, теломерази) у окремих РНК виявлена власна ензиматична активність, здатність вносити розриви в інші молекули РНК або, навпаки, «склеювати» два РНК-фрагмента. Такі РНК називаються рибозимами.

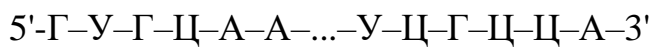
Геноми ряду вірусів складаються з РНК, тобто у них вона відіграє роль, яку у вищих організмів виконує ДНК. На підставі різноманітності функцій РНК в клітині була висунута гіпотеза, згідно з якою РНК - перша молекула, здатна до самовідтворення в добіологічних системах.

Первинна структура РНК. Під первинною структурою нуклеїнових кислот розуміють порядок, послідовність розташування мононуклеотидів в полінуклеотидному ланцюзі РНК. Такий ланцюг стабілізується 3', 5'-фосфодієфірними зв'язками. Оскільки молекулярна маса нуклеїнових кислот коливається в широких межах (від $2 \cdot 10^4$ до 10^{10} - 10^{11}), встановити первинну структуру всіх відомих РНК і особливо ДНК вельми складно. Тим не менш у всіх нуклеїнових кислотах (точніше, в одноланцюговій нуклеїновій кислоті) є один і той же тип зв'язку - 3', 5'-фосфодієфірний зв'язок між сусідніми нуклеотидами. Цю загальну основу структури можна представити таким чином:



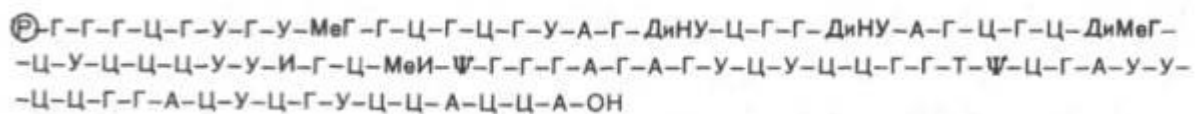
Встановлено, що в утворенні міжнуклеотидного зв'язку беруть участь гідроксильні групи в 3'- 5'-положеннях залишків вуглеводу.

До теперішнього часу вдалося визначити первинну структуру майже всіх тРНК, ряду молекул 5S рРНК, 16S рРНК E.coli, вірусних РНК, до складу яких входять сотні тисячі нуклеотидних залишків. Нижче наводиться приблизна схема послідовності нуклеотидів в молекулі РНК. Усі клітинні РНК в основному складаються з одноланцюгового полінуклеотидного ланцюга:



Полинуклеотидний ланцюг молекули РНК має на одному кінці майже завжди вільний монофосфорний ефір, який прийнято позначати як 5'кінець; на протилежному кінці ланцюга такий фосфат відсутній, а міститься нуклеотид з вільними 2'і 3'гідроксильними групами. Якщо піддати лужному гідролізу молекулу РНК, то в якості кінцевого нуклеотиду будуть виявлені ЦМФ з вільним фосфатом у 5'кінця і вільний аденозин у вигляді вільного нуклеозиду у 3'кінця полінуклеотидного ланцюга.

У з'ясуванні первинної структури РНК вирішальну роль відіграли методи ступінчастого гідролізу, здійсненого в основному екзонуклеазами, він полягає в послідовному відщепленні по одному мононуклеотиду з одного кінця молекули нуклеїнової кислоти. Нижче представлена первинна структура першого РНК, яка має 77 нуклеотидів, для якої була розшифрована нуклеотидних послідовність в 1965 р. Р. Холлі і співроб., А саме аланінової тРНК:



У цій структурі Р - залишок фосфату, ψ - псевдоУМФ, МеГ - метілгуанін, ДіНу - дігідроураціл, ДіМеГ - діметілгуанін, МеІ - метілінозін.

Слід особливо зазначити дві істотні особливості первинної структури всіх тРНК. Перша з них полягає в тому, що 5'-кінцем завжди є гуанілова (рідко цитиділова) кислота, яка несе вільний залишок фосфату у С-5'. Друга особливість - наявність на протилежному кінці молекули залишків трьох мононуклеотидів з однаковою послідовністю - ЦЦА, причому залишок аденілової кислоти містить вільну 3'-ОН-групу.

Між цими структурами в строго певній послідовності розташовуються всі інші нуклеотидні залишки, серед яких на частку мінорних нуклеотидів припадає до 10%. Полінуклеотидний ланцюг різних типів тРНК містить

близько 75 нуклеотидів.

Матричні (інформаційні) РНК відносяться до найбільш гетерогенного класу нуклеїнових кислот, що відрізняються за масою, структурою, розмірами, стабільністю і функціям. Основною функцією мРНК є перенесення інформації від ДНК (точніше, від гена) на білоксинтезуючу систему клітини. мРНК виконує роль матриці і, отже, визначає первинну структуру синтезованого білка. мРНК наділені рядом особливостей первинної структури; зокрема, на 5'-кінці всі вони містять певну послідовність рибонуклеотидів, що отримала назву шапочки (кеп). Першим нуклеотидом є 7-метілгуанозінтрифосфат, який приєднується до 5'-гідроксилу сусіднього мононуклеотиду, представленого 2'-О-метілпуриновим нуклеотидом. На іншому 3'-кінці більшості (але не всіх) мРНК міститься поліаденілова послідовність (полі-А), що налічує від 150 до 200 нуклеотидів.

Роль «кепування» та «поліаденування» мРНК в білковому синтезі остаточно не з'ясована. Припускають, що кап необхідний для специфічного впізнання в процесі трансляції, в той час як полі-А відводиться роль фактора стабілізації всієї молекули мРНК.

В останні роки розшифрована первинна структура не тільки низькомолекулярних 5S рРНК різних бактерій та 5,8 S рРНК клітин тварин, але й високомолекулярних 16S і 18S рРНК, що нараховують до 1200-1500 нуклеотидних ланок. Більш того, вже з'ясовані нуклеотидні послідовності 23S рРНК *E.coli* і 25S рРНК дріжджової клітини, а також первинні структури високомолекулярних (28S) рРНК клітин еукаріотів, що нараховують близько 4700 нуклеотидів.

Вторинна структура РНК. Молекули РНК являють собою одиничні полінуклеотидні ланцюги. Окремі ділянки молекули РНК можуть з'єднуватися і утворювати подвійні спіралі. За своєю структурою спіралі РНК схожі на А-форму ДНК. Однак часто спаровування основ в таких спіралях буває неповним, а іноді навіть і не уотсон-Криковським. В результаті внутрішньомолекулярного спаровування основ формуються такі вторинні структури, як стебло-петля («шпилька») і псевдовузол. Вторинні структури в мРНК служать для регуляції трансляції. Наприклад, вставка в білки незвичайних амінокислот, селенометіоніна і пірролізіна, залежить від «шпильки», розташованої в 3' нетранслюємій області. Псевдовузли служать для програмованого зсуву рамки зчитування при трансляції.

У вірусних мРНК складні вторинні структури (IRES) направляють трансляцію, незалежну від впізнання кепа і факторів ініціації трансляції.

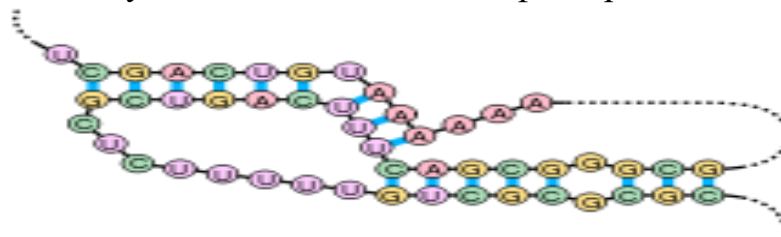


Рис. 42. «Псевдовузол» — елемент вторинної структури РНК

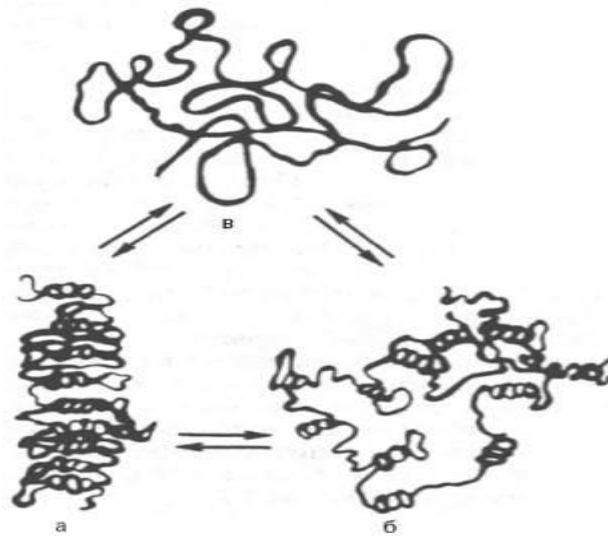


Рис. 43. Третинна структура РНК в розчині залежно від іонної сили, температури і рН середовища (схема) (по А.С. Спірину та Л.П. Гавриловій).
 а - компактна паличка, б - компактний клубок; в - розгорнутий ланцюг.

Дані про структуру РНК свідчать про те, що нативні молекули РНК мають приблизно однакову третинну структуру, яка відрізняється від плоскої структури «листа конюшини» великою компактністю за рахунок складання різних частин молекули. Слід вказати на існування у ряду вірусів (реовіруси, вірус ранових пухлин рослин та ін) природних дволанцюжкових РНК, що володіють однотипною з ДНК структурою. При фізіологічних значеннях рН середовища, іонної сили і температури створюються умови для утворення в одностанцюгових матричних і рибосомних РНК безлічі ділянок з подвійною спіраллю («шпильки») і подальшого формування комплементарних ділянок, що визначають певною мірою жорсткість їх третинної структури (рис. 43). В даний час отримано докази значущості вандерваальсових (диполь-дипольних і лондоновських) зв'язків між азотистими основами у стабілізації загальної просторової конфігурації нуклеїнових кислот.

Особливості структури тРНК. На 3'-кінці молекули завжди знаходяться чотири неспарених нуклеотида, причому три з них - це обов'язково ССА. 5'-і 3'-кінці ланцюга РНК утворюють акцепторне стебло. Ланцюги утримуються разом завдяки комплементарному спаровуванню семи нуклеотидів 5'-кінця з сімома нуклеотидами, що знаходяться поблизу 3'-кінця. У всіх молекул існує шпилька ТС, що позначається так тому, що вона містить два незвичайних залишка: рибо-тимідин (Т) і псевдоуридин. Шпилька складається з дволанцюжкового стебла з п'яти спарених основ, включаючи пару GC, і петлі довжиною сім нуклеотидів. Трінуклеотид ТС завжди розташований в одному і тому ж місці петлі. У антикодоновій шпильці стебло завжди представлене сімома спареними основами. Триплет,

комплементарний родинному кодону, - антикодон - знаходиться в петлі, що складається з семи нуклеотидів. З 5'-кінця антикодон фланкують інваріантний залишок урацилу і модифікований цитозин, а до його 3'-кінця примикає модифікований пурин, як правило, аденін. Ще одна шпилька складається з стебла довжиною три-чотири пари нуклеотидів і петлі варіюючого розміру, часто містить урацил у відновленій формі - дігідроурацил (DU). Найбільш сильно варіюють нуклеотидні послідовності стебел, число нуклеотидів між антикодоновим стеблом і стеблом ТС (Варіабельна петля), а також розмір петлі і локалізація залишків дігідроурацила в DU-петлі.

Структура рРНК. Переважна більшість відомих рРНК являє собою ковалентно-безперервний полінуклеотидний ланцюг. Однак у деяких бактерій і найпростіших виявлені рРНК, побудовані з великих фрагментів, асоційованих з допомогою вторинних (нековалентних) взаємодій.

Вважають, що рРНК являють собою сукупність коротких однотяжевих і двоспиральних ділянок. Останні утворюються в результаті комплементарного спаровування сусідніх або досить віддалених одна від одної ділянок одного і того ж полінуклеотидного ланцюга. При цьому поряд з канонічними уотсон-кріковськими парами в двоспиральних ділянках зустрічаються пари G-U, G-A і A-C.

Способи укладання полінуклеотидних ланцюгів рРНК в специфічні вторинні структури відрізняються виключно еволюційною консервативністю. рРНК одного типу незалежно від джерела виділення та незважаючи на велику різницю у нуклеотидних послідовностях характеризується універсальним способом організації вторинної структури. У вторинній структурі кожного з типів рРНК можна виявити певні домени (самостійно організовані області), котрі також універсальні для даного типу рРНК.

Виходячи з подібності в морфології субчастин рибосом різних організмів, а також з універсальності їх функцій можна вважати, що кожен з типів рРНК має також універсальну третинну структуру.

У рибосомних субчастинах рРНК характеризується виключно компактною упаковкою, котра створюється за допомогою іонів двовалентних металів (гол. чином Mg^{2+}) та рибосомних білків. При цьому основна частина рРНК розташовується усередині рибосомних субчастин. Окремі ділянки рРНК знаходяться на поверхні субчастин. Вони виконують важливу біол. роль, формуючи функціональні центри рибосом (центри зв'язування матричних і транспортних РНК і білкових факторів трансляції).

Індивідуальні рРНК в препаративних кількостях отримують з ізольованих субчастин рибосом або ультрацентрифугуванням сумарної РНК в градієнті концентрації сахарози. Для аналітичних цілей індивідуальні рРНК можуть бути отримані за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі.

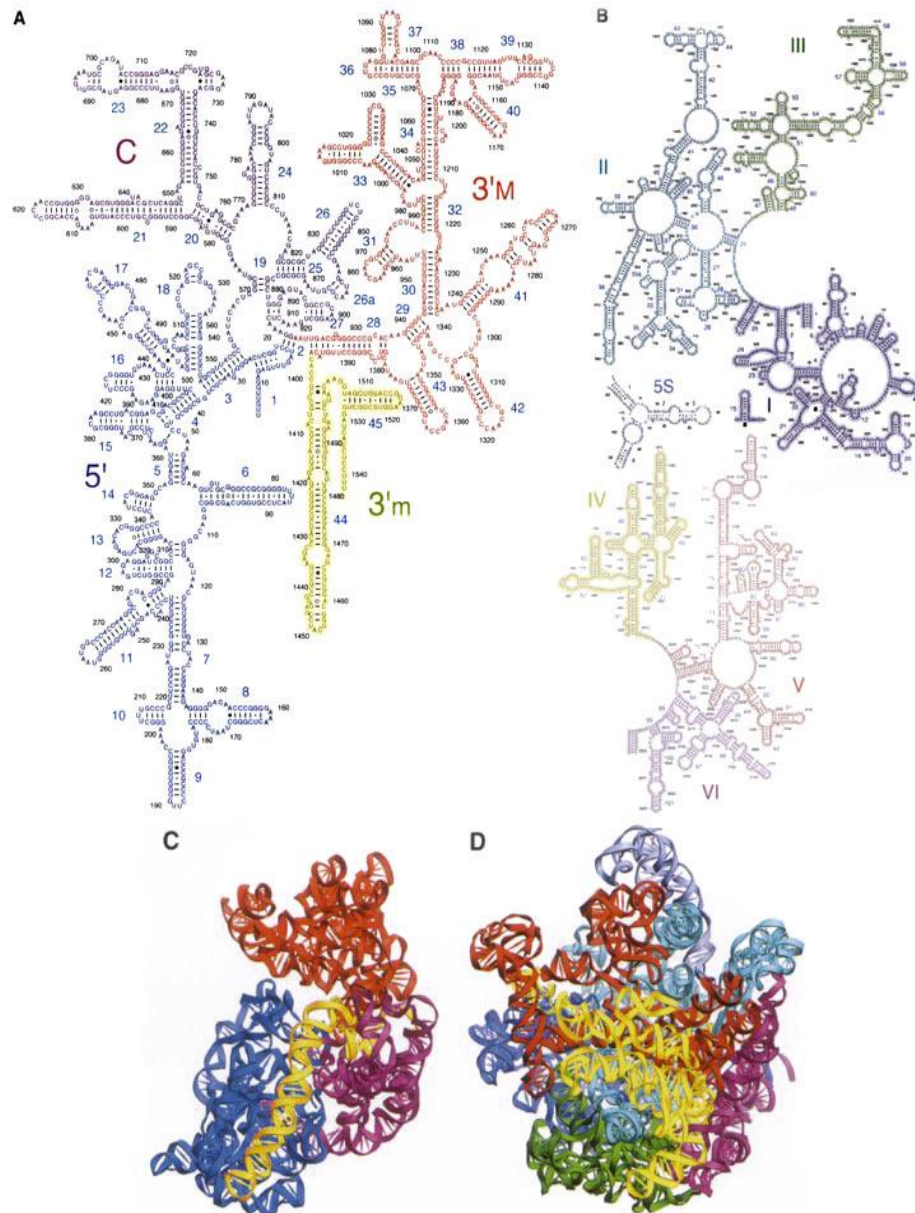


Рис. 44. А. Вторинна структура і доменна організація рибосомальної 16S РНК *T.thermophilus*. 5'-домен позначений синім кольором, центральний - фіолетовим, 3'-маюг - червоним і 3'-тіпог - жовтим. Спіральні ділянки пронумеровані від 1 до 45.

В. Вторинна структура і доменна організація 16S і 5S РНК *T.thermophilus*. Шість доменів позначені різними кольорами, спіральні ділянки пронумеровані від 1 до 101.

С. Тривимірна структура рРНК малої субодиниці. Колір доменів відповідає рис. А. Домени утворюють окремі блоки укладання. D. Тривимірна структура рРНК великої субодиниці. Колір доменів відповідає рис. В. У процесі укладання (фолдінга) домени сильно переплітаються один з одним.

Кодування первинної структури поліпептидів (білків)

Білкі — складні високомолекулярні природні органічні речовини, що складаються з амінокислот, сполучених пептидними зв'язками. В однині (білок) термін найчастіше використовується для посилання на білок, як речовину, коли не важливий її конкретний склад, та на окремі молекули або типи білків, у множині (білки) — для посилання на деяку кількість білків, коли точний склад важливий.

Зазвичай білки є лінійними полімерами — поліпептидами, хоча інколи мають складнішу структуру. Невеликі білкові молекули, тобто олігомери поліпептидів, називаються пептидами. Послідовність амінокислот у конкретному білку визначається відповідним геном і зашифрована генетичним кодом. Хоча генетичний код більшості організмів визначає лише 20 «стандартних» амінокислот, їхнє комбінування уможливорює створення великого різноманіття білків із різними властивостями. Крім того, амінокислоти у складі білка часто піддаються посттрансляційним модифікаціям, які можуть виникати і до того, як білок починає виконувати свою функцію, і під час його «роботи» в клітині. Для досягнення певної функції білки можуть діяти спільно, і часто зв'язуються, формуючи великі стабілізовані комплекси (наприклад, фотосинтетичний комплекс).

Функції білків в клітині різноманітніші, ніж функції інших біополімерів — полісахаридів і нуклеїнових кислот. Так, білки-ферменти каталізують перебіг біохімічних реакцій і грають важливу роль в обміні речовин. Деякі білки виконують структурну або механічну функцію, утворюючи цитоскелет, що є важливим засобом підтримки форми клітин. Також білки грають важливу роль у сигнальних системах клітин, клітинній адгезії, імунній відповіді і клітинному циклі.

Білки — важлива частина харчування тварин і людини, оскільки ці організми не можуть синтезувати повний набір амінокислот і повинні отримувати частину з них із білковою їжею. У процесі травлення протелітичні ферменти руйнують спожиті білки, розкладаючи їх до рівня амінокислот, які використовуються при біосинтезі білків організму або піддаються подальшому розпаду для отримання енергії.

Білки були вперше описані шведським хіміком Єнсом Якобом Берцеліусом в 1838 році, який і дав їм назву *протеїни*, від грец. *πρωτα* — «першорядної важливості». Проте, їхня центральна роль в життєдіяльності всіх живих організмів була виявлена лише у 1926 році, коли Джеймс Самнер показав, що фермент уреазы також є білком. Секвенування першого білка — інсуліну, тобто визначення його амінокислотної послідовності, принесло Фредерику Сенгеру Нобелівську премію з хімії 1958 року. Перші тривимірні структури білків гемоглобіну і міоглобіну були отримані за допомогою рентгеноструктурного аналізу, за що автори методу, Макс Перуц і Джон Кендрю, отримали Нобелівську премію з хімії 1962 року.

Під час транскрипції відбувається зчитування генетичної інформації, зашифрованої в молекулах ДНК, і запис цієї інформації в молекули мРНК.

Під час ряду послідовних стадій процесингу з мРНК видаляються деякі фрагменти, непотрібні в подальших стадіях (сплайсинг), і відбувається редагування нуклеотидних послідовностей. Після транспортування зрілої молекули мРНК з ядра до рибосом відбувається власне синтез білкових молекул шляхом приєднання окремих амінокислотних залишків до поліпептидного ланцюжка, що росте. На останній стадії посттрансляційної модифікації відбуваються зміни новосинтезованого білка додаванням небілкових молекул до білка та ковалентними модифікаціями його амінокислот.

Для функціонування білків украй важлива як його амінокислотна (пептидна) послідовність, так і тривимірна структура, яка формується в процесі згортання (англ. *folding*). Тривимірна структура білків за нормальними природними умовами називається нативним станом білка. Зазвичай структура білків поділяється на чотири рівні:

Первинна структура — послідовність амінокислот у пептидному ланцюжку.

Вторинна структура — регулярні під-структури (наприклад альфа-спіралі і бета-листи), які визначаються локально, таким чином що в одній молекулі білка зазвичай існує багато подібних структурних елементів (мотивів).

Третинна структура — тривимірна структура єдиної білкової молекули, просторове розташування вторинних структур.

Четвертинна структура — комплекс кількох молекул білка або поліпептидних ланцюжків, зазвичай називається білком у цьому контексті, які функціонують разом у складі білкового комплексу.

На додаток до цих рівнів структури, білок може змінюватися між кількома подібними структурами в процесі виконання своєї біологічної функції. У контексті цих функціональних перестановок, ці третинні або четвертинні структури зазвичай називаються конформаціями, а переходи між ними — конформаційними змінами.

Первинна структура утримується за допомогою пептидних зв'язків типу ковалентних зв'язків, що утворюються в процесі стадії трансляції біосинтезу білків. Ці пептидні зв'язки забезпечують жорсткість білка. Два кінці амінокислотного ланцюжка називаються С-кінцем або карбоксильним кінцем і N-кінцем або аміно-кінцем.

Різні види вторинної структури виникають локально між амінокислотами поліпептидного ланцюжка і стабілізуються водневими зв'язками. Проте, ці водневі зв'язки загалом недостатньо стійкі самостійно, тому що водневий зв'язок з молекулами води зазвичай сприятливіший, ніж водневий зв'язок між амідними групами. Тому вторинна структура стійка тільки коли локальна концентрація води достатньо низька, наприклад, в межах глобули або у повністю згорнутому білку.

Так само як і вторинна структура, утворення глобул і третинної структури стабілізується переважно структурно неспецифічними взаємодіями, наприклад спорідненістю амінокислот і гідрофобними

взаємодіями. Проте, третинна структура стабілізується тільки коли деякі частини білка закріплені структурно специфічними взаємодіями, наприклад іонними зв'язками (солевими містками), водневими зв'язками і стерічною упаковкою бічних ланцюжків. Третинна структура позаклітинних білків може також стабілізуватися дисульфідними зв'язками, які скорочують ентропію розгорненого стану. Дисульфідні зв'язки надзвичайно рідкі в цитоплазматичних білках, тому що цитозоль зазвичай є відновлюючим оточенням.

Формування первинної структури. Трансляція у білків полягає в синтезі поліпептидного ланцюжка відповідно до інформації, закодованої в матричній РНК. Амінокислотна послідовність шифрується за допомогою транспортних РНК (тРНК), які утворюють з амінокислотами комплекси — аміноацил-тРНК. Кожній амінокислоті відповідає своя тРНК, що має відповідний антокодон, «відповідний» до кодону мРНК. Під час трансляції рибосома рухається уподовж мРНК, у міру цього нарощується поліпептидний ланцюжок. Енергією біосинтезу білка забезпечується за рахунок АТФ.

Готова білкова молекула потім відщеплюється від рибосоми і транспортується в потрібне місце клітини. Тоді як цитоплазматичні білки рухаються за допомогою дифузії та молекулярних моторів, мембранні білки, білки органел та білки позначені для секреції синтезуються на мембранах клітини (у випадку еукаріотів на мембранах ендоплазматичного ретикулума), одразу проходять встроюються мембрану та направляються до відповідної органели або секретуються відповідно до сигнальних послідовностей у складі білка (яка зазвичай видаляється після цього за допомогою протеолітичних ферментів).

Для досягнення свого активного стану деякі білки вимагають додаткової посттрансляційної модифікації. Ці модифікації здатні значно розширити різноманітність можливих білків, надаючи їм нові властивості. Прикладами пост-трансляційних модифікацій служить приєднання різних функціональних груп, приєднання ліпідів і вуглеводнів, зміна стандартних амінокислот на нестандартні (наприклад, утворення цитруліну), структурні зміни (наприклад, утворення дисульфідних містків між цистеїнами), видалення частини білка як на початку (сигнальна послідовність, старт-кодон), так і в окремих випадках в середині.

Зв'язування ліганду з лінійним полімером. Для експериментального визначення константи зв'язування зазвичай здійснюють титрування одного реагуючого компонента іншим, визначають рівноважні концентрації компонентів суміші та будують графік, в тих чи інших координатах, залежності ступеня зв'язування ліганду від його вільної концентрації — так звану ізотерму зв'язування (адсорбції).

Розглянемо для прикладу взаємодію з лігандом однакових коротких фрагментів ДНК, з кожним із яких може зв'язатись тільки один ліганд. Тобто

маємо звичайну бімолекулярну реакцію: записавши концентрацію комплексу як $X = \theta X_{tot}$, де θ – частка фрагментів у складі комплексу, X_{tot} – загальна концентрація фрагментів, а концентрацію вільних фрагментів як $S = (1 - \theta)X_{tot}$, отримуємо вираз для константи зв'язування:

$$K = \frac{\theta}{(1 - \theta)L},$$

який, власне, і встановлює співвідношення між ступенем зв'язування θ і вільною концентрацією ліганду L . З цього виразу можна легко отримати інші форми ізотерми зв'язування:

$$\theta = \frac{KL}{1 + KL}$$

або

$$\theta / L = K(1 - \theta).$$

Останній вираз – ізотерма в координатах Скетчарда (George Scatchard) – установлює лінійну залежність θ/L від θ , нахил якої дорівнює константі зв'язування.

Розглянута проста бімолекулярна схема зазвичай не може бути застосована до ДНК – лінійного полімеру, вздовж якого регулярно повторюються стандартні мономерні елементи (за винятком випадку, коли ліганд з високою специфічністю зв'язується тільки з одним конкретним сайтом у межах молекули ДНК). Справа в тому, що на незаповненому полімері кожна пара основ може слугувати початком сайту зв'язування – кількість потенційних сайтів зв'язування дорівнює загальній кількості мономерних одиниць (нехтуючи кінцевими ефектами для досить довгого полімеру), тобто потенційні сайти перекриваються. При поступовому заповненні полімеру між зв'язаними лігандами з певною ймовірністю утворюються прогалини, менші за розміром, ніж довжина сайту, – хоча прогалина містить певну кількість вільних мономерів, там не може розміститись новий ліганд (рис.). У результаті кількість вільних сайтів зв'язування зменшується швидше, ніж зростає ступінь заповнення полімеру.

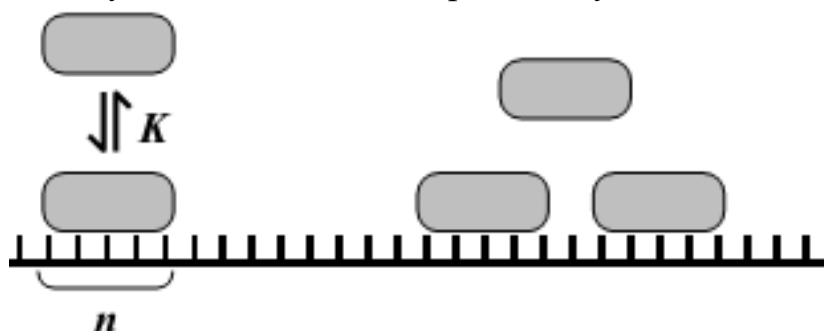


Рис. 45. Зв'язування лігандів із довгим лінійним полімером.
K – константа зв'язування, **n** – розмір сайту зв'язування

Розглянемо найпростішу модель, зображену на рис. 45: з нескінченно довгим полімером (загальна кількість мономерних одиниць N) зв'язано q лігандів, кожен із яких займає n мономерних одиниць на полімері; зв'язування характеризується константою K , концентрація вільного ліганду дорівнює L . Зрозуміло, що для ДНК під мономерними одиницями слід розуміти пари основ або, іноді, фосфатні залишки. У найпростішому випадку ліганди не розрізняють пари основ (зв'язування неспецифічне) і зв'язуються незалежно один від одного – не взаємодіють між собою. Загальна вільна енергія такої системи, відрахована від рівня повністю вільного полімеру, має вигляд:

$$G = -q \ln KL - RT \ln W,$$

де перший член дорівнює вільній енергії зв'язування q лігандів, другий – ентропійний внесок, який залежить від кількості W переставлень q лігандів по полімеру. Для q зв'язаних лігандів загальна кількість вільних пар основ дорівнює $(N - nq)$, кожна з них плюс ще q пар може бути використана як перша пара, що розпочинає один з q зайнятих сайтів (без втрати загальності будемо вважати, що полімер має напрямок – наприклад, зліва на право). Кількість переставлень W – це кількість способів обрати q перших пар із зазначеної загальної кількості – кількість сполучень $z(N - nq + q)$ по q . Отже,

$$W = \frac{(N - nq + q)!}{q!(N - nq)!}.$$

Після підстановки цього виразу в попередній, позбавившись від факторіалів великих чисел за допомогою формули Стирлінга, розділивши ліву і праву частини на NRT та позначивши $\nu = q/N$ (щільність зв'язування – кількість зв'язаних лігандів на одну мономерну одиницю), отримаємо вільну енергію в одиницях RT на одну пару основ як функцію щільності зв'язування

$$g = -\nu \ln KL + (1 - n\nu) \ln \frac{1 - n\nu}{1 - n\nu + \nu} + \nu \ln \frac{\nu}{1 - n\nu + \nu}.$$

Деяка рівноважна щільність зв'язування відповідає мінімуму цієї вільної енергії. Мінімізація g відносно ν (як завжди, слід узяти похідну від g по ν та прирівняти її до нуля) дає рівноважне значення ν для даної концентрації L – вираз для ізотерми зв'язування. У координатах Скетчарда ізотерма має вигляд

$$\frac{\nu}{L} = K \frac{(1 - n\nu)^n}{(1 - n\nu + \nu)^{n-1}}.$$

Якщо зв'язування підпорядковується розглянутій моделі, підгонка цього рівняння під експериментально отриману ізотерму дозволяє визначити параметри K та n .

При $n=1$ (сайти не перекриваються) останнє рівняння перетворюється на $v/L = K(1 - v)$, що збігається з рівнянням графіка Скетчарда лінійно зменшується при зростанні щільності зв'язування до його максимального значення $v_{max} = 1$; при $v=0$ ордината дорівнює константі зв'язування (рис.46)

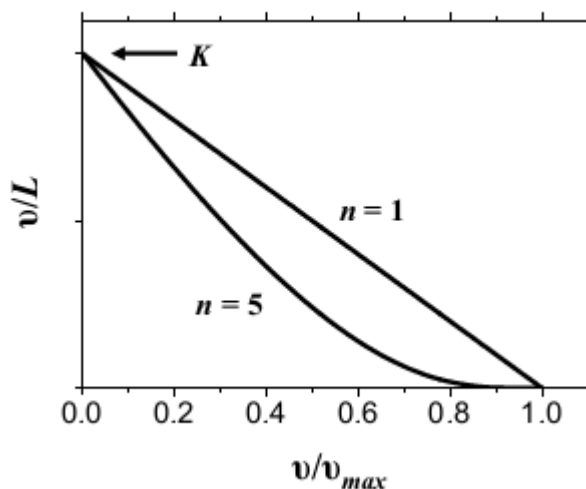


Рис. 46. Ізотерма зв'язування лігандів з лінійним полімером

Ізотерми зв'язування лігандів з лінійним полімером у координатах Скетчарда при двох значеннях розміру сайту зв'язування.

Як видно з рівняння, при $v=0$ ордината дорівнює константі для будь-яких n , але при $n > 1$ графік прогинається донизу (тим більше, чим вище n), і максимальна щільність $v_{max} = 1/n$ стає практично недосяжною (рис. 46). Така поведінка є прямим наслідком перекриття потенційних сайтів зв'язування – при зростанні щільності збільшується кількість вільних пар основ, що входять до складу надто коротких прогалин між зв'язаними лігандами.

Підстановка умови рівноваги у вираз для вільної енергії дозволяє отримати рівняння для зміни вільної енергії від початку реакції (коли полімер вільний від лігандів) до стану рівноваги (сумарний енергетичний ефект реакції в одиницях RT на одну пару основ):

$$g_{eq} = \ln \frac{1 - nv}{1 - nv + v},$$

де v – рівноважне значення щільності, яке визначається рівнянням. У граничному випадку $n=1$ останнє рівняння перетворюється на добре відоме рівняння для звичайних бімолекулярних реакцій:

$$g_{eq} = \ln(1 - v) = -\ln(1 + KL).$$

Каталітична функція білків. Найбільш добре відома роль білків в організмі - каталіз різних хімічних реакцій. Ферменти - група білків, що володіє специфічними каталітичними властивостями, тобто кожен фермент каталізує одну або декілька схожих реакцій. Ферменти каталізують реакції розщеплювання складних молекул (катаболізм) та їх синтезу (анаболізм), а

також реплікації і репарації ДНК і матричного синтезу РНК. Відомо кілька тисяч ферментів, серед них такі, як, наприклад пепсин, розщеплюють білки в процесі травлення. У процес посттрансляційної модифікації деякі ферменти додають або видаляють хімічні групи на інших білках. Відомо близько 4000 реакцій, що каталізуються білками. Прискорення реакції в результаті ферментативного каталізу іноді величезна: наприклад, реакція, що каталізується ферментом оротат-карбоксілази протікає в 10¹⁷ швидше некаталізуємої (78000000 років без ферменту, 18 мілісекунд за участю ферменту).

Молекули, які приєднуються до ферменту і змінюються в результаті реакції, називаються субстратами. Хоча ферменти зазвичай складаються з сотень амінокислот, тільки невелика частина з них взаємодіє з субстратом, і ще менша кількість - в середньому 3-4 амінокислоти, часто розташовані далеко один від одного в первинній амінокислотній послідовності - безпосередньо беруть участь в каталізі. Частина ферменту, яка приєднує субстрат і містить каталітичні амінокислоти, називається активним центром ферменту.

Структура рибосом. Рибосома як молекулярна машина

Рибосоми було виявлено на початку 1950-тих років. Перше глибоке дослідження та опис рибосом, як клітинних органел, було здійснене Джорджем Паладе (George E. Palade). За іменем дослідника, рибосоми були названі «частинками Паладе», але згодом, в 1958 році, їх було перейменовано в «рибосоми» з огляду на високий вміст РНК. Роль рибосом в біосинтезі білків було встановлено більш ніж десятиліттям пізніше.

Рибосома (*ribosome*) є немембранною органелою клітини, що складається з рРНК та рибосомних білків (протеїнів). Рибосома здійснює біосинтез білків транслюючи мРНК поліпептидний ланцюг. Таким чином, рибосому можна вважати фабрикою, що виготовляє білки, базуючись на наявній генетичній інформації. В клітині дозрілі рибосоми знаходяться переважно в компартментах, для активного білкового синтезу. Вони можуть вільно плавати в цитоплазмі або бути прикріпленими до цитоплазматичного боку мембран ендоплазматичного ретикулуму чи ядра. Активні (ті що є в процесі трансляції) рибосоми знаходяться переважно у вигляді полісом. Існує ряд свідчень, які вказують на те, що рибосома є рибозимом.

Загальна будова рибосоми та молекулярний склад.

Рибосоми прокариотів та еукариотів є дуже подібними за будовою та функцією, але відрізняються розміром. Вони складаються з двох субодиниць: однієї великої та однієї малої. Для процесу трансляції необхідна злагоджена взаємодія обох субодиниць, що разом становлять комплекс із молекулярною масою декілька мільйонів дальтон (Da). Субодиниці рибосом за звичай позначаються одиницями Сведберга (S), що є мірою швидкості седиментації під час центрифугування і залежать від маси, розміру та форми частинки.

Позначені в цих одиницях, велика субодинаця є 50S або 60S (прокаріотичні або еукаріотичні, відповідно), мала є 30S або 40S, і ціла рибосома (комплекс малої разом з великою) 70S або 80S.

Молекулярний склад. Молекулярний склад рибосом є доволі складним. Для прикладу, рибосома дріжджів «*Saccharomyces cerevisiae*» складається із 79 рибосомних білків та 4 різних молекул рРНК. Біогенез рибосом є також надзвичайно складним і багатоступеневим процесом, що відбувається в ядрі та ядерці еукаріотичної клітини.

Атомна структура великої субодинаці (50S) організму *Haloarcula marismortui* була опублікована N. Van *et al.* в журналі *Science* 11 серпня 2000 року. Невдовзі після цього, 21 вересня 2000 року, В. Т. Wimberly, *et al.*, опублікували в журналі *Nature* структуру 30S субодинаці організму *Thermus thermophilus*. Використовуючи ці координати, М.М. Yusupov, *et al.* зуміли реконструювати цілу 70S частинку *Thermus thermophilus* і опублікувати її в журналі *Science*, в травні 2001. У 2009 році професор Джордж Чьорч (George Church) та колеги з Гарварду створили повністю функціональну штучну рибосому в звичайних умовах, які присутні в клітинному середовищі. Як конструкторні елементи використовувались молекули з розщепленої за допомогою ензимів кишкової палички. Створена рибосома успішно синтезує білок, що відповідає за біolumінесценцію.

Рибосомні білки. Кожна рибосомна субчастина містить багато молекул рибосомних білків, і всі вони різні (рис. 47). У цьому відношенні рибосомний рибонуклеопротейд принципово відрізняється від вірусного, де білкова оболонка будується з однотипних білків за рахунок їх симетричної шарової упаковки на поверхні РНК. Самозбірки четвертинної структури - фізичний механізм реалізації симетричної упаковки ідентичних білкових молекул в шарі, характерної для вірусних нуклеопротейдів. Однак така білкова самозбірка неможлива в разі різнорідних білкових молекул, якими є рибосомні білки. Тут реалізується інший принцип: кожен рибосомний білок має свій персональний посадочний майданчик на рибосомній РНК. Білок специфічно розпізнає тільки цю ділянку РНК і сідає на нього. Так, на рибосомній РНК розсаджуються всі різнотипні рибосомні білки. На 23S РНК бактеріальної рибосоми за рахунок такого специфічного РНК-білкового впізнання розсаджуються 32 різні білкові молекули, а на 16S РНК - 21 білок. Вже зазначалося, що рибосомна РНК формує ядро рибосомної субчастини, а білки в середньому тяжіють до периферії.

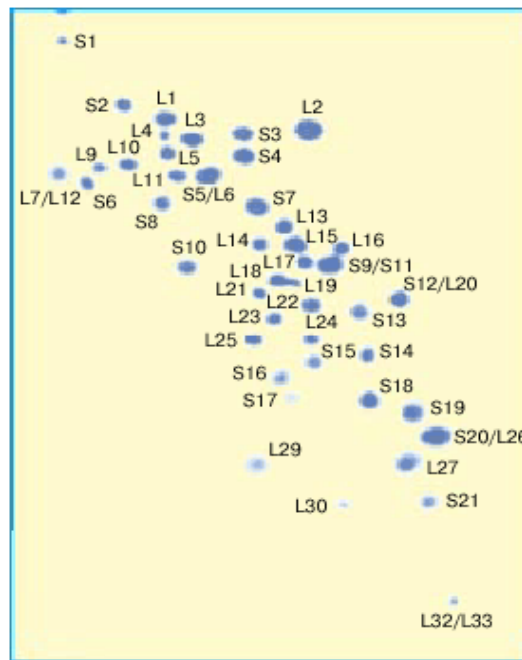


Рис. 47. Двовимірний електрофорез у поліакриламідному гелі. Буквою **S** (small) позначаються білки малої (30S) субчастини, а буквою **L** (large) - великої (50S) субчастини рибосоми

Рибосомні білки *E.coli*. Більше 50 рибосомних білків виділено в високоочищеному стані. Молекулярна маса самого маленького білка становить 5 кДа, самого великого - 61 кДа, більшості рибосомних білків - 10-20 кДа. Визначено амінокислотні послідовності поліпептидних ланцюгів всіх рибосомних білків *E.coli*. Мала рибосомна субчастина містить 21 білок з сумарною молекулярною масою 350 кДа. Білки в складі субчастини 30S асоційовані з 16S рНК, довжина якої становить 1542 нуклеотида (нт). Сумарні молекулярні маси малої та великої субчастин рибосом досягають відповідно 850 і 1450 кДа. Третя частина маси великої субчастини припадає на 34 рибосомних білка, а дві третіх - на 23S (2904 нт) і 5S рНК (120 нт).

Виявлені специфічні внутрішньомолекулярні і міжмолекулярні взаємодії між різними функціональними ділянками рНК. На пряму участь 23S рНК в трансляції вказує наявність специфічних комплементарних взаємодій між нею і ССА-кінцями тРНК, які акцептують амінокислотні залишки.

Самозбірка рибосом включає ряд послідовних реакцій. рНК що транскрибуються негайно упаковуються рибосомними білками для утворення рибосом (перші рНК-білкові взаємодії мають місце ще в той час, коли триває транскрипція генів рНК). Упаковка відбувається в ядрі, в крупній окремій структурі, званій ядерцем. Таким чином, ядерце - це місце процесингу рНК з більш великої рНК-попередниці і одночасно місце їх складання в рибосоми за рахунок зв'язування рибосомних білків.

Ядерце містить великі петлі ДНК, що виступають з деяких хромосом, при цьому кожна петля містить кластер генів рРНК. Кожен такий кластер генів називається районом ядерцевого організатора. Тут гени рРНК транскрибуються з високою швидкістю РНК-полімеразою I. 45S рРНК-транскрипт спочатку упаковується в крупний комплекс, що містить багато різних білків, що імпортуються з цитоплазми. Більшість з 80 поліпептидів, які складають рибосому, також як і 5S рРНК, включається на цьому етапі. Ядерце також містить інші РНК-зв'язуючі білки та деякі малі рибонуклеопротеїнові частинки (включаючи U3 snRNP (U3-мяРНП)), які, як вважають, потрібні для процесингу 45S рРНК, для направлення процесу складання рибосом і допомагають каталізувати цей процес. Ці компоненти залишаються в ядерці, коли рибосомні субодиниці експортуються в цитоплазму в завершній формі. Одним з таких компонентів є присутній у великих кількостях РНК-зв'язуючий білок - нуклеолін, який, мабуть, одягає тільки транскрипти генів рРНК.

По ходу свого процесингу 45S рРНК втрачає частину РНК і білків і потім розщеплюється з утворенням окремих попередників великої рибосомної субодиниці і відбуваються тільки в той час, коли ці субодиниці транспортуються у цитоплазму. Така затримка запобігає доступ функціональних рибосом до не повністю процесованих молекул hnРНК в ядрі.

На підставі електронних мікрофотографій в полісомі можна виділити такі зони:

1. Слабо зафарбований фібрилярний центр, що містить ДНК, яка активно не транскрибується;
2. Щільний фібрилярний компонент, що містить молекули РНК в процесі синтезу;
3. Гранулярний компонент, що містить частинки-попередниці рибосом, які дозрівають.

Таким чином, ядерце побудовано за рахунок специфічного зв'язування незавершених рибосомних попередників один з одним, формують велику мережу. Відмінності в розмірах ядерця в основному залежать від відмінностей у кількості гранулярного компоненту, яке, можливо, контролюється на рівні транскрипції рибосомних генів (контроль частки активованих рибосомних генів і швидкості транскрипції кожного гена).

При вході клітини в мітоз, хромосоми конденсуються, синтез РНК припиняється, а ядерце зникає. У телофазі синтез РНК відновлюється, і крихітні ядерця з'являються в місцях хромосомної локалізації генів рРНК. У людських клітинах, так як гени рРНК розташовані на 5 хромосомах на гаплоїдний геном, після мітозу утворюється 10 маленьких ядерця, які швидко ростуть і зливаються в одне велике ядерце, типове для багатьох інтерфазних клітин. По-видимому, принаймні деякі з РНК-компонентів і білкових компонентів розібраних ядерця в ході мітозу розподіляються по поверхні всіх метафазних хромосом і транспортуються в якості вантажів в дочірні ядра, де по мірі деконденсації хромосом ці старі ядерцеві компоненти

допомагають відтворювати ядрця, що формуються заново.

Транслокація - тип хромосомних мутацій, при яких відбувається перенесення ділянки хромосоми на негомологічну хромосому. Окремо виділяють реципрокні транслокації, при яких відбувається взаємний обмін ділянками між негомологічними хромосомами, і робертсонівські транслокації, або центричні злиття, при яких відбувається злиття акроцентричних хромосом з повною або частковою втратою матеріалу коротких плечей.

Транслокації, також як і інші хромосомні перебудови, грають роль в видоутворенні, в зниженні фертильності, в онкологічних та уроджених спадкових захворюваннях. Різні транслокації в соматичних клітинах призводять до розвитку лімфом, сарком, лейкозів.

Для формування транслокації необхідною умовою є пошкодження ДНК у вигляді двониткових розривів з наступною помилкою репарації: неправильним з'єднанням розривів при репарації шляхом негомологічної рекомбінації або помилковим вибором паралогічної замість гомологічної послідовності ДНК при репарації шляхом гомологічної рекомбінації. Двониткові розриви ДНК можуть виникати внаслідок впливу екзогенними факторами, такими як іонізуюче випромінювання або хіміотерапія, а також внаслідок впливу на ДНК ендогенно вільними радикалами які утворюються.

Визначення транслокацій. У медичній генетиці для позначення транслокацій використовують Міжнародну систему по цитогенетичній номенклатурі людини (The International System for Human Cytogenetic Nomenclature - ISCN). Запис $t(A; B)(p1; q2)$ позначає транслокацію між хромосомами А і В. Інформація в других дужках дається додатково для локалізації точок розриву всередині хромосоми А і В відповідно. Буква р означає коротке плече хромосоми, буква q - довге плече, цифри після р і q відносяться до нумерації хромосомних бендів. Для робертсонівських транслокацій використовується скорочення *der* або *rob*, наприклад, $der(13; 14)(q10; q10)$ або $rob(13; 14)(q10; q10)$.

Реципрокні транслокації. Реципрокні транслокації є збалансованою хромосомною перебудовою, при їх формуванні не відбувається втрати генетичного матеріалу. Вони є однією з найпоширеніших хромосомних аномалій в людській популяції, частота носійства варіює від 1/1300 до 1/700. Носії реципрокних транслокацій, як правило, фенотипово нормальні, при цьому мають підвищену ймовірність безпліддя, зниженої фертильності, спонтанних викиднів та народження дітей з вродженими спадковими захворюваннями, оскільки половина гамет у них генетично незбалансована через нерівноважного розбіжності перебудованих хромосом в мейозі. Вроджені збалансовані транслокації можуть давати аномальний фенотип у випадку, якщо точка розриву знаходиться всередині гена або всередині його регуляторних послідовностей, а також якщо перебудова призводить до зміни експресії гена за рахунок так званого ефекту положення.

Робертсонівські транслокації отримали свою назву по імені американського дослідника Вільяма Робертсона (W.R.B Robertson), вперше описав такі перебудови в 1916 р. при вивченні каріотипу близьких видів саранових. Робертсонівські транслокації є одним з найбільш поширених типів уроджених хромосомних аномалій у людини. За деякими даними, їх частота становить 1:1000 новонароджених. Їх носії фенотипово нормальні, однак у них існує ризик самовільних викиднів та народження дітей з незбалансованим каріотипом, який суттєво варіює залежно від хромосом, залучених до злиття, а також від статі носія. Більшість робертсонівських транслокацій зачіпають хромосоми 13 і 14. У структурі обертаності на пренатальну діагностику лідерами виявляються носії $der(13; 14)$ і $der(14; 21)$. Останній випадок, а саме, робертсонівські транслокації з участю хромосоми 21 призводить до так званого «сімейного» (успадкованого) синдрому Дауна.

Рухливість рибосоми. Робота рибосоми в якості «механізму протягування стрічки» послідовне прочитування ланцюга мРНК від одного кінця до іншого в ході елонгації та її здатність перекидати порівняно великі молекулярні маси (молекули тРНК) з однієї ділянки до іншої в кожному елементарному елонгаційному циклі (рис. 48, крок 3) припускають її механічну рухливість. Взаємна рухливість двох рибосомних субчастин може бути основним видом **великоблочної рухливості рибосоми** в ході роботи, і є експериментальні свідчення на користь такої рухливості. Крім того, існують вказівки на рухливість «головки» малої рибосомної субчастини щодо її «тіла» і на рухливість паличковидного бічного виступу великої рибосомної субчастини.

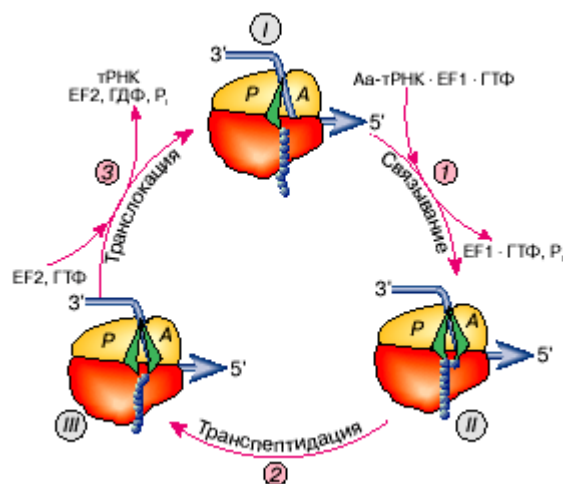


Рис. 48. Елементарний елонгаційний цикл рибосоми, в результаті якого прочитується один триплет (кодон) мРНК і утворюється один пептидний зв'язок (додається одна амінокислота до зростаючого поліпептиду).

У кожен даний момент в ході елонгації рибосома сидить на ділянці кодуєчої послідовності мРНК і утримує молекулу пептидил-тРНК. Пептидил-тРНК є зростаючим поліпептидним ланцюгом, ковалентно

приєднаний своїм С-кінцем до тРНК, який і приніс останній (С-кінцевий) амінокислотний залишок зростаючому пептиду. Коли пептидил-тРНК займає Р-ділянку рибосоми (стан I), рибосома може зв'язувати молекулу аміноацил-тРНК, відповідну кодону, встановленому на даний момент в А-ділянці (крок 1).

В результаті утримувана рибосоною пептидил-тРНК і знову пов'язана аміноацил-тРНК виявляються в рибосомі пліч-о-пліч (стан II). Рибосома (її пептидилтрансферазний центр на великій субчастині) каталізує реакцію транспептидації між цими двома субстратами рибосоми - пептидил-тРНК і аміноацил-тРНК: пептидильний залишок переноситься від «своєї» тРНК на аміногрупу аміноацил-тРНК, тим самим подовжуючись на одну амінокислоту на С-кінці (крок 2). Тепер в Р-ділянці залишилася деацільована тРНК, а в А-ділянці поміщається залишок тРНК подовженої пептидил-тРНК (стан III).

Наступний за цим акт транслокації полягає в тому, що деацільована тРНК виштовхується з Р-ділянки, а пептидил-тРНК (її залишок тРНК) переміщається разом зі зв'язаним з нею кодоном мРНК з А-ділянки в Р-ділянку (крок 3). У підсумку А-ділянку звільняється, і в ньому встановлюється наступний кодон мРНК. Цикл завершився. Повторення таких циклів за кількістю кодонів мРНК створює повний процес елонгації. Слід зазначити, що крок 1 (зв'язування аміноацил-тРНК) каталізується білком - фактором елонгації EF1 - за участю ГТФ, а крок 3 (транслокація) - іншим білком - фактором елонгації EF2 - і теж за участю ГТФ. В ході каталізу ГТФ розщеплюється (гідролізується) до ГДФ і ортофосфату

Молекулярні машини - білкові молекули або, частіше, макромолекулярні комплекси, утворені за участю білків, які здатні здійснювати спрямовані рухи. Робота таких машин забезпечує переміщення клітинних структур і органел (наприклад, розбіжність хромосом при клітинному розподілі), зміна форми клітин, активне переміщення клітин, активний транспорт через мембрану проти градієнту концентрації, м'язові скорочення, переміщення полімераз уздовж матриці при синтезі біополімерів подібне. Все це вимагає енергії, джерелом якої також АТФ (або інші нуклеозидтрифосфати).

Взагалі машина - це пристрій для перетворення тієї чи іншої форми енергії в рух. Звичайна механічна машина перетворює будь-яку енергію в механічну, умовою заощадження механічної енергії при цьому є висока інерція (маса) частин машини і певна їх жорсткі взаємна орієнтація. Точніше, конструкція машини викликає руху її частин тільки за певними заданими траєкторіями.

Молекулярна машина, на відміну від макроскопічної механічної машини, по-перше, маленька, тобто піддається тепловому руху своїх власних частин і зовнішніх молекул, що робить неможливим заощадження механічної енергії. По-друге, вона побудована з полімерів, а це значить, що її частинам притаманна конформаційна рухливість. Однак внаслідок того, що молекула білка має певну досить жорстку просторову організацію, конструкція

молекулярної машини допускає не будь-які, а певним чином спрямовані в просторі рухи її частин. Саме ці особливості молекулярної машини і використовуються для її роботи. Основні принципи цієї роботи:

- Конформаційна рухливість молекулярної машини забезпечує їй можливість існувати в декількох структурних станах (двох-трьох), які розрізняються головним чином на рівні просторового розташування великих структурних блоків доменів або субодиниць.
- Структурні стани мають різну спорідненість до певних лігандів. Взаємодії з лігандами (факторами) фіксують певні стани.
- Хімічні реакції, що каталізуються машиною, призводять до заміни лігандів, а відповідно і до переходу в інший структурний стан.
- Рушійною силою для переміщення блоків є тепловий рух: блоки рухаються хаотично (хоча і в відповідності з конструкцією машини) зв'язування лігандів і заміна їх внаслідок реакцій каталізують ці рухи у визначених напрямках.
- Результатом структурних перебудов є переміщення структурних блоків у просторі або зміна характеру взаємодії машини зі своїм оточенням, рух або всієї машини, або відносний рух її частин.

Робочий цикл рибосоми. Рибосомний синтез білка-багатоетапний процес. Перша стадія (ініціація) починається з приєднання матричної РНК (мРНК) до малої рибосомної субчастини, не пов'язаної з великою субчастиною. Характерно, що для початку процесу необхідна саме дисоційована рибосома. До утвореного так званого ініціаторного комплексу приєднується велика рибосомна субчастина. У стадії ініціації беруть участь спеціальний ініціюючий кодон, ініціаторним транспортна РНК (тРНК) і специфічні білки (т. зв. фактори ініціації). Пройшовши стадію ініціації, рибосома переходить до послідовного зчитування кодонів мРНК у напрямку від 5'-до 3'-кінця, що супроводжується синтезом поліпептидного ланцюга білка, кодованого цією мРНК.

У цьому процесі рибосома функціонує як **циклічно працююча молекулярна машина**. Робочий цикл рибосоми при елонгації складається з трьох тактів: 1) кодонзалежного зв'язування аміноацил-тРНК (поставляє амінокислоти в рибосому), 2) транспептидації-перенесення С-кінця зростаючого пептиду на аміноацил-тРНК, тобто подовження споруджуваної білкового ланцюга на одну ланку, 3) транслокації-переміщення матриці (мРНК) і пептидил-тРНК відносно рибосоми і перехід рибосоми в початковий стан, коли вона може сприйняти наступну аміноацил-тРНК. Коли рибосома досягне спеціального термінуючого кодону мРНК, синтез поліпептиду припиняється. За участю специфічних білків (так званих факторів термінації) поліпептид, що синтезується звільняється з рибосоми. Після термінації рибосома може повторити весь цикл з іншим ланцюгом мРНК або іншою кодуною послідовністю того ж ланцюга.

Методи визначення амінокислотного складу та первинної структури білків

Білки — це високомолекулярні біоорганічні сполуки, молекули яких побудовані із залишків амінокислот, кількісно перевищують усі інші органічні речовини, що є в складі живих організмів, і становлять понад половину їх сухої маси. Це сполуки, за допомогою яких генетична інформація дістає своє реальне втілення в побудові організму та всіх його властивостях. Якщо нуклеїнові кислоти є носіями генетичної інформації, то білки — носії фенотипової інформації, загальним втіленням якої є організм. Для зручності вивчення будови молекул білка, їх розташування в просторі визначають різні рівні структури білкової молекули: первинну, вторинну, третинну і четвертинну.

Первинна структура — це певна послідовність амінокислот у молекулах білків та пептидів, сполучених між собою ковалентними пептидними зв'язками. Первинна структура стабілізується також дисульфідними зв'язками, якщо вони є в білковій молекулі.

Вивчення первинної структури білка складається з кількох етапів. Спочатку визначають амінокислотний склад білка. Для цього здійснюють повний гідроліз білка в запаяних під вакуумом ампулах під дією 6 М розчину HCl (кислотний гідроліз) або 2—4 М розчину NaOH (лужний гідроліз) при 110 °С протягом 24 год. Добуту суміш амінокислот аналізують за допомогою іонообмінної хроматографії. Для визначення послідовності амінокислот у поліпептидному ланцюгу білок обробляють протеолітичними ферментами (трипсином, хімотрипсином, амінопептидазою, карбоксипептидазою тощо), які гідролізують пептидні зв'язки між певними амінокислотами. Потім суміш пептидів — продуктів часткового гідролізу — аналізують і визначають амінокислотний склад кожного пептиду, а також послідовність і взаєморозташування пептидів у молекулі білка. При цьому враховують специфічність дії протеолітичних ферментів на поліпептидний ланцюг, беручи до уваги, що трипсин гідролізує пептидні зв'язки, утворені лізином і аргініном, хімотрипсин діє на пептидні зв'язки, утворені ароматичними амінокислотами фенілаланіном, тирозином, триптофаном тощо.

Для вивчення послідовності амінокислотних залишків у молекулах білків Ф. Сенгер розробив стандартний метод визначення N-кінцевих амінокислот. Принципова основа цього методу полягає в тому, що до аміногрупи приєднують хімічну «мітку», яка не відщеплюється під час гідролізу білка. Якщо з гідролізату виділити таку мічену амінокислоту, можна визначити, який амінокислотний залишок розташований на N-кінці поліпептидного ланцюга білка.

Для «мітки» амінокислотних залишків Ф. Сенгер використовував динітрофторбензол (ДНФ). При обробці цим реактивом білка утворюється динітрофеніл-білок (ДНФ-білок). У подальшому ДНФ-білок гідролізується з утворенням залишку молекули білка і ДНФ-амінокислоти: ДНФ-амінокислоту виділяють із суміші продуктів гідролізу та ідентифікують за

допомогою хроматографії. Залишок молекули білка реагує з новими порціями ДНФ, усі наведені вище реакції повторюються і завершуються ідентифікацією другої амінокислоти. Реакції продовжуються доти, доки вся молекула білка не розпадеться на окремі ДНФ-похідні амінокислот.

Внаслідок тривалої роботи Ф. Сенгер у 1958 р. повністю встановив первинну структуру гормону інсуліну. Виявилось, що інсулін має два поліпептидних ланцюги — А і В, сполучені двома дисульфідними містками. Ланцюг А має 21 залишок, ланцюг В — 30 залишків амінокислот. Крім того, в ланцюгу А є дисульфідний зв'язок між залишками молекул цистеїну. Цікаво, що існує видова специфічність будови інсуліну, яка виявляється в амінокислотному складі поліпептидного ланцюга А. Якщо інсулін людини має у 8-, 9- і 10-му положеннях цього ланцюга амінокислотну послідовність залишків амінокислот — Тре — Сер — Іле —, то інсулін бика — Ала — Сер — Вал —, барана — Ала — Глі — Вал —, коня — Тре — Глі — Іле —.

Інсулін свині має амінокислотну послідовність ланцюга А таку саму, як і у людини, але в 30-му положенні ланцюга В він містить аланін замість треоніну. Відмінність первинної структури препаратів інсуліну, отриманих з підшлункових залоз різних тварин, пояснює неоднакову ефективність цих препаратів під час лікування цукрового діабету.

Для відщеплення та ідентифікації N-кінцевої амінокислоти значного поширення набув також метод, запропонований П. Едманом, що ґрунтується на застосуванні фенілізотіоціанату. Досліджуваний пептид обробляють фенілізотіоціанатом, який взаємодіє з вільною α-аміногрупою N-кінцевої амінокислоти. У кислому середовищі відбувається розрив пептидного зв'язку, утвореного N-кінцевою амінокислотою з рештою пептиду. Внаслідок цієї реакції вивільняється фенілтіогідантоїнова похідна N-кінцевої амінокислоти, а досліджуваний пептид вкорочується на один мономер:

Отже, метод П. Едмана дає змогу послідовно вкорочувати пептиди на один амінокислотний залишок без пошкодження решти поліпептидного ланцюга. Фенілтіогідантоїнову похідну N-кінцевої амінокислоти можна ідентифікувати хроматографічним методом, а послідовність операцій — повторити. Метод дає змогу визначати первинну структуру пептидів та білків (після їх часткового гідролізу трипсином) шляхом послідовного відщеплення N-кінцевих амінокислот. Автоматизація цього методу реалізується в спеціальному приладі — «секвенаторі» (англ. "sequence" — послідовність), що дає змогу досить швидко аналізувати пептидні ланцюги.

Сучасним методом, що дає можливість мітити та ідентифікувати N-кінцеві амінокислотні залишки в пептидах та білках, є також застосування дансилхлориду: дансилхлорид здатний реагувати з N-кінцевою амінокислотою, утворюючи дансильну похідну («дансилування пептидів»). Після гідролітичного розщеплення всіх пептидних зв'язків у досліджуваному пептиді дансилована амінокислота може бути виділена та ідентифікована завдяки її специфічній флуоресценції.

Для ідентифікації C-кінцевих амінокислот у білках та пептидах застосовують гідразиноліз за Акаборі. Згідно з цим методом, досліджуваний

поліпептид обробляють гідрازیном NH_2 — NH_2 , що веде до розщеплення пептидних зв'язків і утворення гідразидів усіх амінокислот крім С-кінцевої. С-Кінцева амінокислота лишається у вільному стані і може бути виділена з реакційної суміші та ідентифікована.

Використання вищенаведених методів у поєднанні з різними способами розділення пептидів і амінокислот дало змогу встановити первинну структуру багатьох пептидів та білків, зокрема інсуліну (51 амінокислота), міоглобіну (153 амінокислоти), гемоглобіну (574 амінокислоти), рибонуклеази (124 амінокислоти), аспартат-трансамінази (412 амінокислот) тощо.

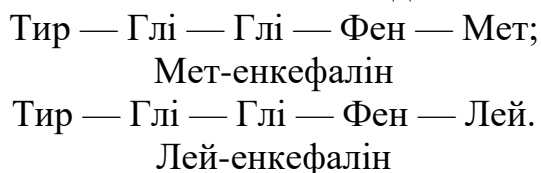
Первинна структура біологічно важливих пептидів. Пептидами є різноманітні фізіологічно активні сполуки, що містяться в біологічних рідинах та клітинах певних організмів, зокрема трипептид глутатіон, деякі гормони та медіатори нервової системи (окситоцин, вазопресин, нейропептиди тощо), регулятори імункомпетентних клітин (інтерлейкіни, тимопоетини).

До пептидів належать також деякі природні токсини, що мають отруйну дію або використовуються як високоефективні лікарські засоби та інструменти фармакологічного аналізу (токсини бджіл, отруйних рослин та комах, нейротоксини з організму рептилій тощо).

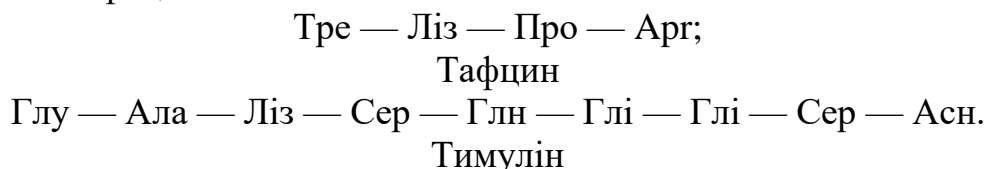
Глутатіон — трипептид, що зустрічається в усіх живих клітинах, плазмі крові, еритроцитах і бере участь в окисно-відновних реакціях.

Утворення глутатіону: окситоцин і вазопресин — циклічні пептиди з дев'яти амінокислотних залишків (нонапептиди), що належать до гормонів задньої частки гіпофіза (нейрогіпофіза).

Енкефаліни (Мет-енкефалін та Лей-енкефалін) — представники так званих опіодних пептидів, тобто сполук, що впливають на морфінні (опіатні) рецептори головного мозку. Ці біологічно активні сполуки пригнічують відчуття болю, викликають стан психічного задоволення, ейфорію:



Тафцин і тимулін — пептиди, що регулюють функцію імунної системи, зокрема Т-лімфоцитів:



Вивчення первинної структури білків та пептидів дає можливість з'ясувати причину спадкових захворювань, що виникають внаслідок генних мутацій і синтезу в організмі аномальних білкових молекул. Наприклад, вивчення первинної структури гемоглобіну людей, хворих на серпоподібно-клітинну анемію, встановило, що при цьому захворюванні гемоглобін еритроцитів відрізняється від нормального лише тим, що в Б-

поліпептид-ному ланцюгу залишок глютамінової кислоти замінений на залишок валіну. Така заміна призводить до втрати біологічних властивостей гемоглобіну. Вивчення гемоглобінопатій — захворювань, які супроводжуються порушенням функцій гемоглобіну — транспортного білка крові, що переносить O_2 і CO_2 , сприяло відкриттю майже 100 патологічних форм гемоглобіну. Кожна з цих форм характеризується заміною одного залишку амінокислоти в А- або S-поліпептидному ланцюгу цього білка. (^Вторинна структура білішу — це просторова конфігурація поліпептидного ланцюга переважно у вигляді α -спіралі, складчастої Р-структури або інших утворів.

На основі рентгеноструктурних досліджень поліпептидів і білків Л. Полінг і Р. Корі встановили, що в складі природних глобулярних білків поліпептидні ланцюги можуть утворювати α -спіраль (рис. 6), в якій на один виток припадає 3,6 залишку амінокислоти. Крок спіралі — відстань між витками — дорівнює 0,54 нм, кут підйому витка — 26° , висота одного залишку амінокислоти становить 0,15 нм. Радикали залишків амінокислот знаходяться на поверхні спіралі. Вирішальну роль у стабілізації α -спіралі відіграють водневі зв'язки. На утворення α -спіралі впливає також розташування бічних радикалів залишків амінокислот.

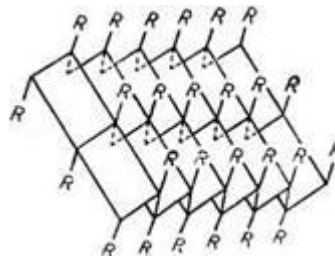


Рис Схема β -структури поліпептидних ланцюгів молекули білка.

Утворенню спіралі сприяють такі амінокислоти, як аланін, валін, лейцин, метіонін, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин, особливо коли вони розміщені підряд у поліпептидному ланцюгу. Навпаки, лізин, аргінін, серин, треонін, аспарагінова і глютамінова кислоти впливають дестабілізуюче на α -спіраль. Зокрема, поліпептиди, до складу яких входить лізин, не утворюють α -спіралі при рН = 7, оскільки радикали цієї амінокислоти в нейтральному середовищі мають позитивний заряд, що не дає їм змоги зближуватись. При цьому сила взаємного відштовхування перевищує сили водневих зв'язків, необхідних для утворення α -спіралі.

Ступінь спіралізації поліпептидних ланцюгів білка залежить від його первинної структури. Так, молекули гемоглобіну і міоглобіну спіралізовані на 75 %, альбуміну сироватки крові — на 50 %, пепсину — на 28 %, а хімотрипсину — лише на 14 %. Неспіралізовані ділянки поліпептидного ланцюга утворені р-структурами або невпорядкованими, аморфними переходами.

Крім α -спіралі поліпептидний ланцюг може формувати іншу впорядковану конформацію, яка дістала назву р-структури, або складчастого шару. р-Структура утворюється поліпептидними ланцюгами, які розміщені

паралельно і сполучаються між собою за рахунок водневих зв'язків між поліпептидними групами, розміщеними поруч.

β -Структура найбільш поширена в білках опорних тканин — колагені (білок сполучної тканини, сухожилля, шкіри), фіброїні (білок шовку), кератині (білок волосся). У багатьох білках одночасно зустрічаються ділянки α -спіралі і β -структури. Наприклад, фермент рибонуклеаза містить у своєму складі 26 % β -спіралізованих ділянок і 35 % — β -структури, лізоцим — відповідно 40 і 12 %, хімотрипсин — 14 і 45 %.

Отже, вторинна структура кожної білкової молекули характеризується певним співвідношенням укладання поліпептидних ланцюгів у просторі у вигляді α -спіра-лей, β -структур та аморфних ділянок.

Третинна структура — це розташування у просторі спіралізованих поліпептидних ланцюгів з утворенням глобулярних або фібрилярних білкових молекул.

Основною діючою силою в утворенні третинної структури є взаємодія радикалів амінокислот з молекулами води. При цьому неполярні гідрофобні радикали амінокислот неначе занурюються в глибину білкової молекули, утворюючи там "сухі" зони, тоді як гідрофільні полярні радикали розміщуються на поверхні молекули. Внаслідок цих процесів утворюється конформація, яка є термодинамічно найбільш вигідною для всієї молекули в цілому. Третинну структуру стабілізують водневі та іонні зв'язки. На формування третинної структури значний вплив мають температура, рН та іонна сила розчину.

Мас - спектрометрія білків

Найпотужнішим засобом аналізу складних білкових сумішей є мас-спектрометрія, принцип якої полягає в розділенні пучка заряджених частинок в електричному та магнітному полі на окремі фракції з однаковим відношенням маси до заряду. Сучасні методи іонізації зразків дозволяють іонізувати й переводити в газову фазу великі органічні сполуки, у тому числі олігопептиди та білки. Наявність 10^{-15} моль/л білка з молекулярною вагою до 200 тис. може бути детектована за допомогою сучасних мас-спектрометрів.

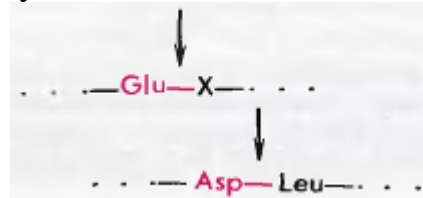
Проте визначення маси білка ще не дозволяє точно ідентифікувати його. З цією метою білок (після його виділення за допомогою двовимірного електрофорезу або рідинної хроматографії) піддають обмеженій протеолітичній деградації. Отримана комбінація олігопептидів, маса яких визначається за допомогою мас-спектрометрії, є своєрідним "відбитком" даного білка. Наступний аналіз геномних послідовностей дозволяє знайти відповідну амінокислотну послідовність білка, що практично позбавляє від необхідності хімічного визначення такої послідовності. З іншого боку, так звана тандемна мас-спектрометрія дозволяє отримати пряму інформацію щодо послідовності олігопептидів завдяки їхній вторинній фрагментації в камері спектрометра та наступного визначення розподілу отриманих фрагментів за масою. Поєднання мас-спектрометра з рідинним хроматографом - протеоліз білкової суміші, розділення олігопептидів

методами рідинної хроматографії, аналіз їх за допомогою мас-спектрометрії та наступний пошук у базах даних з метою їхньої ідентифікації це найперспективніший шлях розвитку кількісної протеоміки.

Наступним кроком у вивченні протеому є з'ясування складної картини білок-білкових взаємодій. Одним із найефективніших методів дослідження таких взаємодій є так званий pull-down: молекула певного білка, що використовується як пастка(bait), адсорбується на колонці (завдяки пришитому до білка специфічному "ярлику" - tag), через колонку пропускається білкова суміш, утворені білкові комплекси аналізуються за допомогою гелі-електрофорезу. Ідентифікацію білків, вилучених із комплексів і розділених шляхом електрофорезу, можна також здійснити за допомогою мас-спектрометрії. Цілком аналогічно до ДНК-мікроареїв, у дослідженнях білок-білкових взаємодій використовують також білкові мікроареї - скельця з пришитими до них білками (понад 5 тис. білків), які дозволяють здійснювати скринінг протеому.

Методи специфічної і неспецифічної фрагментації поліпептидного ланцюга - хімічні та ферментативні.

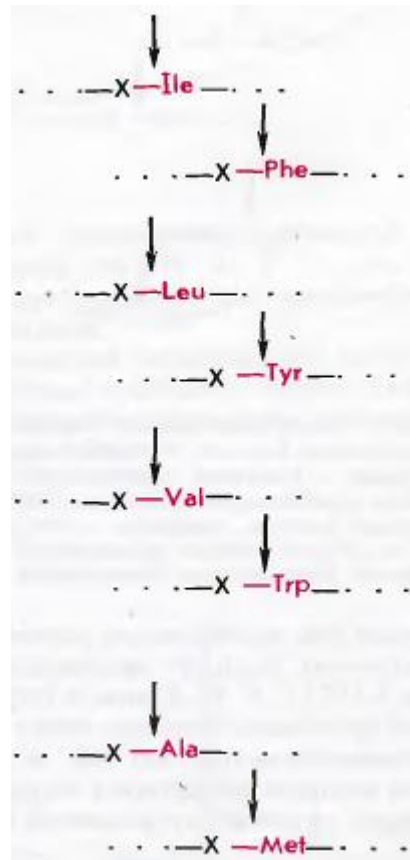
Останнім часом при дослідженні первинної структури білків широке застосування знаходить протеїназа з *Staphylococcus aureus*, виділена в 1972 р. Г.Р. Драпо, яка також належить до класу серинових протеїназ. Фермент має два максимуми протеолітичної активності - при рН 4,0 і 7,8. Протеїназа з *S.aureus* з високим виходом розщеплює пептидні зв'язки, утворені карбоксильною групою глутамінової кислоти.



У ряді випадків гідролізу піддаються також зв'язки, утворені залишком аспарагінової кислоти. Залишки гідрофобних амінокислот (особливо лейцин), які слідують за залишками аспарагінової кислоти, сприяють такому гідролізу. Як і у випадку трипсину і хімотрипсину, зв'язки, в утворенні яких бере участь іміногрупа проліну, не розщеплюються протеїназою з *S.aureus*. Вільна карбоксильна група С-кінцевого амінокислотного залишку глутамінової, аспарагінової кислот і карбоксиметілцістеїна, а також вільна α -аміногрупа значно знижують швидкість гідролізу, коли вони розташовуються поруч з атакуємим ферментом зв'язком або навіть відстоять від нього на один амінокислотний залишок.

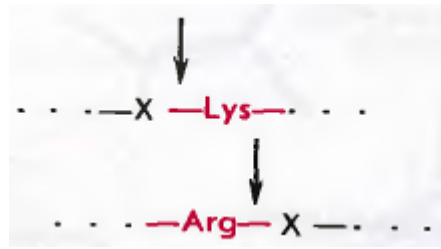
Термолізін, що виділяється з культурального середовища термофільної бактерії *Bacillus thermoproteolyticus*, відноситься до класу нейтральних протеїназ, що містять цинк в якості кофактора. Термолізін надзвичайно термостабільний: протягом години він повністю зберігає свою активність при 60°C (рН 7,0) і втрачає менше 50% активності при 80°C . Фермент стійкий у 8 М розчині сечовини, 20% розчині етанолу або метанолу. Максимальну активність він проявляє в діапазоні рН 7,0 - 9,0. На відміну від більшості

протеолітичних ферментів, специфічність термолізіна визначається природою залишку, якому належить аміногрупа гідролізуемого зв'язку. Термолізін переважно розщеплює пептидні зв'язки, що включають амінокислотні залишки з гідрофобним бічним ланцюгом (Ile, Leu, Val, Phe, туг, Trp).



З меншою швидкістю гідролізуються зв'язки, в утворенні яких беруть участь залишки аланіну і метіоніну. Присутність вільних карбоксильних і α -аміногруп поруч із залишком гідрофобної амінокислоти трохи сповільнює швидкість гідролізу, а залишок проліну, слідуючий за залишком гідрофобної амінокислоти, перешкоджає гідролізу. Трипсин, протеїназа з *S.aureus*, хімотрипсин і термолізін є ферментами, найбільш часто використовуваними в даний час при встановленні первинної структури білків. Перші два з них, що володіють найбільш високою специфічністю, застосовуються головним чином для первинного розщеплення білкової молекули. Термолізін і хімотрипсин зазвичай слугують інструментом для додаткової фрагментації великих пептидів - продуктів хімічного або ферментативного гідролізу білка. В той же час досить часто вони застосовуються і для первинного розщеплення білків невеликої та середньої молекулярної маси з метою отримання фрагментів «що перекриваються».

Для виборчого розщеплення молекули білка за залишками лізину або аргініну в останні роки досить широко використовуються нові ферменти. Серед них так звана лізин-специфічна протеїназа, що виділяється з грибів *Armillaria mellea*, і клостріпаїн з *Clostridium histolyticum*.



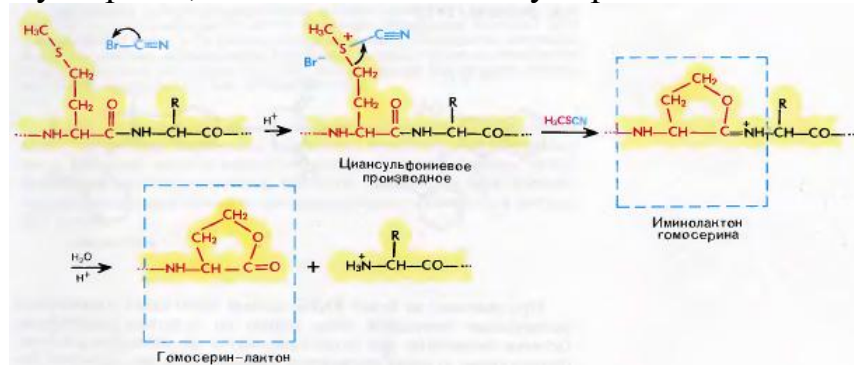
Лізин-специфічна протеїназа в основному каталізує розщеплення пептидних зв'язків, утворених α -аміногрупи лізину, а клостріпаїн переважно гідролізує зв'язки, утворені карбоксильною групою залишків аргініну. У розпорядженні дослідників є також великий набір менш специфічних протеолітичних ферментів (пепсин, еластаза, субтілізін, папаїн, проназа та ін.) Ці ферменти використовуються в основному при додатковій фрагментації пептидів. Їх субстратна специфічність визначається природою амінокислотних залишків, не тільки утворюють гідролізуемий зв'язок, але й більш віддалених по ланцюгу.

Для вичерпного ферментативного гідролізу необхідно, щоб білкова глобула перебувала в денатурованому стані, тобто всі пептидні зв'язки повинні бути максимально доступними для атаки ферментом. У білку ж, що знаходиться в нативній конформації, як правило, гідролізу піддається тільки обмежене число зв'язків, розташованих на поверхні білкової молекули, що призводить до утворення невеликого числа фрагментів. Цей процес відомий під назвою обмеженого протеолізу. Реакції обмеженого протеолізу широко поширені в біологічних системах, і з ними пов'язано здійснення цілого ряду фізіологічних процесів. Зокрема, до них відносяться процеси активації зимогенів протеїназ шлунково-кишкового тракту і сироватки крові, процесинг багатьох гормонів і т.п.

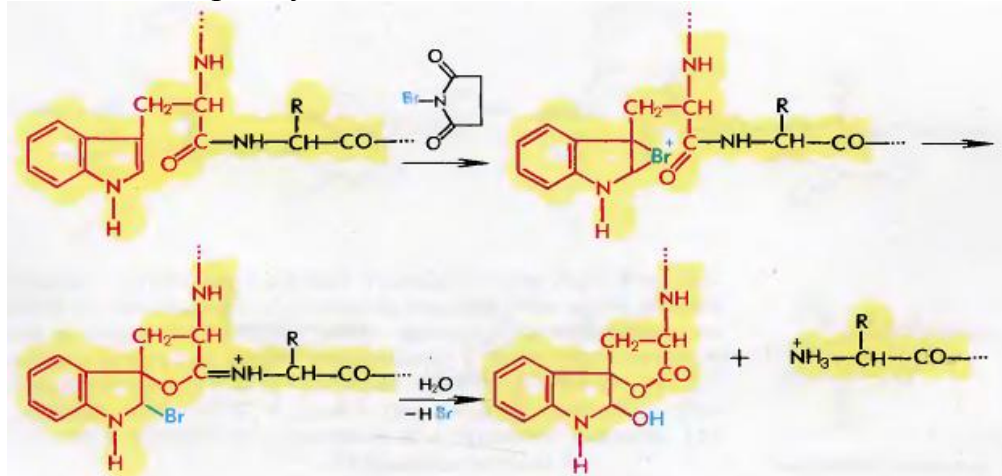
Метод обмеженого протеолізу отримав широке поширення в структурно-функціональних дослідженнях білків великої молекулярної маси. За допомогою обмеженого протеолізу часто вдається розщепити молекулу білка на невелике число фрагментів і проводити подальше дослідження їх будови, зводячи таким чином одну складну задачу до декількох більш простих. Для реалізації такого підходу необхідно вибрати протеолітичний фермент і підібрати умови, за яких поліпептидний ланцюг досліджуваного білка буде гідролізуватися тільки по найбільш доступним пептидним зв'язкам. Важливою умовою обмеженого протеолізу є збереження нативної конформації білка. Тому при виділенні білка слід уникати дії денатуруючих агентів. У багатьох випадках вдається розщепити молекулу білка на невелике число фрагментів, якщо проводити гідроліз в умовах, які знижують активність використовуваного протеолітичного ферменту. Зазвичай такими умовами є невелике фермент-субстратне співвідношення, знижена температура, а також значення рН, не відповідне оптимуму дії ферменту.

Хімічні методи розщеплення. Серед хімічних методів фрагментації білків найбільш специфічним і найчастіше вживаним є розщеплення

бромціаном по залишках метіоніну. Метод розроблений в 1961 р. Е. Гроссом і Б. Віткою і по вибірковості дії не має собі рівних. Реакція з бромціаном проходить з утворенням проміжного ціансульфонієвого похідного метіоніну, спонтанно перетворюється в кислих умовах в імінолактон гомосеріну, який, у свою чергу, швидко гідролізується з розривом Імін зв'язку. Добутий на С-кінці пептидів лактон гомосеріну далі частково гідролізується до гомосеріну (HSer), в результаті чого кожен пептидний фрагмент, за винятком С-кінцевого, існує у двох формах - гомосеріновій і гомосерінлактонової. Реакцію зазвичай проводять при кімнатній температурі протягом 15-30 г в сильнокислому середовищі (найчастіше в 70% мурашиній кислоті) при 100-кратному надлишку бромціану на кожен залишок метіоніну. У цих умовах зв'язки, утворені залишками метіоніну, зазвичай розщеплюються на 90-100%. Виняток становлять зв'язку метіоніну з серином і треоніном, що розщеплюються лише частково. В умовах обробки білка бромціаном може мати місце частковий гідроліз зв'язку Asp-Pro, нестійкого в кислому середовищі.



Велика кількість методів запропонована для розщеплення білка по карбонільній групі залишку триптофану. Одним з використовуваних для цієї мети реагентів є N-бромсукцинімід:



Під впливом електрофільного агента карбонільна група залишку триптофану здатна вступати в 1,5 - взаємодію з подвійним зв'язком індольного кільця, при цьому відбувається окислення індолу до гідроксііндоліна, що супроводжується розривом пептидного ланцюга. Реакція проводиться при 2 - 3-кратному надлишку реагенту (рН 4,0; 20СС; 2 год). Розщеплення тріптофанвміщуючих пептидів N-бромсукцинімідом

відбувається з виходом 50 - 90%, а білків - лише 10 - 60%. N-Бром - сукцінімід здатний розщеплювати також зв'язки, утворені карбонільними групами залишків тирозину і гістидину, проте в більш жорстких умовах (збільшення надлишку реагенту, підвищення температури і зниження рН).

Серед описаних методів хімічного розщеплення найбільше застосування при дослідженні первинної структури білків знаходить деградація бромціаном по залишках метіоніну. Відносно широко використовується розщеплення за залишками триптофану, кислотний гідроліз по зв'язку Asp-Pro і розщеплення за залишками цистеїну і тирозину. При розщепленні білків по залишках метіоніну, триптофану і цистеїну зазвичай утворюються великі пептидні фрагменти, що містять в середньому 40 - 80 амінокислотних залишків, що пов'язано з низьким вмістом цих амінокислот в білках. Більш великі пептиди можуть бути отримані при розщепленні зв'язків Asn-Gly і Asp-Pro.

Методи визначення N-кінцевих амінокислот

Реакція з динітрофторбензолом реакція Сенгера. Динітрофторбензол реагує з аміногрупою амінокислоти і, звільняючи фтористоводневу кислоту, утворює динітрофеніламінокислоту ДНФ-ак:

Ця реакція може відбуватися і за участю амінокислот, що входять в білок, але тільки по їх вільних аміногрупах. Якщо після завершення реакції провести гідроліз білка, то всі амінокислоти вивільняються. Гідроліз не порушує структуру ДНФ-ак. Використовуючи розчинність ДНФ-ак в органічних розчинниках, можна відділити, а отже і ідентифікувати амінокислоти, які, знаходячись у складі білка, мали вільні аміногрупи.

Реакція з 1-диметиламінафтил-5-сульфонілхлоридом дансилом, ДНС-метод. Більш чутливим, ніж динітрофенільний, є дансильний метод визначення N-кінцевих амінокислот. Суть цього методу полягає в тому, що N-кінцева амінокислота пептиду в лужному середовищі взаємодіє з 1-диметиламінафтил-5-сульфонілхлоридом дансилом. При цьому утворюється диметилнафтилсульфоніл-білок ДНС-білок:

Далі здійснюють кислотний гідроліз ДНС білка 20% розчином HCl, що призводить до утворення вільних амінокислот і N-кінцевої амінокислоти у вигляді ДНС-похідного:

Після цього ДНС-амінокислоту, завдяки інтенсивній флуоресценції дансильних груп, виявляють і кількісно визначають.

Реакція з фенілізотіоціанатом реакція Едмана. Фенілізотіоціанат в слаболужному середовищі реагує з аміногрупою:

У слабокислому середовищі продукт цієї реакції циклізується. Якщо піддати амінокислоту, яка входить до складу білка, дії фенілізотіоціаната, то її можна відділити й ідентифікувати у формі фенілтіогідантоїнового ФТГ-ак похідного: Цей метод дозволяє ідентифікувати кінцеві амінокислоти білка, аміногрупи яких вільні. Утворення ФТГ-ак не вимагає гідролізу решти частини білка.

Кольорові реакції. Нінгідрин здійснює декарбоксілювання α-амінокислот з утворенням CO₂, NH₃ і альдегіду, який містить на один атом

вуглецю менше, ніж вихідна амінокислота. Відновлений нінгідрин реагує з вільним аміаком, утворюючи блакитний комплекс з максимумом поглинання при $\lambda_{\max}=570$ нм:

Утворення цієї забарвленої сполуки використовується в кількісному тесті на α -амінокислоти, за допомогою якого є можливість виявити їх, якщо навіть вони знаходяться у концентрації до 1мкг. Нінгідрин реагує не тільки з амінокислотами, але і з другими амінами; при цьому також утворюється блакитне забарвлення, але не виділяється вуглекислий газ. Таким чином, саме виділення CO_2 є індикатором участі в реакції α -амінокислоти. Аміак і пептиди також вступають в реакцію з нінгідрином, але менш активно ніж α -амінокислоти. Продукт реакції між проліном гідроксипроліном і нінгідрином має жовте забарвлення.

Флуорескамін є ще більш чутливим реагентом, який дозволяє виявляти амінокислоти в кількості порядку нанограм. Як і нінгідрин, він утворює комплекс не тільки з амінокислотами, але і іншими амінами.

Утворення пептидних зв'язків. Найбільш важливою реакцією, в якій приймають участь амінокислоти, є утворення пептидних зв'язків. При цьому виділяється одна молекула води:

Однак, реакція здійснюється не так, як показано на малюнку, оскільки рівновага сильно зміщена в сторону гідролізу пептичного зв'язку. Для утворення пептидного зв'язку між двома амінокислотами карбоксильна група повинна бути попередньо активована. Хімічний синтез здійснюється шляхом попереднього утворення хлорангідриду. Біологічна активація включає взаємодію з АТФ.

Методи визначення С-кінцевих амінокислот і послідовностей. Для вивчення С-кінцевих амінокислот часто використовують метод гідразинолізу, розроблений японським ученим Ф. Акабборі, який ґрунтується на гідролізі поліпептидного ланцюга білкової молекули гідрaziном. При цьому С-кінцева амінокислота відщеплюється у вільному стані, а всі інші амінокислоти — у вигляді сполук з гідрaziном:

Гідролізат потім обробляють 2,4-динітрофторбензолом, у результаті чого гідразиди перетворюються на ДНФ-гідразиди, а С-кінцева амінокислота — на ДНФ-амінокислоту див. нижче.

Після цього ДНФ-гідразиди екстракцією оцтово-етиловим ефіром відділяють від ДНФ-амінокислот.

Для визначення С-кінцевої амінокислоти застосовують також ферментативний метод, використовуючи панкреатичні карбоксипептидази.

Так, карбоксипептидаза А відщеплює від білка або пептиду лише той амінокислотний залишок, який має вільну карбоксильну групу.

Інформацію про послідовність С-кінцевих амінокислот у ланцюгу можна отримати під час визначення швидкості відщеплення кожного наступного С-кінцевого залишку амінокислоти. Необхідно відзначити, що карбоксипептидаза А малоактивна до залишків С-кінцевих амінокислот лізину, аргініну і проліну. Тому залишки цих амінокислот досліджують з використанням карбоксипептидази В.

Властивості аміногрупи

Як і всі сполуки, що містять аміногрупу, амінокислоти взаємодіють з кислотами, утворюючи солі.

Відділення аміногрупи від амінокислоти може бути здійснено багатьма способами. Найважливіший з них — окислювальне дезамінування:

Аміногрупа вступає в реакцію приєднання з формаліном:

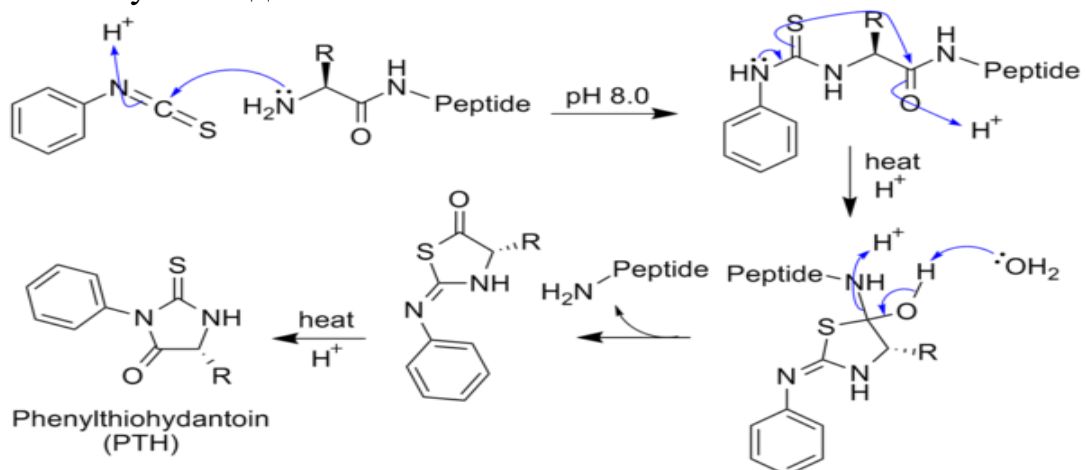
Інтерес до цієї реакції обумовлений тим, що вона призводить до блокування амінної функції амінокислоти. Сполука, що утворюється, володіє тільки кислотними властивостями і її кількісне визначення можна здійснити простою нейтралізацією лугом формалінове титрування по Серенсену.

Автоматичне секвенування білків по Едману

Метод Едмана (англ. Edman degradation) - один з ранніх методів визначення первинної послідовності (секвенування) білків за допомогою пептидів. Розроблено в 1950-1956 роках шведським біохіміком Пером Віктором Едманом. Суть методу полягає в обробці досліджуваного білка певним набором реагентів, що призводить до відщеплення однієї амінокислоти з N-кінця послідовності. Циклічне повторення реакції і аналіз продуктів реакцій дають інформацію про послідовність амінокислот у білка. Метод Едмана був широко поширений у другій половині ХХ століття. В даний час практично не застосовується через багато властивих йому недоліків (некількісне протікання реакції, множинні побічні процеси).

Механізм дії

ФІТЦ (фенілізотіоціанат) - реагент який використовується для визначення N-кінцевої амінокислоти в пептиді. Він здатний реагувати з альфа-амінокислотами та альфа-карбоксыльною групою вільних амінокислот. У результаті взаємодії з N-кінцевою амінокислотою поліпептиду утворюється фенілтіогідантіонове похідне, в якому дестабілізується зв'язок між альфа-карбоксыльною групою N-кінцевої амінокислоти в пептиді. Цей зв'язок вибірково гідролізується без пошкодження інших пептидних зв'язків. Після реакції виділяють комплекс ФІТЦ з N-кінцевою амінокислотою, і ідентифікують його хроматографічним методом. Далі цей процес повторюють з укороченим пептидом. Таким чином отримують послідовність амінокислот у пептиді.



Недоліки. Оскільки метод Едмана відбувається від N-кінця білка, він не

буде працювати, якщо N-кінцева амінокислота була хімічно модифікована або якщо вона прихована в тілі білка. Він також вимагає використання або припущень або окремого порядку визначення позиції дисульфідних містків, а також концентрації 1 пікомоля пептиду або вище для помітного результату.

Пептидне картування за допомогою мас-спектрометрії (сліди пептидної маси) використовується в характеристиці білка для провадження унікальних «слідів» з окремих білків а також для порівняння з теоретично отриманою амінокислотою послідовністю гена. Цей аналіз використовується для ідентифікації цілей на всіх етапах лікарських препаратів або для демонстрації порівнянності та узгодженості між партіями для випуску в процесі виробництва. Він також може бути використаний для характеристики референсних зразків.

Пептидне картування є дуже потужним інструментом для характеризування білка. Пептидне картування також може бути використане для:

- *Визначення дисульфідних містків
- *Підтвердження N-кінцевої а також C-кінцевої послідовностей (зазвичай разом з MS / MS секвенуванням)
- *Скринінг та ідентифікація ділянок пост-трансляційної модифікації (наприклад, глікозилування, фосфорилування)
- *Керування вибіркою сигналів для подальшого MS / MS або газової фази аналізу послідовності.

MS Пептидне картування було розроблене на SGS M-Scan на початку 1980-х років використанням бомбардування швидкими атомами MS (FAB-MS). Білкова молекула фрагментована з використанням специфічних ферментативних або хімічних методів та одержаної пептидної суміш яка аналізується за допомогою MS, зараз його замінюють сучасні методи електророзпилення (ES-MS) або MALDI TOF-MS.

Протеоміка. Визначення, історія, методи і завдання.

Назва цієї науки, яка народилося в 1995 році, походить від злиття двох термінів: "PROTEins" і "genOMe" (однак є погляди, що зародження протеоміки відбулося значно раніше, ще у 80-х роках).

Протеоміка — наука, основним предметом вивчення якої є білки і їх взаємодії в живих організмах, у тому числі — у людському. Вчені в області протеоміки досліджують «виробництво» протеїнів (білків), їх декомпозицію і заміну білків усередині тіла. Вони також вивчають як протеїни модифікуються після їхньої генерації в організмі. Будь-яка добротна наука починається із змістовних аналітичних технологій, і протеоміка не є виключенням. У цій області, яка швидко розвивається, основним викликом є розуміння механізму взаємодії близько 300 000 протеїнів у людському організмі.

Яка потенційна користь встановлення цих механізмів? Швидка розробка лікарських засобів і новітніх методів лікування хвороб, з якими медицина боролася століттями. В даний час велика частина робіт у протеоміці виконується з використанням 2-D PAGE (двовимірного гелелектрофорезу на поліакриламіді). Цей метод як і раніше буде відігравати велику роль у протеомних дослідженнях. Однак обсяг робіт, які необхідно виконати, вимагає використання методів і приладів з більшою продуктивністю, інформативністю і чутливістю. Більшість учених світу, що працюють в області протеоміки сьогодні, впевнені, що методи, які комбінують високоефективну рідинну хроматографію і тандемну маспектрометрію, можуть забезпечити швидкий прорив у протеоміці.

Протеоміка займається інвентаризацією білків у клітці. Центр постгеномних досліджень перенесений в область інвентаризації і з'ясування протеомної карти людини. Задача протеоміки досить складна. Якщо геномна карта однакова для всіх кліток людини, то кожна клітка, тканина, біологічна рідина повинна мати власну протеомну карту. В основі протеоміки лежать три методичних підходи:

1 - двомірний електрофорез, який використовується для поділу білків і їх первинної ідентифікації;

2 - мас-спектрометрія, основний метод протеомного аналізу, який використовується для ідентифікації білків і їх секвенування;

3 - біоінформатика, необхідна для обробки отриманої інформації.

Задачами протеоміки є аналіз білка, виявлення його структури, послідовності, співвіднесення з банком даних, одержання рентгенівських знімків.

Медичні аспекти протеоміки вже зараз вийшли на перше місце. За допомогою методів, використовуваних при проведенні протеомних досліджень, можна виявити диспропорцію білків у патологічно змінених тканинах.

Біоінформатика - це шлях від гена до ліків через структуру макромолекули. Якщо є геном, його можна розмітити і знайти границі гена не за допомогою клонування окремих генів, а за допомогою визначених комп'ютерних програм. Якщо є послідовність білка, можна перейти до просторових структур і функцій. На підставі просторових моделей можна сконструювати визначені ліки.

Протеїни відомі близько 200 років. На початку XIX століття хіміки ття хіміки вибрали ім'я протеїни для цих речовин від грецького слова *proteios*, що означає «утримуючий перше місце». В українській мові ці речовини називаються білками, що, ймовірно, зв'язано з кольором одного з найпоширеніших білків — альбуміну, коли він звертається під дією високої температури. Важливість протеоміки можна уявити собі по одному прикладу її раннього розвитку. На початку XX століття дослідники знайшли альтернативні форми інсуліну і, таким чином, врятували і продовжили мільйони життів людей, що страждають діабетом.

Часто можна просліджувати зв'язок між змінами протеїнів і їхньою взаємодією і хворобливими станами. Таким чином, протеоміка може значно прискорювати розробку лікарських засобів і набагато швидше вкласти в руки пацієнта нові ефективні ліки. Сьогодні більше 95 відсотків усіх фармакологічних засобів на ринку націлені на вплив саме на протеїни.

Протеоміка може допомогти ідентифікувати й оцінити нові цільові протеїни набагато ефективніше і із систематизованим підходом, що, у свою чергу, може прискорити розробку нових діагностик і терапевтичних засобів.

Незважаючи на особливу важливість дослідження цих речовин, велика частина робіт у біології в другій половині ХХ століття була зосереджена на дослідженнях генів і ДНК (дезоксирибонуклеїнової кислоти). Ці роботи базувалися на основному відкритті, здійсненому Джеймсом Уотсоном, Френсісом Лементом і Морісом Уілкінзом, які одержали в 1962 році Нобелівську премію за пояснення подвійної спіральної структури ДНК.

Генні дослідження і протеоміка комплементарні в тому змісті, що гени, складені з ДНК, визначають виробництво специфічних протеїнів. Однак, як писав у 1998 році дослідник Norman G. Anderson «ДНК — це, насправді, не нижня точка: будь-який сучасний підручник біології пояснює, що протеїни визначають активне життя клітки, у той час як нуклеїнові кислоти являють собою тільки план цієї активності». Іншими словами, біологія в дійсності реалізується на рівні протеїнів.

Найбільш значимий і розрекламований прорив останніх років це картирування геному людини, у результаті чого створюється атлас, який включає від 30 000 до 40 000 генів, що визначають складові людського тіла. У порівнянні з цим виклик, що стоїть перед протеомікою, значно серйозніший. За деякими оцінками, число протеїнів у людському тілі близько 300 000 або більше — у 10 разів більше, ніж кількість генів у людському тілі. Ці протеїни, звичайно, можуть взаємодіяти один з одним, і число таких взаємодій не піддається підрахунку.

У той час як визначення послідовностей геному людини є основою повномасштабного дослідження протеїнів, необхідно пам'ятати, що дослідження протеїнів були предметом інтересу вчених протягом тривалого часу. Дослідники, які працюють в протеоміці, просто глузують із тверджень про те, що ця область науки тільки зараз з'явилася. Насправді, на початку 1980 років Anderson очолював спеціальну групу індексування протеїнів людини, яка намагалася проводити систематичні дослідження протеому людини і розвивати аналітичні методи, необхідні для цих досліджень. Ці спроби наштовхнулися на відсутність як політичної підтримки і фінансування, так і обмежень з боку технології. Сьогодні дослідження протеїнів виявилися в центрі уваги по двох причинах. По-перше, геном розшифрований і прискорення протеомних досліджень є наступним логічним кроком. По-друге, технологія проведення протеомних досліджень швидко розвивається.

Значення більшості генів у життєдіяльності клітини ще не з'ясовано.

Провідні вчені світу сподіваються визначити точну функціональну

роль генів шляхом розшифрування протеому — повного набору білків, що кодуються геномом. Через це й виникла нова наука протеоміка, яка вивчає структуру та функцію протеому. Майже одночасно з оприлюдненням попередніх результатів дослідження структури генетичного коду людини було засновано Організацію з вивчення людського протеому (Human Proteome Organization (HUPO)), завдання якої — координування широкомасштабних досліджень у галузі вивчення білків і забезпечення їх наукової та фінансової підтримки. Фахівці вважають, що порушення біосинтезу та процесингу білків лежать в основі молекулярних механізмів розвитку захворювань. Як відзначив один із засновників HUPO, білки відіграють ключову роль в життєдіяльності клітини та розвитку захворювання, тому без конкретних зусиль фахівців у галузі протеоміки цінні досягнення геноміки реалізувати буде неможливо. Нові розробки у галузі протеоміки, поза всяким сумнівом, дадуть поштовх бурхливому розвитку біотехнологічних методів у сучасній фармакології та фармацевтичній індустрії і відкриють широкі можливості ефективного лікування більшості захворювань.

ПРОГНОЗИ НА МАЙБУТНЄ

На Всесвітній конференції «Геном людини», яка відбулася у 2010 р. у Ванкувері (Канада), обговорювалися питання розвитку геноміки людини на найближчі 40 років. Ф. Коллінз, керівник програми «Геном людини», висловив припущення, що до 2010 р. будуть розроблені методи генної терапії близько 25 спадкових захворювань та профілактичні заходи щодо зниження ризику виникнення найпоширеніших хвороб. За прогнозами експертів, до 2020 р. завдяки досягненням геноміки та протеоміки вдасться розробити й освоїти виробництво нових протидіабетичних і антигіпертензивних препаратів, а також інших принципово нових лікарських засобів, що дозволить проводити прицільну терапію онкологічних захворювань, спрямовану на модифікацію властивостей неопластичних клітин. Фармакогеноміка і фармакопротеоміка поступово стануть загальноприйнятим підходом у створенні багатьох лікарських препаратів. Передбачається, що до 2030 р. буде каталогізовано гени, які беруть участь у процесах старіння, а також проведено експериментальні дослідження зі збільшення тривалості життя людини.

До 2040 р. всі заходи з охорони здоров'я в США будуть базуватися на досягненнях геноміки та протеоміки. Хвороби виявлятимуть шляхом молекулярного моніторингу на ранніх стадіях, а для лікування більшості захворювань застосовуватимуть генну/протеомну терапію. Традиційні лікарські препарати будуть заміщені генними та білковими субстанціями, які продукує організм у відповідь на введення ліків. На думку фахівців, проведені заходи дозволять збільшити середню тривалість життя в США до 90 років.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке гени?
2. Що таке компліментарність?
3. Надайте характеристику компліментарності нуклеїнових кислот.
4. Що таке матрична РНК?
5. Що таке транскрипція?
6. Що таке сплайсинг?
7. Що таке трансляція?
8. Що таке деградація?
9. Що таке 5' Кеп?
10. Що таке кодуєчі області?
11. Що таке моно- і поліцистронна мРНК?
12. Що таке не трансльовані області?
13. Що таке 3' поліаденіловий хвіст?
14. Відкриття генетичного коду.
15. Вкажіть властивості генетичного коду.
16. Вкажіть варіанти генетичного коду.
17. Види РНК, їх характеристика, та структура.
18. Що таке білки?
19. Вкажіть структуру білків.
20. Що таке транслокація, її види, характеристика?
21. Що таке молекулярна машина?
22. Робочий цикл рибосом.
23. Методи визначення структури білків.
24. Що таке протеоміка, визначення, історія розвитку, методи?

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Столяр О.Б. Молекулярна біологія : підручник. Київ : Центр учбової літератури, 2020. 224 с.
2. Кучменко О. Б., Марченкова А. І. Молекулярна біологія клітини: навчальний посібник. Ніжин: Видавництво НДУ ім. М. Гоголя, 2021. 135 с.
3. Іншина Н. М. Основи молекулярної біології : навчальний посібник. Суми : Видавництво СДУ, 2019. 121 с.
4. Столяр О.Б. Молекулярна біологія / О. Б. Столяр. Тернопіль : Підручники і посібники, 2014. 224 с.
5. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник Київ : Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2008. 384 с.
6. Боечко Ф.Ф., Боечко Л.О., Шмиголь І.В. Основи молекулярної біології : курс лекцій. Черкаси: Видавничий відділ ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. 255 с.
7. Новосад Н.В. Молекулярна біологія : навчальний посібник. Запоріжжя : Видавництво ЗНУ, 2012. 120 с.
8. James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick. *Molecular Biology of the Gene* : 7th edition. Pearson, 2013. 912 p.
9. David P. Clark, Nanette J. Pazdernik, Michelle R. McGehee. *Molecular Biology* : Third Edition. Academic Cell, 2019. 1006 p.
10. Lizabeth A. Allison. *Fundamental Molecular Biology*. BLACKWELL PUBLISHING, 2007. 725 p.

Навчальне видання

Крамаренко Олександр Сергійович

Молекулярна біологія

Курс лекцій

Формат 60/84/16

Папір друк. 65 г/м². Друк офсетний. Ум. друк. арк. 10,7.

Тираж 15 прим. Зам. № _____

Видавничий відділ

Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9.

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.