

**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

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для виконання лабораторних робіт для здобувачів другого (магістерського)
рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності G21
«Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти



Миколаїв
2025

УДК 577.2
М75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від «26» листопада 2025 р., протокол № 3.

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.
Вступ	4
I ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ	
<i>Історія становлення молекулярної біології як науки</i>	5
Л.Р. № 1. Вступ. Техніка безпеки при роботі в лабораторії	5
II ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ	
<i>Молекулярно-біологічні основи клітини</i>	11
Л.Р. № 2. Молекулярна біологія клітини	11
Л.Р. № 3. Білки, вуглеводи, жири (ліпіди)	18
Л.Р. № 4. Білки, вуглеводи, жири (ліпіди) продовження	29
III ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ	
<i>Молекулярні основи спадковості</i>	33
Л.Р. № 5. Нуклеїнові кислоти	33
Л.Р. № 6. Структура геному вірусів і фагів	53
Л.Р. № 7. Структура геному прокаріот	60
Л.Р. № 8. Структура геному еукаріот	71
IV ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ	
<i>Молекулярні основи самовідтворення генетичного матеріалу</i>	78
Л.Р. № 9. Реплікація ДНК	78
Л.Р. № 10. Реплікація ДНК	85
Л.Р. № 11. Репарація ДНК	98
Л.Р. № 12. Генетична рекомбінація	104
V ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ	
<i>Реалізація спадкової інформації</i>	107
Л.Р. № 13. Транскрипція	107
Л.Р. № 14. Трансляція	114
Л.Р. № 15. Мутації	122
Список використаної літератури	127

ВСТУП

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

Метою даної розробки є навчити здобувачів вищої освіти орієнтуватися в сучасних концепціях молекулярної біології, дати цілісне уявлення про молекулярні механізми збереження і реалізації генетичної інформації, структуру і функції нуклеїнових кислот і білків, методи аналізу біологічних послідовностей та просторових структур біологічних макромолекул, сформувати у студентів цілісний і системний погляд на організацію біологічних структур на молекулярному рівні та механізми реалізації генетичної інформації.

У результаті освоєння розробки здобувач вищої освіти повинен

- знати: основні концепції структурної організації білків і нуклеїнових кислот, механізми відтворення і реалізації генетичної інформації, теоретичні основи експериментальних методів дослідження просторової структури біологічних макромолекул.

- вміти: проводити аналіз білків і нуклеїнових кислот, працювати з банками даних біологічних послідовностей в мережі Інтернет, вміти цілісно і системно мислити.

І ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ

«ІСТОРІЯ СТАНОВЛЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ЯК НАУКИ»

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1

ВСТУП. ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ В ЛАБОРАТОРІЇ

Працюючи в лабораторії, необхідно дотримуватися запобіжних заходів, дотримуючись наступних правил:

1. До лабораторних і практичних занять студенти допускаються після проведення з ними інструктажу, ознайомлення з правилами поведінки в аудиторіях та з порядком виконання роботи.

2. В лабораторію забороняється заходити у верхньому одязі, **без халата**, заносити одяг, класти його під столи, на обладнання, вішати на стіни.

3. Студенти повинні знати й дотримуватися правил особистої гігієни, підтримувати в чистоті робоче місце, обладнання, чистоту рук, обличчя та взуття.

4. Заходити в аудиторію слід з дозволу викладача або лаборанта.

5. Виконувати завдання занять можна лише з дозволу викладача.

6. В аудиторіях забороняється їсти, пити воду, палити, користуватися вогнем, бігати та кричати.

7. Небезпечними та шкідливими, що можуть спричинити травмування студентів під час робіт є електричний струм, що використовується у приладах та освітлювальній мережі; хімічні реактиви, інструменти, лабораторний посуд, які використовуються для проведення занять.

8. Студенти повинні знати і дотримуватися основних правил пожежної безпеки.

9. Староста групи повинен стежити за дотриманням студентами правил безпеки та дисципліни.

10. При виявленні зіпсованого обладнання, приладів, інструментів, посуду, при порушенні правил безпеки іншими студентами аварій, травмуванні потрібно негайно повідомити викладача.

11. Співробітники кафедри забезпечують безпечні умови роботи для решти студентів, подають першу допомогу потерпілим, а при необхідності звертаються в медпункт або викликають швидку медичну допомогу.

12. Перед початком виконання роботи студент повинен знати :

- правила користування приладами, обладнанням, інструментами;
- порядок виконання роботи;
- правила безпечного користування лабораторним посудом, хімічними реактивами;
- правила надання першої медичної допомоги.

Вимоги безпеки праці перед початком занять

Перед початком занять необхідно:

- одягнути халат і зайняти робоче місце;
- оглянути робоче місце, столи, стільці, обладнання, посуд, інструменти та прилади, які будуть використовуватися під час роботи, переконавшись в їхній цілісності та справності;
- оглянути електричні розетки, вимикачі, електропроводку, переконавшись в їхній цілісності та справності перед вмиканням;

- ознайомитися з правилами проведення роботи.

Поводження з реактивами.

1. Всі концентровані кислоти і луги повинні знаходитися у витяжній шафі.
2. Всі досліди з отруйними і з речовинами, які неприємно пахнуть проводити у витяжній шафі. Наливати або насипати реактиви слід тільки над столом. Не слід залишати відкритими банки з реактивами. Пролиті або розсипані реактиви потрібно негайно видалити зі столу, витерши стіл ганчіркою і обмивши водою.
3. Пролиті концентровані кислоти слід засипати піском, потім зібрати пісок лопаткою. Облите місце необхідно залити розчином соди і витерти ганчіркою. При роботі з органічними розчинниками (спирти, ефіри, ацетон, бензин та ін) не можна визначати речовину за запахом, так як може статися отруєння їх парами.
4. Наповнення піпеток розчинами органічних розчинників, кислот, лугів проводять тільки за допомогою груші. Уважно стежити за тим, щоб реактиви (особливо кислоти і луги) не потрапляли на обличчя, руки та одяг. Не ходити по лабораторії з ємностями з концентрованими кислотами в руках, а наливати їх тільки в певному, відведеному для цього місця.
5. Не забруднювати реактиви під час роботи (не плутати пробки від склянок, які містять різні реактиви; надлишок взятого реактиву не виливати назад у склянку; користуючись піпеткою, набирати кожний реактив тільки призначеною для цього піпеткою, ні в якому разі не плутати їх). У разі потрапляння на шкіру концентрованої кислоти облите місце потрібно промити великою кількістю води, а потім розбавленим розчином соди. При попаданні розчинів лугів на шкіру уражене місце потрібно обмити спочатку розбавленою кислотою, а потім водою.

Поводження з нагрівальними приладами.

1. Перед тим як запалити спиртівку, слід переконатися в тому, що поблизу немає горючих рідин (спирт, ефір та ін.).
2. Запалювати спиртівку можна тільки сірником. У пробірці можна нагрівати тільки невелику кількість розчину, рідина повинна займати не більше $\frac{1}{3}$ об'єму пробірки.
3. Пробірку при нагріванні потрібно направити в бік від себе і людей, які знаходяться поруч. Не можна нахилитися над спиртівкою. Спочатку пробірку з розчином потрібно прогріти всю, а потім нагрівати в потрібному місці, не виймаючи з полум'я спиртівки. Не можна нагрівати пробірку довго в одному місці, так як рідина швидко закипить і виплеснеться з пробірки. Нагрівати пробірку потрібно нижче рівня рідини в ній.
4. При нагріванні рідини тримати пробірку отвором у бік від себе і тих, хто знаходиться поруч, не торкатися пробіркою палаючого фітля, завжди бути обережним при нагріванні, не допускати виплескування рідини (час від часу відводити пробірку від полум'я, не нагрівати її в вертикальному положенні), не наближати обличчя до посудини, в якій нагрівається рідина.

5. Після нагрівання слід відразу загасити спиртівку, накривши полум'я ковпачком.

6. Робота з водяною банею здійснюється тільки під тягою. При необережній роботі можливі опіки нагрітим скляним посудом. При опіках на обпечене місце треба покласти ватку, змочену розчином марганцевокислого калію. Закінчивши роботу, привести робоче місце в порядок.

Вимоги безпеки праці після закінчення занять

Після закінчення заняття необхідно дотримуватись таких вимог:

- навести порядок на робочому місці, поставити столи та стільці на місце;
- вимкнути електричні прилади та обладнання, закрити крани у водопроводах;
- скласти обладнання, прилади та інструменти у відповідне місце;
- зняти спецодяг, вимити з милом руки;
- вимкнути в аудиторії освітлення.

Вимоги інструкції є обов'язковими для виконання студентами, які проходять лабораторні і практичні заняття в аудиторіях.

Історія розвитку молекулярної біології, як науки.

Молекулярна біологія виникла у другій половині ХХ ст. Назву цієї науки найчастіше пов'язують з ім'ям У. Естбюрі, який у 1939 р. назвав себе «молекулярним біологом». Через два роки він же отримав першу рентгенограму ДНК і тим самим поклав початок вивченню тонкої структури «самої головної молекули», вперше виявленої Ф. Мішером ще в 1869 р. Перша офіційна згадка у 1938 р. про молекулярну біологію, вірогідно, належить У. Уіверу, який керував відділом природничих наук Рокфелерівського фонду.

Таким чином, було постульовано виникнення нового напрямку сучасної біології, яке інтегрувало зусилля біологів, хіміків і фізиків в області вивчення об'єктів живої природи.

Центром молекулярно-біологічних досліджень стали роботи в галузі вивчення матеріальних основ спадковості, природи генів і механізмів передачі спадкових ознак з покоління в покоління. Саме під впливом генетиків нової формації (Т. Моргана, Н. К. Кольцова, Н. В.Тімофєєва-Ресовського та ін) фізики-теоретики і експериментатори, які емігрували в кінці 30-х років з Європи в США, організували там так звану «фагову групу» на чолі з М. Дельбрюком, яка почала дослідження в області молекулярної будови та мутагенезу вірусів і бактеріофагів.

Пізніше ці роботи були істотно розвинені в нашій країні Б. Ф. Поглазовим, Н.А Кисельовим та іншими вченими. Ще раніше В.А. Енгельгардт спільно з М. М. Любімовою обґрунтували молекулярні механізми м'язового скорочення, а А. Н. Білозерський вперше виділив ДНК з рослин. Згодом іменами цих чудових вчених були названі найбільші науково-дослідні центри: Інститут молекулярної біології АН СРСР ім. В. А. Енгельгардта та Інститут фізико-хімічної біології ім. А. Н. Білозерського.

Саме зазначені роботи, а також біофізичні дослідження структури ДНК, виконані в Англії методом рентгеноструктурного аналізу Розаліндою Франклін

і Морісом Вілкінсом, впритул підвели вихованця «фагової групи» Джеймса Уотсона і англійського фізика Френсіса Кріка до розкриття молекулярної природи генів і механізму їх відтворення (реплікації) в складі ДНК. Створення моделі подвійної спіралі ДНК і відкриття принципу комплементарності стали найважливішою подією сучасної біології, виявило фундаментальні принципи функціонування живих систем і визначив подальші напрями досліджень сучасної біології. Сучасне природознавство зобов'язане саме молекулярній біології тим, що в період з середини 50-х до середини 70-х років ХХ ст. з неймовірною швидкістю були розкриті природа й основні шляхи передачі та реалізації генетичної інформації.

Основні відкриття молекулярної біології:

1869 р.	Ф. Мішер вперше виділив ДНК із лейкоцитів і молоків лосося.
1935 р.	А.Н. Білозерський виділив ДНК з рослин.
1939 р.	В.А. Енгельгардт відкрив АТФазну активність міозину.
1940 р.	У. Естбюрі отримав першу рентгенограму ДНК.
1944 р.	О. Т. Евері встановив, що ДНК (а не білок, як вважали раніше) є носієм генетичної інформації.
1951 р.	Л. Полінг і Р. Корі обґрунтували існування основних типів укладки амінокислотних залишків у поліпептидних ланцюгах білків («альфа-спіраль і складчастий β-шар»).
1953 р.	Дж. Уотсон і Ф. Крік створили модель подвійної спіралі ДНК на основі рентгенограм, отриманих Франклін і М. Вілкінсом.
1953 р.	Ф. Сангер розшифрував первинну структуру інсуліну бичка.
1956 р.	А. Корнберг відкрив ДНК-полімеразу.
1957 р.	А. Н. Білозерський і А. С. Спірін передбачили існування мРНК.
1960 р.	Дж. Кедрю вперше описав тривимірну структуру міоглобіну кашалота, а М. Перутц - структуру гемоглобіну.
1960 р.	Одночасно в кількох лабораторіях був відкритий фермент транскрипції - РНК-полімераза.
1961 р.	Ф. Жакоб і Дж. Моно розробили модель оперону.
1965 – 1967 рр.	Р. Холлі з'ясував первинну структуру аланінової тРНК, а А. А. Баєв - валінової тРНК.
1966 р.	М. Ніренберг, С. Очоа та Х.-Г. Корана розшифрували генетичний код.
1967 р.	М. Геллерт відкрив ДНК-лігазу - фермент, здатний з'єднувати фрагменти ДНК.
1970 р.	Г. Темін і Д. Балтімор відкрили зворотню транскриптазу (РНК-залежну ДНК-полімеразу) в онкогенних вірусах.
1972 р.	П. Боєр, С. Коен та П. Берг розробили технологію клонування ДНК, заклали основи генетичної інженерії.
1972 р.	Х.-Г. Корана здійснив хімічний синтез гену аланінової тРНК.
1975-1977 рр.	Ф.Сангер, а також А. Максам і У. Гілберт розробили методи швидкого визначення первинної структури ДНК.
1976 р.	Ф. Сангер розшифрував нуклеотидну послідовність ДНК фага φX174.
1976 р.	У. Гілберт відкрив мозаїчну будову генів еукаріот.
1976 р.	С. Кім, А. Річ і А. Клуг визначили третинну структуру тРНК.

Таким чином, в середині 60-х років 20 століття затвердився основний постулат молекулярної біології, який формулює магістральний шлях реалізації генетичної інформації в клітині: ДНК → РНК → Білок.

В кінці XX століття розширюються і стають все більш цілеспрямованими в науково-практичному відношенні **завдання** молекулярної біології, серед яких:

1. Розшифровка структури геномів;
2. Створення банків генів;
3. Геномна дактилоскопія;
4. Вивчення молекулярних основ еволюції, диференціювання, біорізноманіття, розвитку і старіння, канцерогенезу, імунітету тощо;
5. Створення методів діагностики та лікування генетичних хвороб, вірусних захворювань;
6. Створення нових біотехнологій виробництва харчових продуктів і різноманітних біологічно активних речовин (гормонів, антигормонів, релізінг-факторів, енергоносіїв та ін).

Початок нового тисячоліття ознаменувався видатною подією - розшифровкою нуклеотидної послідовності генома людини, з якою пов'язані надії на вирішення багатьох проблем людства (корекція спадкових захворювань, продовження життя і т.д.). Таким чином, по праву вважається, що XXI століття має стати століттям молекулярної біології і нових біотехнологій, покликаних звільнити людство від тяжкого тягара хвороб, пороків і закласти основи його майбутнього процвітання.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (7) термінів: геноміка, протеоміка, геномна дактилоскопія, канцерогенез, фінгерпрінт, клон клітин, гетерокаріони.
2. За наданою нижче формою запишіть методи молекулярної біології:

№ з/п	Назва методу	Суть методу
1	2	3
1.	Мікроскопія	
2.	Рентгеноструктурний аналіз	
3.	Метод радіоізотопів	
4.	Ультрацентрифугування	
5.	Хроматографія	
6.	Електрофорез	
7.	Ізоелектрофокусування	
8.	Двомірний електрофорез	
9.	Культура клітин	
10.	Моноклоальні антитіла	
11.	Каталітично активні білки	
12.	Полімеразна ланцюгова реакція	

3. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:
1. Вкажіть основні правила техніки безпеки при роботі в лабораторії.
 2. Перерахуйте основні вимоги безпеки праці перед початком занять.
 3. Вкажіть основні правила поводження з реактивами у лабораторії.
 4. Вкажіть основні правила поводження з нагрівальними приладами в лабораторії.
 5. Перерахуйте вимоги безпеки праці після закінчення занять.
 6. Розкажіть історію розвитку молекулярної біології – як науки.
 7. Розкажіть основні відкриття молекулярної біології.
 8. Який постулат молекулярної біології затвердився в кінці 60-х років 20 століття? Про що він свідчить?
 9. Перерахуйте основні завдання молекулярної біології?
 10. Яке значення молекулярної біології для людства в цілому?
 11. Яка суть методу мікроскопії?
 12. Яка суть методу рентгеноструктурного аналізу?
 13. Яка суть методу радіоактивних ізотопів?
 14. Яка суть методу ультрацентрифугування?
 15. Яка суть методу хроматографії?
 16. Яка суть методу електрофорезу?
 17. Яка суть методу ізоелектрофокусування?
 18. Яка суть методу двомірного електрофорезу?
 19. Яка суть методу культури клітин?
 20. Яка суть методу моноклоальних антитіл?
 21. Яка суть методу каталітично активних білків?
 22. Яка суть методу полімеразної ланцюгової реакції?
4. **Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:**
1. «Геномна дактилоскопія: історія, методи, перспективи»;
 2. «Генно-модифіковані організми (ГМО) та біобезпека»;
 3. «Біотехнологія отримання молочних продуктів».

II ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ

«МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ КЛІТИНИ»

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2

Молекулярна біологія клітини

Клітина – елементарна жива система, здатна до самовідновлення, саморегуляції і самовідтворення – основна структурна і функціональна одиниця живих організмів.

Сучасна клітинна теорія базується на 6 постулатах:

1. Клітина – елементарна одиниця будови всіх живих організмів;
2. Клітина – єдина система, що включає ряд закономірно пов'язаних один з одним елементів – органел або органоїдів, які являють собою певні цілісні утворення, клітинні структури, забезпечуючи виконання специфічних функцій в процесі життєдіяльності клітини;
3. Клітини різних організмів однакові (гомологічні) за своєю будовою, хімічному складу, основним проявом життєдіяльності та обміну речовин;
4. Розмноження клітин здійснюється тільки шляхом поділу – клітина від клітини;
5. Багатоклітинний організм являє собою нову систему, яка складається із багатьох клітин, які об'єднані та інтегровані в системи тканин та органів, які пов'язані один з одним за допомогою хімічних, гуморальних і нервових факторів;
6. Клітини багатоклітинних організмів *тотіпотентні*, тобто володіють генетичними можливостями всіх клітин даного організму, містять однакову генетичну інформацію, але відрізняються одна від одної різною *експресією* (роботою) різних генів, що призводить до їх морфологічного і функціонального різноманіття – до *диференціювання*.

Серед живих організмів зустрічаються 2 типи організації клітин. До простого типу будови можна віднести клітини бактерій і синьозелених водоростей, до більш високоорганізованого – клітини всіх решта живих істот, починаючи із нищих рослин і закінчуючи людиною. Залежно від присутності чи відсутності ядра в клітині всі клітини діляться на прокаріотичні (без'ядерні, або доядерні) і еукаріотичні (власне ядерні) тому, що у останніх обов'язковою структурою є клітинне ядро, відокремлене від цитоплазми ядерною оболонкою.

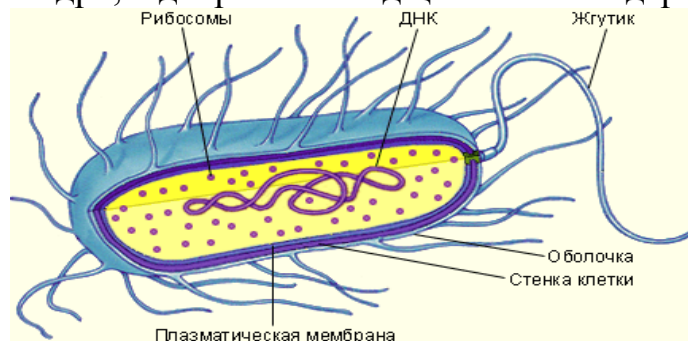


Рис. 1. Будова клітини прокаріотів

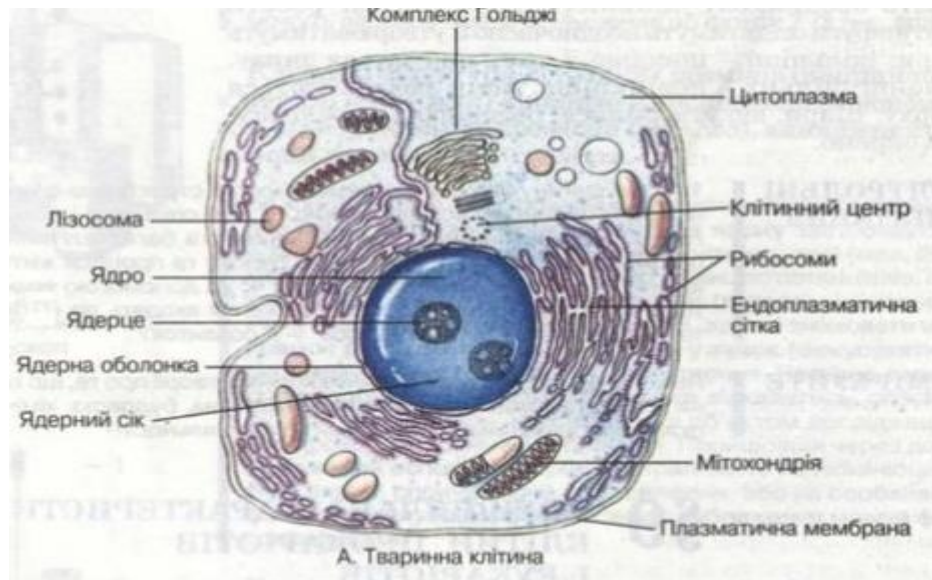


Рис. 2. Будова клітини еукаріотів

Основними складовими частинами клітини є оболонка, ядро і цитоплазма.

Оболонка клітини складається з плазматичної мембрани, надмембранного комплексу (глікокалікс чи клітинна стінка), та субмембранний опорно-скорочувальний апарат. Ці компоненти забезпечують наступні функції: 1. Бар'єрна, 2. Транспортна, 3. Рецепторна.

Ядро – найбільш видима у мікроскопі органела. Воно забезпечує важливі метаболічні та генетичні функції, тому що саме в ньому знаходяться хромосоми з молекулами ДНК. Ядро відокремлене від клітини *ядерною оболонкою*, яка складається із зовнішньої і внутрішньої ядерної мембрани.

Простір між двома ядерними мембранами називається *перинуклеарним*.

Зовнішня ядерна мембрана містить *рибосоми*. Внутрішня ядерна мембрана має спеціальні білки – *ламіни*, які закріплюють (фіксують) ядерні структури.

В ядрі знаходиться практично вся *ДНК* клітини. Ця ДНК є носієм генетичної інформації, місцем її реплікації та експресії.

В інтерфазі (фази між діленням клітини) більша частина ДНК в ядрі присутня у вигляді *гетерохроматину*, тобто щільно запакованої ДНК, асоційованої з РНК та білками.

Менш щільно запакована ДНК називається *еухроматином*, - місце активної транскрипції ДНК в РНК.

Ядро містить *ядерце*, а іноді декілька. Обмін макромолекул: білків, РНК, між ядром і цитоплазмою здійснюється через *ядерні пори* (діаметром 7 нм), які регулюють транспорт через ядерні мембрани.

Цитоплазма – внутрішній вміст клітини. Вона пронизана густою сіткою білкових волокон, що складають *цитоскелет*, він містить органоїди і мембранну вакуолярну систему. Взаємодію між ними забезпечується за рахунок напіврідкої складової цитоплазми – *цитозоль* – колоїдну систему, яка

містить 75-80% води, 10-12% білків і амінокислот, 4-6% вуглеводів, 2-3% ліпідів та 1% інших речовин. Цитозоль займає 50% загального об'єму клітини.

Основними органοїдами (органелами) цитоплазми є мітохондрії та рибосоми.

Мітохондрії – найбільші органели, містять ферменти та інші білково-мембранні структури для окислення органічних сполук та синтезу аденозинтрифосфатаз (АТФ) – головного джерела енергії внутрішньоклітинних біохімічних перетворень. Більше всього міститься мітохондрій в клітинах тканин, які постійно використовують багато енергії для виконання своїх функцій – м'язи, печінка, нирки.

Мітохондрія сформована 2 мембранами – зовнішньої, внутрішньої, які розділені *міжмембранним* простором.

Внутрішня мембрана формує складки-гребні (кристи), які ввігнуті у внутрішню частину *матриксу* – центральну частину мітохондрії.

Мітохондрія містить власні ДНК та рибосоми, але більшість білків вона отримує із цитоплазми клітин.

Зовнішня мембрана мітохондрії містить багато білків-поринів, які пропускають у міжмембранний простір іони та молекули-метаболіти.

Нові мітохондрії утворюються тільки шляхом поділу.

Рибосома 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. Рибосома є органелою, на якій відбувається трансляція генетичної інформації закодованої в мРНК. Ця інформація втілюється в синтезований тут-же поліпептидний ланцюг. Рибосома несе двояку функцію: є структурною платформою для процесу декодування генетичної інформації з РНК, та володіє каталітичним центром відповідальним за формування пептидного зв'язку, так званим «пептидил-трансферазним центром».

Комплекс Гольджі (також зветься *Апарат Гольджі*, тільки Гольджі та інші) - одномембранна органела, що є переважно в еукаріотів.

Основна функція комплексу Гольджі - це гліколізація та фосфоризація речовин з ендоплазматичного ретикулуму. Це система паралельно розташованих та сплюснених цистерн і трубочок, до яких прикріплюються мембранні міхурці, що транспортують речовини від ендоплазматичної сітки.

Таким чином, апарат Гольджі сортує утворені в клітині молекули, упаковує їх у пухирці, оточені мембраною.

Лізосома - одномембранна органела, що містить гідролітичні ферменти, і виконує функцію внутрішньоклітинного розщеплення макромолекул.

Лізосоми виконують у клітині такі функції: розщеплення внутрішньо- та позаклітинних відходів, та старих органел, знищення патогенних мікроорганізмів, забезпечення клітини поживними речовинами. Лізосоми містять більше 40 різних кислих гідролаз, зокрема протеази, нуклеази, ліпази, фосфоліпази, фосфатази, сульфатази. Оптимум рН для цих ферментів лежить у межах 4,5 - 5, саме така кислотність підтримується всередині лізосом. Окрім того, протеази проявляють максимальну активність тільки після обмеженого протеолізу. Біологічне значення таких особливостей полягає у захисті цитоплазми клітини від розщеплення ферментами лізосом. Навіть якщо мембрана, що відмежовує цей компартмент, з якихось причин втратить цілісність гідролази не будуть активними у цитозолі із рН близько 7,2.

Центросома або клітинний центр — головний центр організації мікротрубочок (ЦОМТ) і регулятор ходу клітинного циклу в клітинах еукаріотів. Хоча центросома відіграє найважливішу роль в клітинному поділі, нещодавно було показано, що вона не є необхідною. У переважній більшості випадків в клітині в нормі присутня тільки одна центросома. Аномальне збільшення числа центросом характерне для багатьох ракових клітин. У багатьох живих організмів (тварин і ряду протей) центросома містить пару центріолей, циліндричних структур, розташованих під прямим кутом одна до одної. Кожна центріоль утворена дев'ятьма триплетами мікротрубочок, розташованих по колу, а також ряду структур, утворених центрином, ценексином і тектином. Крім участі в поділі ядра, центросома грає важливу роль у формуванні еукаріотичних джгутиків і війок.

Ендоплазматичний ретикулум (ЕПР, від лат. reticulum — «сіточка») або *ендоплазматична сітка* — внутрішньоклітинна органела еукаріотичних клітин, що представляє собою розгалужену систему з оточених мембраною сплюснених порожнин, бульбашок і каналців.

Ендоплазматичний ретикулум не є стабільною структурою і схильний до частих змін. Виділяють два типи ЕПР:

1. Шорсткий (гранулярний) ендоплазматичний ретикулум,
2. Гладкий (агранулярний) ендоплазматичний ретикулум.

На поверхні шорсткого ендоплазматичного ретикулума знаходиться велика кількість рибосом, які відсутні на поверхні гладкого ЕПР.

Гладкий ендоплазматичний ретикулум бере участь в багатьох процесах метаболізму. Ферменти гладкого ендоплазматичного ретикулума беруть участь в синтезі ліпідів і фосфоліпідів, жирних кислот і стероїдів. Також агранулярний ендоплазматичний ретикулум грає важливу роль у вуглеводному обміні, знезараженні клітини і запасанні кальцію. Зокрема, у зв'язку з цим в клітках надниркових залоз і печінки переважає гладкий ендоплазматичний ретикулум.

Шорсткий ендоплазматичний ретикулум має дві функції: синтез білків і виробництво мембран.

За участю ендоплазматичного ретикулума відбувається трансляція і транспорт мембранних білків, що сектеруються, синтез і транспорт ліпідів і стероїдів. Для ЕПС характерне також накопичення продуктів синтезу. Ендоплазматичний ретикулум бере участь і в створенні нової ядерної оболонки

(наприклад після мітозу). Ендоплазматичний ретикулум містить внутріклітинний запас кальцію, який є медіатором багатьох реакцій відповіді клітини, зокрема скорочення м'язових клітин. У клітинах м'язових волокон розташована особлива форма ендоплазматичного ретикулума — саркоплазматичний ретикулум.

Цитоскелет - це клітинний каркас або скелет, що знаходиться в цитоплазмі живої клітини. Він присутній у всіх клітинах, як еукаріот (тварин, рослин, грибів та найпростіших), так і прокаріот. Це динамічна структура, що постійно змінюється, до функцій якої входить підтримка і адаптація форми клітини до зовнішніх дій, екзо- і ендоцитоз, забезпечення руху клітини як цілого, активний внутрішньоклітинний транспорт і клітинне ділення. Цитоскелет утворений білками. У цитоскелеті виділяють декілька основних систем, званих або за основними структурними елементами, помітними при електронно-мікроскопічних дослідженнях (мікрофіламенти, проміжні філаменти, мікротрубочки), або за основними білками, що входять в їхній склад (актин-міозинова система, кератинова система, тубулін-дінеїнова система).

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (15) термінів: метаболізм, ферменти, ген, клітинна молекулярна біологія, компартменталізація, піноцитоз, фагоцитоз, реплікація, експресія генів, гетерохроматин, еухроматин, транскрипція, інтрон, екзон, кеп-білки.
2. Заповніть таблицю за наступною формою:

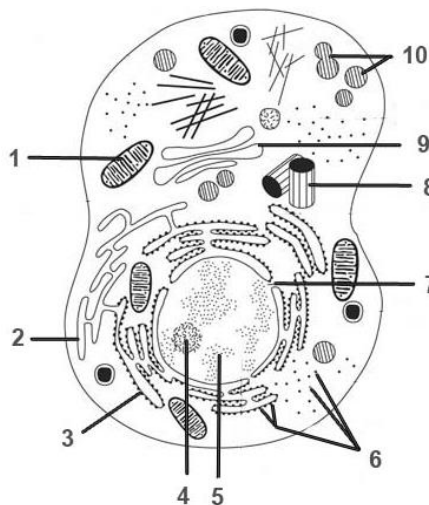
Властивості прокаріотів та еукаріотів

Ознаки	Прокаріоти	Еукаріоти
		рослини тварини
Розміри клітин		
Форма		
Генетичний матеріал		
Де відбувається синтез білку?		
Клітинні стінки		
Джгутики		
Органели		
Ендоплазматична сітка		
Клітинний центр		
Мітохондрії		
Комплекс Гольджі		
Лізосоми		
Пластиди		
Вакуолі		
Поділ клітин		
Дихання		
Фотосинтез		
Фіксація азоту		

3. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке клітина?
2. Сформулюйте постулати клітинної теорії.
3. Що таке тотіпотентність клітини?
4. Що таке диференціювання клітин?
5. Охарактеризуйте будову прокаріотичної клітини, порівняйте її з еукаріотичною.
6. Чим клітини еукаріот відрізняються від клітин прокаріот?
7. Що таке цитозоль клітин? У чому полягає різниця цитозоля і цитоплазми?
8. Перерахуйте і охарактеризуйте основні складові частини клітини.
9. Перерахуйте і охарактеризуйте основні органоїди цитоплазми.
10. Охарактеризуйте мембранну систему мітохондрій.
11. Що таке кристи мітохондрій?
12. Що таке мітохондріальний матрикс?
13. Які органели клітини мають власні ДНК і рибосоми?
14. Що таке рибосоми?
15. Вкажіть функції рибосом.
16. Що таке комплекс Гольджі? Його функції?
17. Що таке лізосома, її функції?
18. Які ферменти входять до складу лізосом? Який їх оптимум рН?
19. Яке біологічне значення оптимального рН ферментів лізосом?
20. Що таке центросома, її будова та функції?
21. Що таке ендоплазматичний ретикулум, його функція?
22. Види ендоплазматичного ретикулума, їх функції.
23. Що таке цитоскелет? Його функції?
24. Перерахуйте структурні елементи цитоскелету? З яких білків складаються ці структурні елементи?

4. Тестове завдання: підкресліть правильні відповіді на нищепоставленні завдання.



Всі питання тесту відносяться до рисунку, який ви бачите вище.

1. Це клітина:
рослин;
тварин;
грибів;
прокаріот.
2. Під номером 1 на рисунці:
пластида;
плазмід;
лізосома;
мітохондрія.
3. Під номером 2:
плазматична мембрана;
шорсткий ендоплазматичний ретикулум;
гладкий ендоплазматичний ретикулум;
мікротрубочки.
4. Під номером 3:
плазматична мембрана;
гладкий ендоплазматичний ретикулум;
шорсткий ендоплазматичний ретикулум;
лізосоми.
5. Під номером 4:
ядерце;
ядерна пора;
рибосома;
нуклеосома.
6. Під номером 5:
гранули запасних речовин;
інтерфазні хромосоми в ядрі;
метафазні хромосоми в ядрі;
нуклеосома.
7. Багаточисельні органели під номером 6 на
рисунці позначені крапками –
мітохондрії;
лізосоми;
білки-ферменти;
рибосоми.
8. Під номером 7:
ядерна пора;
іонний канал в плазматичній мембрані;
хромосома;
нуклеосома.
9. Під номером 8:
джгутики в розрізі;
джгутики, що розвиваються;
центриолі;
мікротрубочки.
10. Під номером 9:
мітотичний апарат;
апарат Гольджі;
ендоплазматична сітка;
мікрофіламенти.
11. Під номером 10:
мезосоми;
рибосоми;
аутозоми;
лізосоми
12. Елементи будови клітини, яка зображена на
рисунку можна побачити:
у світловий мікроскоп при великому збільшенні;
у світловий мікроскоп з використанням
радіоактивної мітки;
тільки в клітині, що ділиться;
тільки в електронний мікроскоп.

5. Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Генна інженерія бактерій»;
2. «Отримання інсуліну людини з використанням генетично модифікованих бактерій»;
3. «Отримання гормону росту людини з використанням генетично модифікованих бактерій».

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3

Білки, вуглеводи, жири (ліпіди)

Білки – біополімери (поліпептиди), які складаються із амінокислотних залишків, з'єднаних пептидними зв'язками.

Білки – найпоширеніший в живій природі клас біополімерів, що складає більшу частину сухої речовини тварин (50-80%) і володіють різноманітною структурою та функціями. Білки утворюються з одного або декількох поліпептидних ланцюгів, які складаються з амінокислот, зв'язаних між собою пептидними зв'язками. Молекулярна маса білків коливається в межах 6000-1000000 і більше.

В біологічних системах білки забезпечують дуже багато специфічних властивостей. Найбільш важливими є функціональні білки - ферменти (прості, алостеричні, регуляційні). Найважливіші структурні білки - колаген, кератин, глікопротеїни, еластин, скоротливі білки - актин і міозин. Деякі білки виконують транспортну функцію: або в розчинному стані (сироватковий альбумін, β -поліпротеїд, гемоглобін), або в мембранах (різні переносники), або є гормонами (інсулін, адренокортикотропний гормон, гормон росту). Білки-токсини - це бутулін, отрути змій. Запасні білки - це феротин, імуноглобуліни - антигени й антитіла.

Білки мають різні функції:

1. Структурна функція. Білки входять до складу всіх клітинних органел: *мембранних* – плазматична мембрана, ядерна оболонка, ендоплазматичний ретикулум, комплекс Гольджі, лізосоми, мітохондрії, і *немембранних* – хромосоми, рибосоми, клітинний центр, мікрофіламенти.

2. Каталітична функція. У вигляді каталізаторів беруть участь у метаболічних процесах у клітині і в організмі в цілому.

3. Захисна функція. Білки забезпечують імунологічний захист від чужерідних сполук і патогенних мікроорганізмів (білки-імуноглобуліни).

4. Регуляторна функція. На клітинному рівні: білки-репресори, білки-активатори транскрипції. На рівні організму: деякі гормони-білки. Наприклад, гормон підшлункової залози інсулін регулює рівень цукру в крові. При недостатній секреції інсуліна розвивається тяжке захворювання – цукровий діабет.

5. Трансформація енергії. Білки сітківки ока *родопсин* і *ретинен* трансформують світлову енергію в електричну. *Актино-міозинові комплекси* в м'язах перетворюють енергію хімічних зв'язків у механічну.

6. Транспортна функція. Білки (гемоглобін еритроцитів, міоглобін) забезпечують постачання організму киснем і різноманітними поживними речовинами.

7. Енергетична функція. 10 із 20 амінокислот, що входять до складу білків в організмі тварин та людини «згорають» з виділенням енергії.

8. Трофічна функція. а) постачання до організму незамінних амінокислот. У тварин та людини 10 із 20 амінокислот – *аргінін, валін, гістидин, ізолейцин,*

лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін – не можуть бути синтезованими в організмі, а повинні надходити поряд з кормами.

б) запасні білки для розвитку зародку і згодовування новонароджених. Наприклад, *казеїн* – білок молока, *овальбумін* – білок яйця, *гліадин* – білок зерна пшениці.

9. Буферна функція. Білки забезпечують підтримання рН крові, клітин тощо, забезпечуючи компартментацію.

Білки – нерегулярні полімери, мономерами яких є амінокислоти. Кожна амінокислота має аміно-групу, зв'язана з атомом вуглецю, з цим же атомом зв'язана карбоксильна група, водень та амінокислотний залишок.

Всього жива клітина використовує 20 стандартних амінокислот.

Таблиця 1

Назва і позначення амінокислот

№	Амінокислоти	Амінокислоти	Позначення			Amino acids
			<i>cyr</i>	<i>symb</i>	<i>lat</i>	
1	Аланин	Аланин	Ала	A	Ala	Alanine
2	Аргинин	Аргінін	Арг	R	Arg	Arginine
3	Аспарагин	Аспарагін	Асп	N	Asn	Asparagine
4	Аспарагинова кислота	Аспарагінова кислота	Асп	D	Asp	Aspartate
5	Валин	Валін	Вал	V	Val	Valine
6	Гістидин	Гістидин	Гіс	H	His	Histidine
7	Гліцин	Гліцин	Глі	G	Gly	Glycine
8	Глутамин	Глутамін	Глн	Q	Gln	Glutamine
9	Глутаминова кислота	Глутамінова кислота	Глу	E	Glu	Glutamate
10	Ізолейцин	Ізолейцин	Иле	I	Ile	Isoleucine
11	Лейцин	Лейцин	Лей	L	Leu	Leucine
12	Лізин	Лізин	Лиз	K	Lys	Lysine
13	Метионин	Метионін	Мет	M	Met	Methionine
14	Пролин	Пролін	Про	P	Pro	Proline
15	Серин	Серин	Сер	S	Ser	Serine
16	Тирозин	Тирозин	Тир	Y	Tyr	Tyrosine
17	Треонин	Треонін	Тре	T	Thr	Threonine
18	Триптофан	Триптофан	Трп	W	Trp	Tryptophan
19	Фенілаланін	Фенілаланін	Фен	F	Phe	Phenylalanine
20	Цистеїн	Цистеїн	Цис	C	Cys	Cysteine

Амінокислоти прийнято класифікувати наступним чином:

- неполярні (гліцин, пролін, аланін, валін, лейцин, ізолейцин);
- ароматичні (фенілаланін, тирозин, триптофан);
- полярні незаряджені (серин, треонін, цистеїн, метионін, аспарагін, глутамін);
- заряджені (негативно: аспарагінова кислота і глутамінова кислота, позитивно: лізин, аргінін);
- гістидин за рахунок своєї специфічності може відноситись до полярних незаряджених, так і до позитивно заряджених амінокислот.

Таким чином, всі білки побудовані в основному з двадцяти різних амінокислот, які розташовані у визначеній послідовності в пептидному ланцюзі. Пептидні ланцюги визначаються орієнтацією в просторі, це є вторинна структура білка. Оскільки у двовуглецевого атома є вільне повертання плоского пептидного ланцюга, можливе утворення двох типів вторинної структури.

Первинна структура - це спіраль (права або ліва), яку можна представити як пептидний ланцюг, закручений навколо гіпотетичного циліндра. Ця структура стабілізується водневими зв'язками, які виникають між амінокислотами пептидного ланцюга.

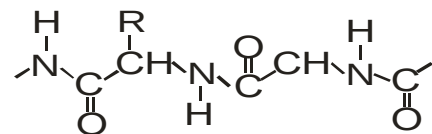
Вторинна структура - вторинна структура складчастого шару, у якому поліпептидні ланцюги лежать антипаралельно (або паралельно) один від іншого й водневі зв'язки з'єднують два різні пептидні ланцюги. Частина молекули, яка не включена в α спіраль і β - шари, утворює хаотичний клубок.

Третинна структура білків - це трьохмірна структура поліпептидного ланцюга, яка визначається первинною і вторинною структурою. Третинна структура утворюється спонтанно й залежить від розмірів, форми й полярності амінокислотних залишків. Ці залишки взаємодіють один з одним за рахунок гідрофобних взаємодій, іонних та водневих зв'язків.

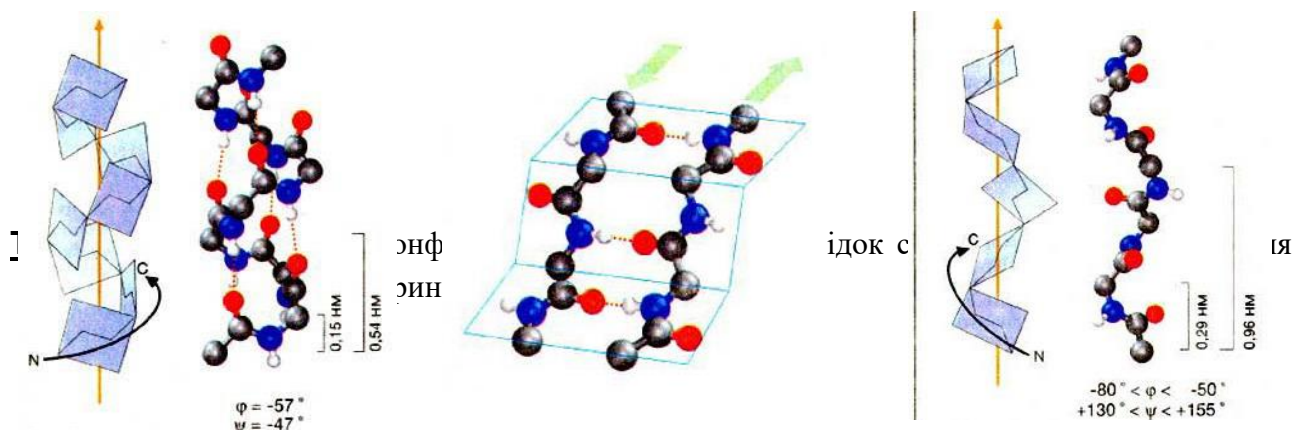
Четвертинна структура білків – називається агрегація двох чи більшої кількості поліпептидних ланцюгів, що мають третинну структуру. Таку структуру мають біля половини білків, у тому числі гемоглобін, імуноглобулін, інсулін, ДНК і РНК-полімерази, більшість ферментів

Пептидні ланцюги глобулярних білків компактно звернуті. Всі, або майже всі полярні групи глобулярних білків розташовані на поверхні молекули й гідратовані, гідрофобні залишки знаходяться всередині молекули (рис. 1).

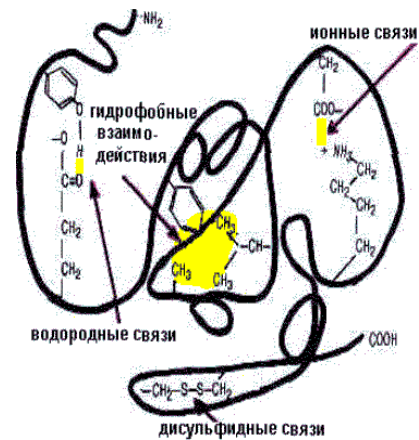
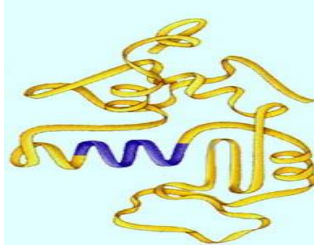
Первинна структура – хімічний склад, послідовність амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі.



Вторинна структура – просторова конфігурація самого поліпептидного ланцюгу.



Третинна структура – конфігурація, що виникає внаслідок складання або закручування вторинних структур у глобулу.



Четвертинна структура – об'єднання деяких білкових глобул, утворення агрегату (властива не всім білкам).

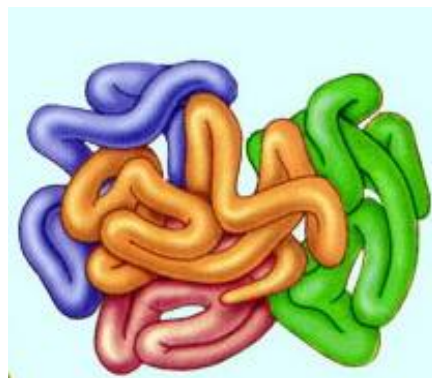


Рис. 3. Структура білків

Білки поділяються на дві великі групи: прості і складні.

Прості білки гідролізуються (кислотами або лугами) до амінокислот, але при цьому не утворюють інших органічних або неорганічних сполук. В середньому вони складаються з 50% С, 7% Н, 23% О, 16% N, 3% S.

Складні білки (нуклеопротейіди, ліпопротейіди, глікопротейіди, фосфопротейіди, гемопротейіди, флавопротейіди, металопротейіди) при гідролізі дають не тільки амінокислоти, але й інші органічні і неорганічні сполуки, в деяких випадках ці сполуки називають простетичною групою.

Глюкопротейіди у своєму складі мають нейтральні цукри й галактозу, манозу і фруктозу, а також аміноцукри: N - ацетилглюкозамін, N -ацетилгалактозамін, столові і уранові кислоти.

Ліпопротейіди містять триацилгліцерини, холестерин, фосфоліпіди.

До складу металоферментів входять іони металу у вигляді комплексної сполуки – гему.

Кожна білкова молекула має ряд іонізуючих груп (кінцеві - NH_2 і COOH групи та деякі бічні групи пептидного ланцюга), які роблять свій внесок у кислотно-основні характеристики розчинів білків. Для кожного білка існує характерне значення рН, при якому він є електронейтральним, тобто молекула білка має нульовий електричний заряд. Це є ізоелектрична точка білка. При значеннях рН вище за ізоелектричну точку білок має негативний заряд, а при більш низькому значенні - позитивний.

В ізоелектричному стані білки найменш розчинні. Білки й амінокислоти в розчинах проявляють властивості амфолітів.

ПЕПТИДНИЙ ЗВ'ЯЗОК

Амінокислоти в пептидному ланцюзі зв'язані між собою через карбоксильну групу однієї і аміногрупи іншої амінокислоти. Такий зв'язок має деякі риси подвійного зв'язку: біля нього не має вільного обертання і він коротший інших CN -зв'язків.

Всі чотири атоми пептидного зв'язку (C, H, N, O) і два α -вуглецевих атоми лежать в одній площині. Кисень карбоксильної групи і водень NH -групи частіше всього знаходяться в транс-положенні. Група, зв'язана, з α -вуглецевим атомом володіє вільним обертанням.

Форма пептидної молекули визначається кутами між площинами, в яких лежать атоми пептидного зв'язку, розділеними між собою $-\text{CH}-\text{R}$ групами, що і призводить до виникнення визначених вторинних структур.

Зв'язки, що стабілізують білкову молекулу і визначають її структуру

1. Іонний зв'язок відноситься до електролітичної взаємодії.
2. Водневий зв'язок виникає між білковими ланцюгами амінокислот нейтральними зв'язками.
3. Дисульфідний зв'язок утворюється між білковими молекулами амінокислот і пептидними зв'язками.
4. Гідрофобний зв'язок відображує взаємодію неполярних груп.

Гідратні групи - молекули води, що оточують білкову молекулу і при визначених умовах здатні утворювати структури, подібні структурі льоду. Цей водяний шар сприяє структурній стабілізації білкової молекули.

Глікопротеїни – склад і структура

Глікопротеїни - це складні білки, до складу яких окрім білка входить вуглеводна частина.

Вуглеводневий компонент може бути представлений нейтральними цукрами (галактоза, маноза, фруктоза, глюкоза, ксилулоза), аміноцукрами (аміногалактоза, аміноглюкоза), і N-ацетилнейраміновою кислотою.

Компоненти глікопротеїнів зв'язані ковалентним зв'язком. Відповідно до характеру цього зв'язку виділяють наступні групи глікопротеїнів:

1. Глікопротеїни крові (кислі *a* - глікопротеїни). В цьому випадку пептидний ланцюг пов'язаний з п'ятьма розгалуженими олігосахаридними ланцюгами, які приєднуються до білку через N-ацетилглюкозамін (зв'язок виникає між амідною групою аспарагіну і C₁ групою N- ацетилглюкозаміну).

2. Глюкопротеїди слинних залоз і групові речовини крові (наприклад лецитин підщелепної залози вівці). Пептидний ланцюг має 700-800 дисахаридів, приєднаним O- глюкозидним зв'язком.

3. Протеоглікани (наприклад протеохондроїсульфат). Серин білкової частини зв'язаний O-глюкозидним зв'язком через трисахарид - ксилулоза-галактоза-галактоза - декількома десятками ланцюгів глікозаміногліканів хондроїтин-сульфату.

4. Колаген. В пептидному ланцюзі колаген оксилізін зв'язаний O-глюкозидним зв'язком або з молекулою галактози, або з дисахаридом галактоза - глюкоза. Залежно від типу колагену число молекул цукру може змінюватись від одного до декількох десятків на ланцюзі. Молекули глікопротеїнів мають велику довжину, завдяки великій кількості негативних зарядів, які розташовані впродовж молекули. Заряди утворюються завдяки карбоксильним групам кінцевих (глікопротеїни слинних залоз), а також за рахунок карбоксильних і сульфатних груп молекул глюкозаміногліканів (протеоглікани). Вони утворюють у воді в'язкі розчини, їх в'язкість збільшується із збільшенням числа негативних зарядів на молекулі.

Металопротейди

Модель металопротейдів може бути зображена чотирма субодинацями металопротейду гемоглобіну. Металопротейдами є також білки, які отримують негемоване залізо. Залізо не входить до складу гема. Прикладом таких білків є ферменти типу сукцинатдегідрогеназа, феридоксин (бере участь у фотосинтезі), бактеріальні дегідрогенази.

Нуклеопротейди

Нуклеопротейди - це складні білки, в складі яких є білок і нуклеїнова кислота, що оточена регулярно розташованими поліпептидними ланцюгами. Загальний склад нуклеопротейдів РНК — 5-6%, ДНК — 95%.

Імуноглобуліни

Імуноглобуліни є основою антитіл і складаються з легких і важких ланцюгів. На кінцях ланцюгів знаходяться — NH₂ і — COOH групи. Синтезуються плазматичними клітинами, які є кінцевим результатом диференціювання В-лімфоцита. Імуноглобуліни є поліфункціональними білками і виконують наступні функції: 1) специфічно розпізнають різноманітні антигени; 2) взаємодіють з іншими імунокомпетентними клітинами, які мають відповідні рецептори; 3) активують систему комплімента.

Денатурація білків

Білкові молекули денатують при нагріванні, при дії екстремальних значень рН, рентгенівського, ультрафіолетового випромінювання, високого тиску, механічного перемішування розчинів. Денатурація — це порушення

третинної структури, головним чином, внаслідок розриву водневих та іонних зв'язків. Первинна структура білка при денатурації зберігається. Денатурація супроводжується зниженням розчинності, зміною оптичного обертання, втратою біологічних властивостей. В тому випадку коли, наприклад, глобулярний білок денатурований частково, процес може бути оберненим - це ренатурація.

Ферментативне розщеплення пептидного зв'язку

Ендопептидази — це гідролази, які розщеплюють пептидний зв'язок всередині пептидного ланцюга.

Екзопептидази — розщеплюють пептидний зв'язок на кінці білкової молекули.

Амінопептидази — атакують аміно-кінець поліпептидного ланцюга білку, *карбоксипептидази* — атакують карбоксильний кінець поліпептидного ланцюга білку.

Пепсин розщеплює пептидний зв'язок між двома гідрофобними амінокислотами.

Трипсин розщеплює зв'язки, утворені лізином або аргініном. Утворені фрагменти мають лізин або аргінін на С — кінці.

Хімотрипсин розщеплює зв'язки, утворені фенілаланіном, триптофаном або тирозином та іншими амінокислотами.

Ендопептидази розщеплюють білкові молекули в шлунку або в дванадцятипалій кишці. Розщеплення до індивідуальних амінокислот, що каталізується екзопептидазами і пептидазами завершується в тонкій кишці.

Лабораторна робота 3.1.

Тема: *Осадження білків спиртом та ацетоном*

Органічні розчинники осаджують білки із нейтрального чи слабо кислого розчину. Вони витісняють білки із водневих розчинів. Механізм дії спирту та інших органічних розчинників можна пояснити дегідратацією міцел білку, що призводить до зниження їх стійкості у розчині.

Прибори: штатив з пробірками.

Реактиви: розчин білку для реакцій осадження (розчин яєчного білку готують шляхом відділення жовтків від 3 штук курячих яєць, потім змішують їх із 700 мл. дистильованої води та 300 мл. насиченого розчину хлориду натрію з наступним фільтруванням через декілька шарів марлі), етиловий спирт 96°, ацетон, хлорид натрію кристалічний.

Хід роботи: У дві пробірки наливають по 1-2 мл розчину білку, туди ж додають трішки 0,2-0,3 г хлориду натрію та енергійно збовтують отриману суміш.

В першу пробірку поступово по краплям додають 2-3 мл. спирту, а в другу — 2-3 мл. ацетону. Енергійно збовтують і через 3-6 хв спостерігають випадіння дрібного осаду білків.

ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота 3.2.

Тема: *Осадження білків шляхом кип'ятіння*

Більшість білків при нагріванні звертаються, перетворюючись в гель. Для різних білків температура їх коагуляції різна. Одні білки коагулюють при 50-55°C, а інші можуть витримувати нетривале кип'ятіння. Температурна денатурація білків протікає повільно і прискорюється із підвищенням температури.

Прибори: Штатив з пробірками.

Реактиви: Розчин білку для осадження, 2% розчин оцтової кислоти, 10% розчин оцтової кислоти, хлорид натрію, 10% розчин їдкого натрію.

Хід роботи: Наливають у 5 пробірок по 2 мл розчину білку. Вміст 1 пробірки нагрівають і спостерігають поступове випадіння білку в осад.

У 2 пробірку додають 1 краплю 2% розчину оцтової кислоти та нагрівають. Осад білку випадає швидше і повніше, так як білок при цьому знаходиться в ізоелектричній точці.

В 3 пробірку додають близько 0,5 мл. 10% розчину оцтової кислоти і нагрівають. Осад білку не утворюється навіть при кип'ятінні.

В 4 пробірку додають 0,5 мл. 10% розчину оцтової кислоти та 3-4 краплі розчину хлориду натрію і нагрівають, внаслідок чого утворюється осад білку.

В 5 пробірку додають біля 0,5 мл. розчину їдкого натрію та підігрівують. Осаду білку не утворюється навіть при кип'ятінні.

ВИСНОВОК: _____

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (11) термінів: фенотип, поліпептиди, пептидний зв'язок, ренатурація, денатурація, домени, фолдінг, шаперони, шапероніни, антитіла, протеоліз.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке білки? Їх склад та молекулярна маса?

2. Охарактеризуйте функції білків.
3. Як називаються мономер, із яких побудовані білки?
4. Перерахуйте основні компоненти молекули амінокислоти.
5. Яка загальна кількість амінокислот? Перерахуйте кожен з них відповідно таблиці 1.
6. Які амінокислоти називаються незамінні? Перерахуйте їх.
7. Які амінокислоти називаються замінні? Перерахуйте їх.
8. Вкажіть класифікацію амінокислот? Наведіть приклади.
9. Що таке первинна структура білку?
10. Який зв'язок забезпечує стабільність первинної структури білку?
11. Що таке вторинна структура білку?
12. Який зв'язок забезпечує стабільність вторинної структури білку?
13. Що таке третинна структура білку?
14. Які взаємодії забезпечують стабільність третинної структури білку?
15. Що таке четвертинна структура білку?
16. Які взаємодії забезпечують стабільність четвертинної структури білку?
17. В чому полягає різниця понять «білок» і «поліпептид»?
18. Які є види білків, надайте їх характеристику?
19. Що таке ізoeлектрична точка білків?
20. Який вплив має рН на заряд білків?
21. Що таке пептидний зв'язок?
22. Охарактеризуйте зв'язки, що стабілізують білкову молекулу і визначають її структуру?
23. Що таке гідратні групи?
24. Глікопротеїни, їх склад, структура, групи.
25. Металопротеїди, їх характеристика.
26. Нуклеопротеїди, їх характеристика.
27. Імуноглобуліни, їх характеристика, функції.
28. Що таке денатурація білків? Які фактори сприяють їй? Чим вона супроводжується?
29. Перерахуйте та охарактеризуйте ферменти, що розщеплюють пептидний зв'язок.

3. Вкажіть білки, які є більш повноцінними та неповноцінними: білки м'яса, білки молока, мікробіальний білок, білок злакових культур, білок яєць, білок бобових культур, білок риби, білок грибів.

До більш повноцінних належать:

До неповноцінних належать:

Потребу організму в білках визначають за кількістю азоту, прийнятого з кормом і виділеного з калом і сечею. Розрахунки здійснюють на підставі даних, що в середньому в білках міститься 16% азоту, тобто в 100 г білку міститься 16 г азоту, одини грам азоту знаходиться в 6,25 г білку ($100 : 16 = 6,25$).

$$N = \frac{N_1 - N_2}{N_3}, \text{ де}$$

N – азотний баланс; N_1 – кількість азоту, що потрапила в організм поряд з кормами; N_2 – кількість азоту, що вийшла поряд з калом; N_3 – кількість азоту, що вийшла поряд з сечею.

Азотний баланс може бути позитивним, тобто більшим за одиницю >1 , негативним, тобто меншим за одиницю <1 та зрівноваженим, тобто дорівнювати одиниці.

4. Вкажіть в яких випадках спостерігається
позитивний азотний баланс –

негативний азотний баланс –

зрівноважений азотний баланс –

5. Розрахуйте задачі, якщо:

- середня молекулярна маса одного амінокислотного залишку дорівнює 120
- розрахунок молекулярної маси білків проходить за формулою:

$$M_{\min} = \frac{a}{b} * 100\%$$

де $M_{\min}$ - мінімальна молекулярна маса білку,

a – атомна чи молекулярна маса компоненту,

b – відсотковий вміст компоненту

Задача №1. Гемоглобін крові людини містить 0,34% заліза. Розрахуйте мінімальну молекулярну масу гемоглобіну, якщо молекулярна маса його становить 56 мг/л.

Задача №2. Альбумін сировотки крові людини має молекулярну масу 68400. Визначте кількість амінокислотних залишків в молекулі цього білку.

Задача №3. Білок містить 0,5% гліцину. Скільки дорівнює мінімальна молекулярна маса цього білку, якщо $M_{\text{гліцину}} = 75,1$? Скільки амінокислотних залишків у цьому білку?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №4

Білки, вуглеводи, жири (ліпіди) продовження

Вуглеводи. На частку вуглеводів припадає до 80% сухої речовини деяких рослинних тканин та до 20% тваринних тканин. Вуглеводи поділяються на 3 групи: моносахариди, дисахариди та полісахариди.

Основними моносахаридами живих організмів є глюкоза, рибоза (входить до складу РНК), 2-дезоксирибоза (входить до складу ДНК), галактоза, манноза і рибулоза. До дисахаридів належить сахароза. До полісахаридів, які ще мають назву глікани входять: целюлоза, пектін, хітин, крохмаль, глікоген тощо.

У живих організмах вуглеводи виконують структурну, енергетичну та спеціальну функції. Основними *структурними* полісахаридами слугують: у рослин – целюлоза і пектини, а у тварин і грибів – хітин.

Целюлоза – найпоширеніша органічна сполука на Землі, оскільки із неї побудовані клітинні стінки рослин. За добу на кожну людину Земної кулі рослини синтезують приблизно 50 кг целюлози.

Хітин – із нього побудовані міцні нерозчинні покриви ракоподібних та комах, а також клітинні стінки грибів.

Енергетична функція полісахаридів. Вуглеводи слугують головним джерелом енергії у клітині. У результаті окислення глюкози та інші моносахариди розщеплюються до CO_2 і H_2O та вивільняється при цьому енергія, яка використовується клітиною.

Гліколіз – універсальний процес, при якому молекула глюкози в результаті ферментативних перетворень в цитозолі анаеробно перетворюється у 2 молекули пірувата ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$). При цьому витрачаються 2 молекули АТФ, але 4 молекули АТФ синтезуються в процесі гліколізу. Таким чином, гліколіз 1 молекули глюкози супроводжується синтезом 2 молекул АТФ й відновлюється 2 молекули нікотинамід аденіндинуклеотида (НАД).

Для запасу енергії використовуються полісахариди, які побудовані із залишків глюкози, - крохмаль (у рослин) і глікоген (у тварин). При необхідності енергії, молекули глюкози, відщеплюються від крохмалю чи глікогену, а при надлишку глюкози її молекули приєднуються до крохмалю чи глікогену. Таким чином, резервні полісахариди весь час змінюють свій розмір залежно від потреб організму в енергії.

Лабораторна робота 4.1.

Тема: *Кольорова реакція на крохмаль*

Характерною реакцією на крохмаль є поява синього кольору від розчину йоду.

Прибори: Штатив з пробірками, піпетки.

Реактиви: 1% розчин крохмалю, розчин Люголя

Хід роботи: У пробірку наливають 2-3 мл. крохмалю, додають 1 краплю розчину Люголя. В результаті рідина зафарбовується у синій колір, який зникає при нагріванні та з'являється при охолодженні. Тому пробу з йодом слід проводити тільки з холодним розчином крохмалю.

ВИСНОВОК:

Ліпіди та біомембрани. Ліпідами називаються природні сполуки, які отримують із рослинних чи тканинних тканин шляхом екстрагуванням неполярними розчинниками (ефіром, бензолом, хлороформом) та деякі не розчинні у воді.

До них відносяться продукти взаємодії жирних кислот зі спиртами (прості ліпіди), аміноспиртами та іншими сполуками (складні ліпіди), простогландіни, ізопреноїдні ліпіди (каротиноїди, хлорофіл, вітаміни Е і К).

Тріацилгліцериди – прості ліпіди, які являють собою ефіри трьохосновного спирту гліцерину і трьох жирних кислот. Жирні кислоти також є основою фосфоліпідів, із яких утворюються плазматичні мембрани. Розрізняють *насичені* жирні кислоти (мірістінова, пальмітинова, стеаринова) та *ненасичені* (олеїнова, лінолева, арахідонова). Жирні кислоти такі, як: лінолева, ліноленова та арахідонова називаються *незамінними*, оскільки вони не синтезуються у клітинах савців і повинні потрапляти до організму поряд з їжею. Основна функція тріацилгліцеридів у живих організмах – це запас енергії. Для цього вони накопичуються в цитозолі клітин запасуючих тканин (наприклад, підшкірної клітковини) у вигляді дрібнодисперсної емульсії масляних краплин і можуть займати практично весь об'єм загасаючої клітини. Додатково тріацилгліцериди можуть слугувати для теплоізоляції і як джерело води: при окисленні тріацилгліцеридів утворюється вдвічі більше води, ніж від вуглеводів, ця властивість використовується пустельними тваринами. Товстий підшкірний шар жирової клітковини надійно захищає тюленів, моржів, пінгвінів й інших полярних теплокровних тварин від холода.

Фосфоліпіди – використовуються клітинами для формування мембранних структур клітини.

Біомембрани – непроникні для іонів та великих молекул, починаючи із цукрів та поліпептидів, але легко проникні для молекул води, кисню, азоту. Молекули, які містять велику кількість атомів вуглецю, достатньо легко проникають через мембрани. Саме тому, алкоголь легко поширюється по організму, проходячи крізь всі бар'єри. Таким чином, ліпідні молекули забезпечують бар'єрну функцію біомембран, які, в свою чергу, здійснюють компартментацію клітинних структур.

Лабораторна робота 4.2.

Тема: *Емульгування жирів*

При перемішуванні рослинної олії з водою утворюється нестійка емульсія, в результаті суміш розділяється на два шари.

Прибори: штатив з пробірками.

Реактиви: рослинна олія свіжа, жир прогірклий, 10% розчин бікарбонату натрію (сода), жовч, білок, 10% розчин соляної кислоти.

Хід роботи: Беруть 8 пробірок, у кожен з них наливають по 3 мл. дистильованої води та декілька крапель жиру. В перші 5 пробірок додають нейтральний жир (рослинна олія), а в пробірки № 6, 7, 8 прогірклий жир, потім у пробірку № 2 і 7 додають 2-3 краплі 10% розчину соди, а в пробірку № 3 – жовчі, у пробірку № 4 – розчину білку, в пробірки № 5 і 8 розчину кислоти. В пробірках № 1 і 6 знаходяться тільки жир та вода. Всі пробірки ретельно перемішують, залишають на 5 хв. Результати заносять до таблиці.

Результати досліду

№ пробірки	Вміст пробірки	Висновки
1	нейтральний жир + вода	
2	нейтральний жир + вода + сода	
3	нейтральний жир + вода + жовч	
4	нейтральний жир + вода + білок	
5	нейтральний жир + вода + кислота	
6	прогірклий жир + вода	
7	прогірклий жир + вода + сода	
8	прогірклий жир + вода + кислота	

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних термінів: ацетилювання, глікозилювання, специфічність білку, молекулярні мотори, аллостеричне регулювання, фосфорилування.

2. Запишіть функції незамінних жирних кислот:

а)

б)

в)

3. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке вуглеводи? Які існують групи вуглеводів?
2. Вкажіть основні речовини, які належать до моно-, ди-, та полісахаридів живих організмів.
3. Вкажіть функції вуглеводів.
4. Що таке целюлоза?
5. Що таке хітин?
6. Що таке гліколіз?
7. Що таке ліпіди, їх функції?
8. Що таке тріацилгліцериди, їх функції?
9. Які існують групи жирних кислот, наведіть приклади?
10. Що таке фосфоліпіди?
11. Що таке біомембрани, їх функції?

4. Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Фізико-хімічні властивості білків»;
2. «Фізико-хімічні властивості вуглеводів»;
3. «Фізико-хімічні властивості жирів».

III ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ

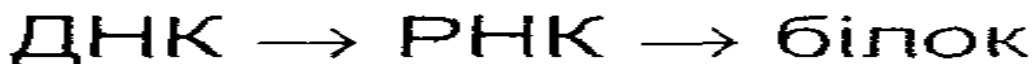
«МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ СПАДКОВOSTІ»

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №5

Нуклеїнові кислоти

Нуклеїнові кислоти грають основну роль у збереженні та реалізації генетичної інформації. Розрізняють два види нуклеїнових кислот: дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК), які забезпечують збереження генетичної інформації, і рибонуклеїнові кислоти (РНК), які приймають участь в її реалізації. Хромосома прокаріотичної клітини являє собою одну довгу дволанцюгову молекулу ДНК, яка зібрана у компактне утворення – нуклеоїд. Еукаріотичні клітини містять велику кількість молекул ДНК, які нерівномірно розподілені по деяким хромосомам у вигляді комплексів з багаточисельними білками. Нуклеїнові кислоти – полінуклеотиди, що складаються із мономерних ланок – нуклеотидів (мононуклеотидів). Відкриттям нуклеїнових кислот людство зобов'язане швейцарському лікарю та досліднику Фрідріху Мішеру, який вперше виявив у клітинних ядрах (*nucleus*) фосфатовмісні сполуки кислого характеру (1869 р.). Нуклеїнові кислоти є високомолекулярними сполуками з молекулярною масою від декількох тисяч (транспортні РНК) до кількох мільйонів дальтон (ДНК еукаріотів). Це – біополімери, які разом з білками належать до класу інформаційних біомакромолекул. Нуклеїнові кислоти виконують ряд унікальних біологічних функцій, не властивих іншим біополімерам: забезпечують зберігання і передачу нащадкам спадкової інформації, беруть безпосередню участь у механізмах реалізації цієї інформації шляхом програмування матричного синтезу всіх білків індивідуального організму.

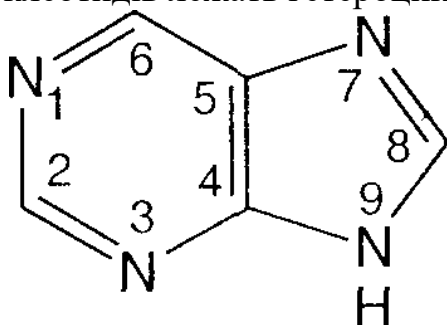
Сукупність біологічних функцій нуклеїнових кислот та механізмів їх реалізації складають потік генетичної інформації в живих організмах:



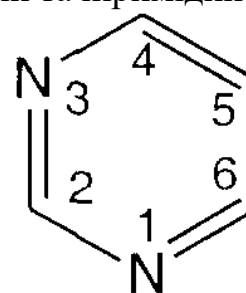
Нуклеотиди є структурними компонентами (мономерними ланками) молекул нуклеїнових кислот ДНК та РНК. За хімічною будовою вони є трикомпонентними сполуками, що складаються з азотистої основи пуринового чи піримідинового ряду, залишків пентоз (рибози або дезоксирибози) та фосфату.

1. БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ФУНКЦІЇ НУКЛЕОТИДІВ СТРУКТУРА НУКЛЕОТИДІВ

За умови повного гідролізу нуклеїнових кислот (кислотного або лужного) вивільняються пуринові та піримідинові азотисті основи, пентози (D-рибоза або 2'-дезоксид- D-рибоза) та фосфорна кислота. В основі структури азотистих основ нуклеотидів лежать гетероциклічні сполуки пурин та піримідин.



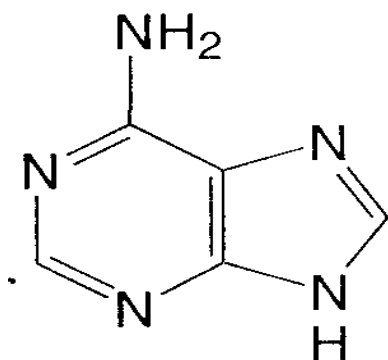
Пури́н



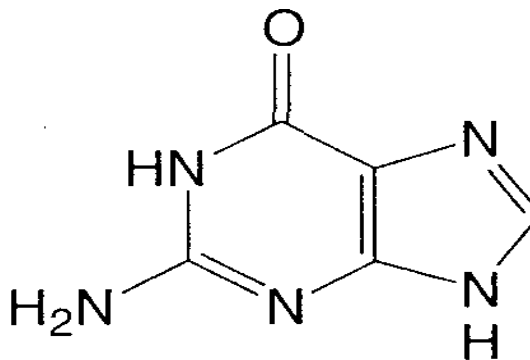
Піри́мідин

Пуринові основи нуклеїнових кислот

Пуриновими основами, що входять до складу нуклеотидів нуклеїнових кислот, є *аденін (А)* та *гуанін (Г)*, що мають таку будову:



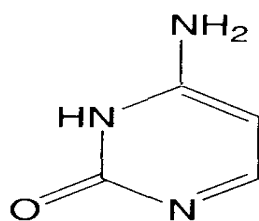
Аденін (6-амінопури́н)



Гуанін (2-аміно-6-оксопури́н)

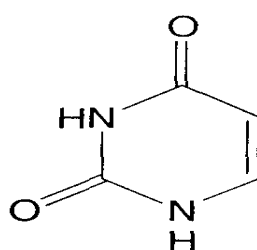
Піримідинові основи нуклеїнових кислот

До складу нуклеотидів нуклеїнових кислот входять три головні піримідинові основи: *цитозин (Ц)*, *урацил (У)*, *тимін (Т)*:



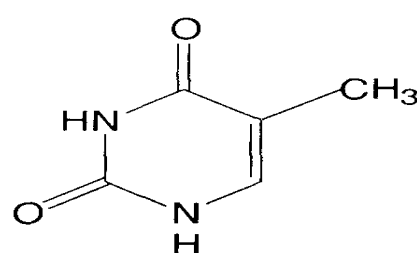
Цитозин

(4-аміно-2-оксопіри́мідин)



Урацил

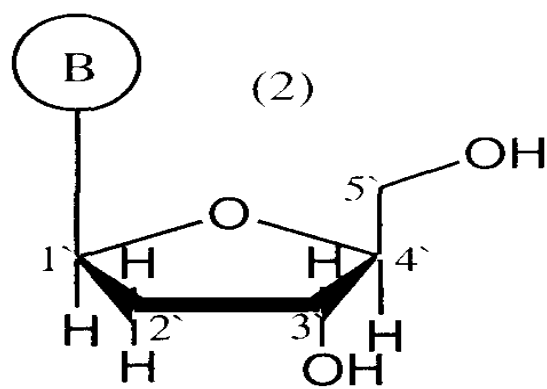
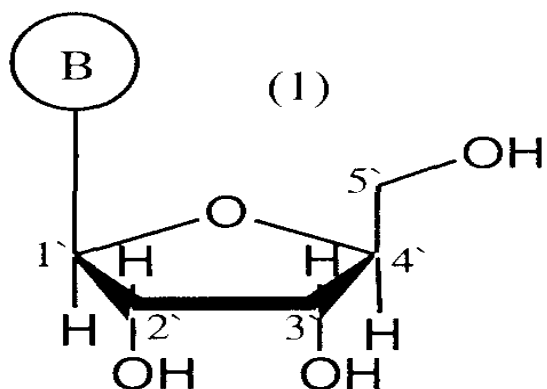
(2,4-діоксопіри́мідин)



Тимін

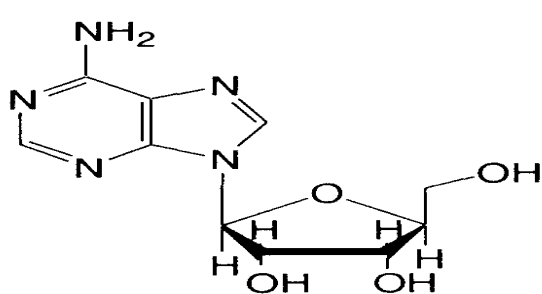
(5-метил-2,4-діоксопіри́мідин)

Нуклеозиди - двокомпонентні біоорганічні молекули, що складаються з азотистої основи пуринового чи піримідинового ряду та пентози (D-рибози або 2-дезоксид- D -рибози) — рибонуклеозиди та дезоксирибонуклеозиди відповідно:

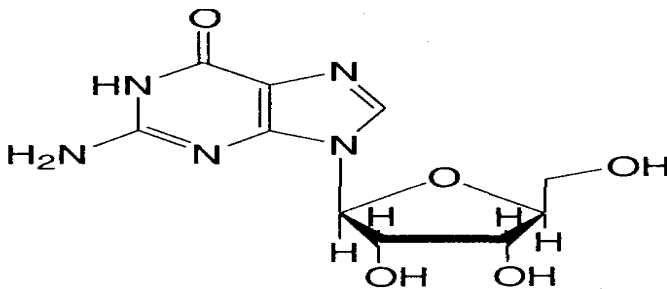


Загальні формули рибонуклеозидів (1) та дезоксирибонуклеозидів (2).
В - азотиста основа

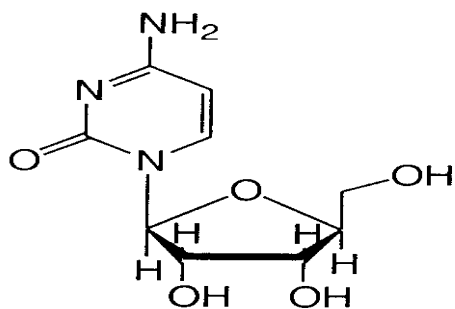
РИБОНУКЛЕОЗИДИ:



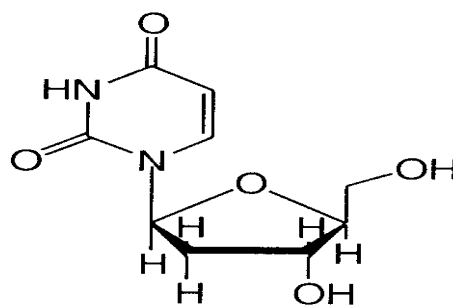
Аденозин



Гуанозин

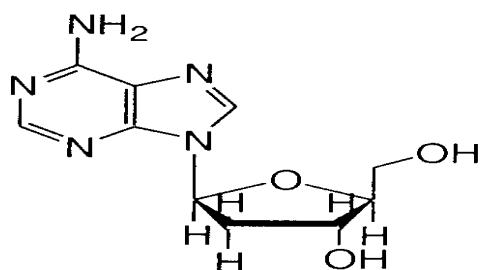


Цитидин

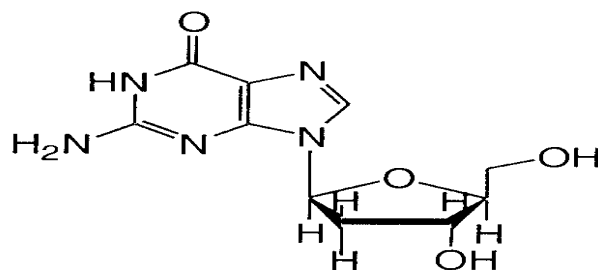


Уридин

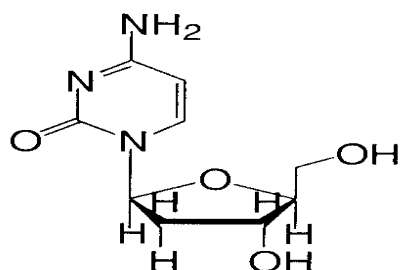
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДИ:



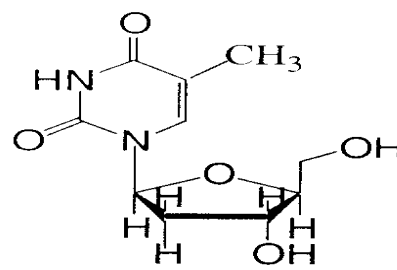
Дезоксиаденозин



Дезоксигуанозин



Декзоксицитидин



Дезокситимідин
(Тимідин)

НУКЛЕОТИДИ

Фосфорилювання (ацилювання фосфорною кислотою) певного гідроксилу в пентозі, що входить до складу нуклеозиду, призводить до утворення нуклеотиду (нуклеозидфосфату). До складу нуклеотидів (та нуклеозидів) ДНК входить 2'-дезокси-D-рибоза, РНК-D-рибоза:

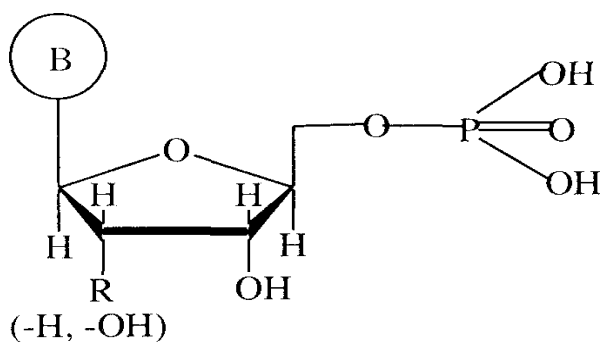
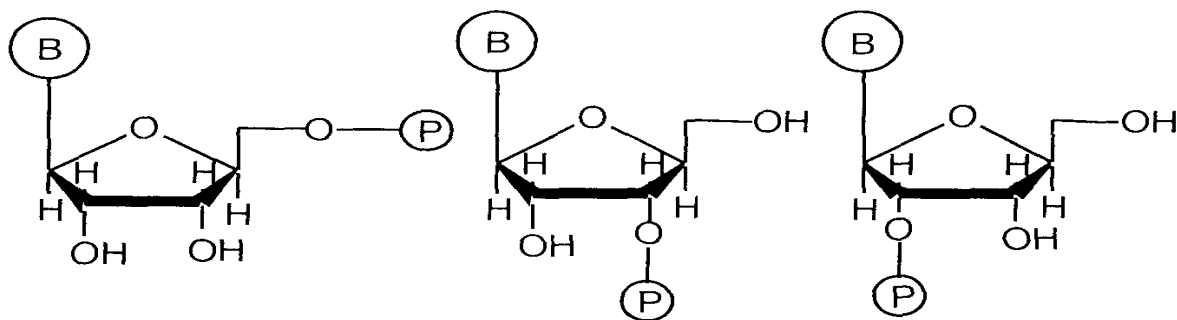


Схема будови нуклеотиду (рибонуклеозид-, дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфат)

Залежно від місця фосфорилювання пентозного гідроксилу розрізняють три типи нуклеотидів (нуклеозидфосфатів):



Нуклеозид-5'-фосфати

Нуклеозид-3'-фосфати

Нуклеозид-2'-фосфати

В результаті гідролізу нуклеїнових кислот, залежно від місця розщеплення фосфодієфірних зв'язків в молекулах полінуклеотидів, утворюються нуклеозид-5'-фосфати та нуклеозид-3'-фосфати.

Крім різниці в пентозах, нуклеотиди РНК та ДНК розрізняються також за складом піримідинових основ (в РНК - цитозин, урацил, в ДНК - цитозин, тимін). Номенклатуру нуклеозидів та нуклеотидів (нуклеозид-5'-монофосфатів) ДНК і РНК подано в таблиці.

Номенклатура нуклеозидів і нуклеотидів РНК та ДНК

Назви азотистих основ повні		Нуклео- зиди	Нуклеотиди	Скорочені позначення нуклеотидів
Скорочені укр.; англ.				
РНК				
Пуринові:				
Аденін	(А; A)	Аденозин	Аденілова кислота (аденозин-5'-монофосфат)	АМФ
Гуанін	(Г; G)	Гуанозин	Гуанілова кислота (гуанозин-5'-монофосфат)	ГМФ
Піримідинові:				
Цитозин	(Ц; C)	Цитидин	Цитидилова кислота (цитидин-5'-монофосфат)	ЦМФ
Урацил	(У; U)	Уридин	Уридилова кислота (уридин-5'-монофосфат)	УМФ
ДНК				
Пуринові:				
Аденін	(А; A)	Дезокси- аденозин	Дезоксиаденілова кислота (дезоксиаденозин-5'-монофосфат)	дАМФ
Гуанін	(Г; G)	Дезокси- гуанозин	Дезоксигуанілова кислота (дезоксигуанозин-5'-монофосфат)	дГМФ
Піримідинові:				
Цитозин	(Ц; C)	Дезокси- цитидин	Дезоксицитидилова кислота (дезоксицитидин-5'-монофосфат)	дЦМФ
Тимін	(Т; T)	Тимілін	Тимілилова кислота (тимілін-5'-монофосфат)	ТМФ

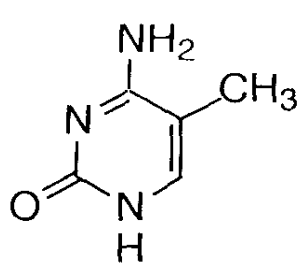
МІНОРНІ НУКЛЕОТИДИ

Крім зазначених вище основних п'яти азотистих основ (двох пуринових та трьох піримідинових), до складу деяких нуклеїнових кислот входять у відносно незначних кількостях додаткові (мінорні) азотисті основи та відповідні їм мінорні нуклеотиди.

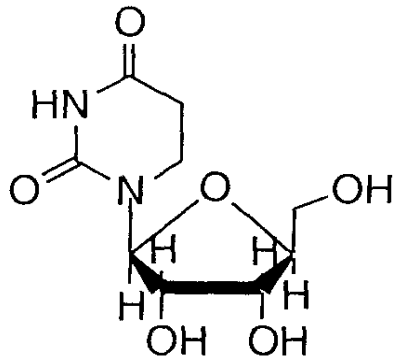
Найбільша кількість мінорних нуклеотидів зустрічається в молекулах транспортних РНК (тРНК) – до 5% нуклеотидного складу. До мінорних нуклеотидів належать метиловані похідні звичайних азотистих основ, наприклад, 1 -метиладенін, 1 -метилгуанін, 3-метилцитозин. ДНК людини

містить значну кількість 5-метилцитозину.

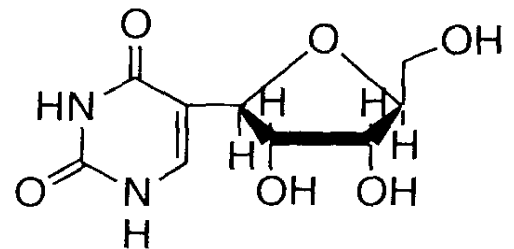
Нуклеотидами незвичайної структури у складі тРНК є *дигідроуридин* та *псевдоуридин*, в якому рибоза приєднана до урацилу в 5-му положенні, тобто не азот-вуглецевим, а вуглець-вуглецевим зв'язком:



5-метилцитозин



Дигідроуридин



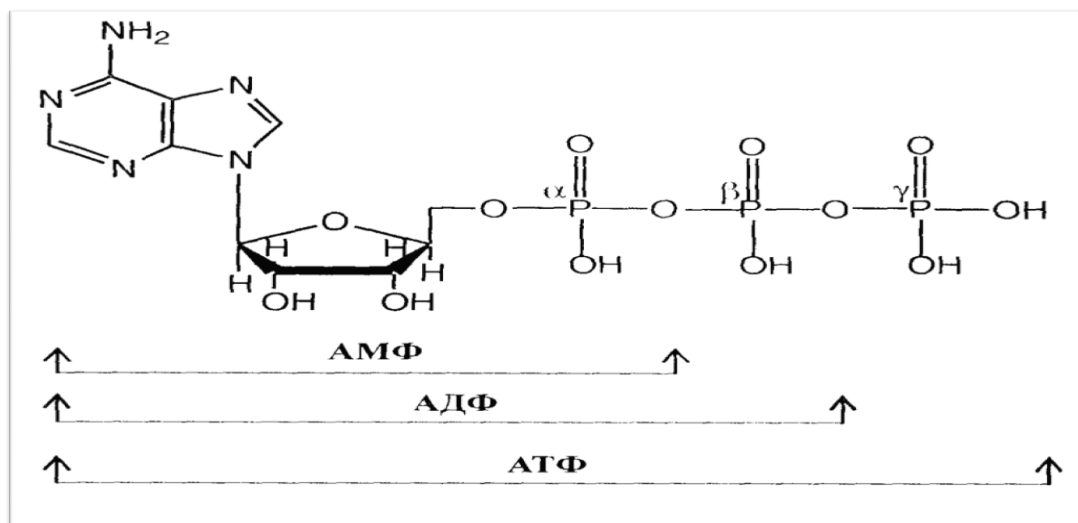
Псевдоуридин

Деякі вільні рибонуклеотиди та їх похідні, що не входять до складу нуклеїнових кислот, виконують функції коферментів, кофакторів, алостеричних ефекторів різних ферментних систем.

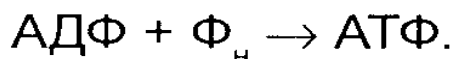
БІОХІМІЧНІ ФУНКЦІЇ ВІЛЬНИХ НУКЛЕОТИДІВ:

1. участь в реакціях біосинтезу ДНК та РНК як попередників - дезоксирибонуклеозидтрифосфати (дНТФ) дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ та нуклеозидтрифосфати (НТФ) АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ, відповідно;

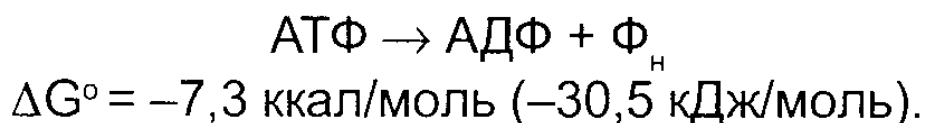
2. участь в енергетичному обміні - дифосфорильовані та трифосфорильовані нуклеотиди т. з. аденілової системи: аденозинтрифосфорна кислота (АТФ) та аденозиндифосфорна кислота (АДФ).



Утворення АТФ з АДФ та неорганічного фосфату (P_n) є центральною реакцією *окисного фосфорилування*, що відбувається в мембранах мітохондрій і є головним процесом запасання (акумуляції) хімічної енергії, яка вивільняється в результаті реакцій біологічного окислення:



Особливістю фосфоангідридного зв'язку між залишками фосфату в (β - та γ -положеннях молекули АТФ є висока стандартна вільна енергія (ΔG°) гідролізу або переносу γ -фосфатної групи на інший акцептор:



Такі хімічні зв'язки та біомолекули, що їх містять, дістали в біохімії назву *макроергічних сполук*. Хімічна енергія, що вивільняється при ферментативному розщепленні макроергічних зв'язків в молекулах АТФ, є головним джерелом протікання інших ендергонічних реакцій та фізіологічних процесів у живих організмах.

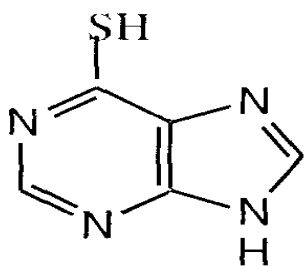
Нуклеотиди АТФ, АДФ та АМФ можуть також виступати в ролі алостеричних модуляторів певних регуляторних ферментів.

3. Участь в метаболічних реакціях в ролі коферментів:

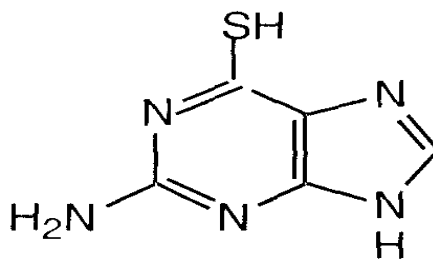
- НАД, НАДФ, ФАД, ФМН - в реакціях біологічного окислення;
- УТФ, УДФ - в реакціях біосинтезу глікогену;
- ЦТФ, ЦДФ - в біосинтезі гліцерофосфоліпідів.

СИНТЕТИЧНІ АНАЛОГИ АЗОТИСТИХ ОСНОВ ТА НУКЛЕОТИДІВ ЯК АНТИМЕТАБОЛІТИ ТА ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ

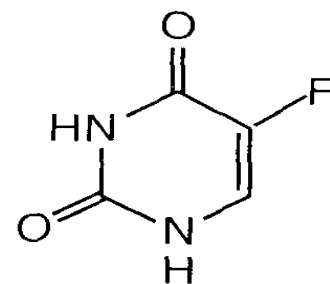
Деякі похідні азотистих основ пуринового та піримідинового ряду при їх надходженні всередину клітин можуть заміщати за механізмом конкурентного зв'язування нормальні азотисті основи у складі нуклеїнових кислот, що синтезуються. Таке конкурентне заміщення природних метаболітів їх синтетичними аналогами призводить до порушення нормальної течії біохімічних процесів, зокрема функцій ДНК і РНК. Виходячи з цього, антиметаболіти - аналоги пуринів та піримідинів - порушують процеси нормального біосинтезу нуклеїнових кислот та білків, що призводить до гальмування мітозу, особливо в клітинах, які здатні до активного клітинного поділу. Такі сполуки (6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, 5-фторурацил) застосовуються в медичній практиці як хіміотерапевтичні препарати при лікуванні деяких форм онкологічних захворювань:



6-меркаптопурин



6-тіогуанін



5-фторурацил

2. ПЕРВИННА СТРУКТУРА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ; ПОЛЯРНІСТЬ ПОЛІНУКЛЕОТИДІВ

ПЕРВИННА СТРУКТУРА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Всі класи нуклеїнових кислот - ДНК та РНК - є високомолекулярними сполуками, основою *первинної структури* яких є полінуклеотидний ланцюг.

Окремі нуклеотиди зв'язані між собою в полінуклеотидний ланцюг за рахунок фосфодієфірних зв'язків, що утворюються між 3'- та 5'-гідроксильними групами пентоз (рибоз або дезоксирибоз) сусідніх нуклеотидів

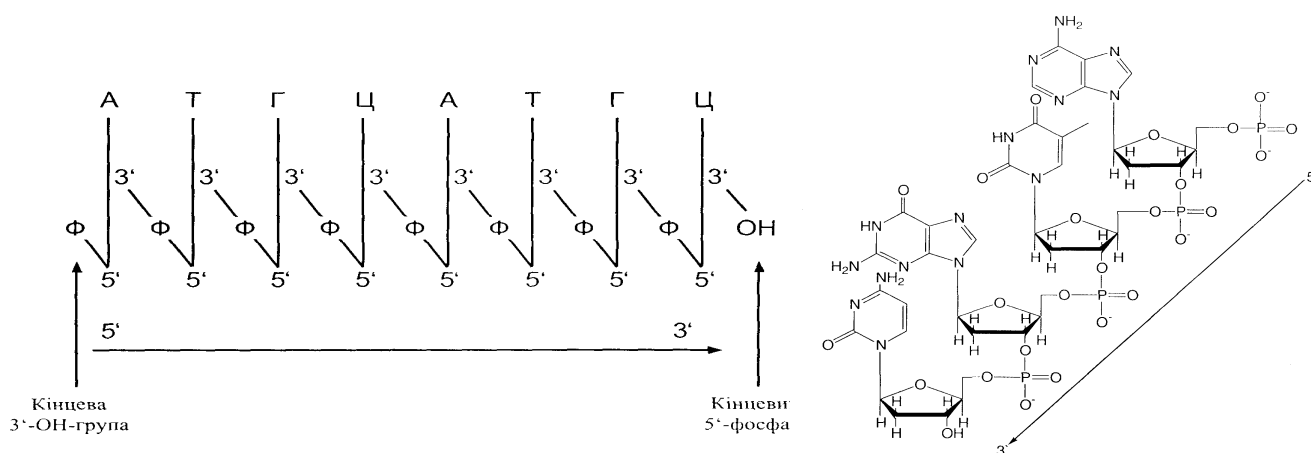


Рис. 4.10. Первинна структура полідезоксирибонуклеотидного ланцюга ДНК

При схематичному зображенні полінуклеотидних ланцюгів ДНК та РНК пентози подають вертикальними лініями, 3',5'-фосфодієфірні зв'язки - похилими лініями з літерою Ф (або) посередині. Цей же ланцюг можна подати такою системою скорочених позначень: фАфТфГфЦ...

ПОЛЯРНІСТЬ ПОЛІНУКЛЕОТИДІВ

У полінуклеотидному ланцюгу ДНК або РНК виділяють два кінці: 5'-кінець, тобто той, що містить вільний (не зв'язаний з черговим нуклеотидом) 5'-гідроксил пентози, та 3'-кінець - той, що містить вільний (не зв'язаний з

нуклеотидом) 3'-гідроксил пентози. В природних нуклеїнових кислотах 5'-кінець (5'-гідроксил кінцевої рибози або дезоксирибози) звичайно фосфорильований, 3'-кінець - містить вільну ОН-групу. Прийнято вважати, що така нуклеїнова кислота *полярна* і має напрямок ланцюга $5' \rightarrow 3'$.

ВІДМІННОСТІ У ПЕРВИННІЙ СТРУКТУРІ ДНК ТА РНК:

1. У складі нуклеотидів ДНК міститься цукор 2'-дезоксирибоза, замість рибози у складі нуклеотидів РНК.
2. Нуклеотиди ДНК та РНК відрізняються за складом піримідинових основ:
3. В ДНК міститься піримідин *тимін* (5-метилурацил);
4. В РНК міститься піримідин *урацил* (замість тиміну).
5. Первинна структура ДНК та РНК різниться за наявністю деяких міnorних нуклеотидів.
6. Певні класи ДНК та РНК мають специфічні для них послідовності нуклеотидів, що визначають їх біологічні функції.

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРВИННОЇ СТРУКТУРИ ДНК ТА РНК

<i>Нуклеїнові кислоти</i>	<i>Азотисті основи</i>		<i>Пентоза</i>
	пурини	піримідини	
ДНК	Аденін Гуанін	Цитозин Тимін	Дезоксирибоза
РНК	Аденін Гуанін	Цитозин Урацил	Рибоза

3. БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ФУНКЦІЇ ДНК БІОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ ДНК

Біологічними функціями ДНК, які вони виконують у всіх живих організмах, є:

1. Збереження генетичної (спадкової) інформації.
2. Передача генетичної інформації нащадкам.

Генетична роль ДНК (тобто її провідна роль у збереженні та реалізації генетичної інформації) була доведена в результаті вивчення такого біологічного явища, як феномен трансформації пневмококів *Streptococcus pneumoniae* (Ф. Гріффіт, 1928; О. Евері, К. Мак-Леодом та М. Мак-Карті, 1944), та механізму передачі генетичного матеріалу бактеріофагу T2 (Альфред Д. Херші, Марта Чейз, 1952).

МОЛЕКУЛЯРНА МАСА ТА РОЗМІРИ МОЛЕКУЛ ДНК

Молекулярна маса дезоксирибонуклеїнових кислот суттєво варіює у різних біологічних об'єктів: вірусів, прокаріотичних та еукаріотичних клітин.

Точному визначенню молекулярної маси різних зразків ДНК перешкоджає гідродинамічна ламкість гігантських молекул нуклеїнових кислот, особливо у вищих організмів, які за спроби виділити їх в інтактному стані розпадаються на коротші фрагменти. Втім, застосування сучасних фізико-хімічних методів дослідження та електронної мікроскопії дозволило встановити, що молекулярна маса ДНК (при розрахунку на один полінуклеотидний ланцюг) складає в середньому діапазоні від 10^6 до 10^{11} одиниць атомної маси, або дальтонів (або ж 103—108 кДа).

ДНК ВІРУСІВ

Найменшу молекулярну масу та довжину молекули мають ДНК найпростіших живих утворень - вірусів, зокрема вірусів бактерій (бактеріофагів) - в середньому 103- 105 кДа.

Так, наприклад м.м. ДНК *вірусу потому* = $3 \cdot 10^3$ кДа, *бактеріофага Т4* – $1,3 \cdot 10^5$ кДа.

ДНК ПРОКАРІОТІВ

У прокаріотичних клітинах мікроорганізмів кількість ДНК та її молекулярна організація значно вищі, ніж у вірусів. Зокрема, ДНК кишкової палички *E. coli* являє собою ковалентно замкнене дволанцюгове кільце з м.м. $1,9 \cdot 10^6$ кДа. Відповідно до зростання складності біологічної організації при переході від вірусів до прокаріотів (а далі - еукаріотів) зростає й кількість нуклеотидних пар у дволанцюгових молекулах ДНК.

ДНК ЕУКАРІОТИЧНИХ КЛІТИН

У клітинах без'ядерних прокаріотів міститься одна молекула ДНК, яка розташована в спеціальній зоні цитоплазми - *нуклеоїді*. ДНК ядерних (еукаріотичних) клітин розміщена в ядрі і, поза фазами клітинного поділу, входить до складу аморфного нуклеопротейнового утворення - *ядерного хроматину*. В період підготовки до мітозу - фазі S клітинного циклу — відбувається подвоєння ДНК з подальшою конденсацією хроматину і утворенням цитологічних структур – *хромосом*, в яких сконцентрований ядерний генетичний матеріал клітини.

Кількість хромосом в еукаріотичних клітинах специфічна для біологічного виду; соматичні клітини людини мають 46 хромосом (23 пари).

Молекулярна маса ДНК з хромосом людського організму дорівнює приблизно $1,6 \cdot 10^{11}$ дальтон, що відповідає $2,4 \cdot 10^9$ пар азотистих основ. Фізична довжина розгорнутих молекул ДНК з клітин еукаріотів досягає декількох сантиметрів.

ВТОРИННА СТРУКТУРА ДНК

Вивчення нуклеотидного складу молекул ДНК з різних біологічних об'єктів показало, що, незалежно від джерела походження (бактеріальні, рослинні, тваринні організми), всі ДНК мають певні кількісні взаємовідносини між вмістом пуринових та піримідинових нуклеотидів.

Згідно з цими закономірностями - *правилами Чаргафа*, у складі ДНК:

- сума пуринових основ дорівнює сумі піримідинових основ, тобто:

$$A+G=T+C,$$
або
$$(A+G)/(T+C) = 1$$
- кількість 6-аміногруп дорівнює кількості 6-кетогруп (за хімічною номенклатурою Фішера);
- вміст аденіну дорівнює вмісту тиміну, а вміст гуаніну дорівнює вмісту цитозину (правило еквівалентності):

$$A=T, G=C$$

Зазначені кількісні взаємовідношення між азотистими основами, а також результати вивчення будови молекул ДНК методом рентгеноструктурного аналізу, здійснені М. Уілкінсом, дозволили американському біохіміку Джеймсу Уотсону та англійському фізику Френсісу Кріку, що працювали в Кембриджському університеті, запропонувати просторову модель, структури молекули ДНК (1953 р.). Ця просторова модель, являла собою подвійну спіраль (так звана *В-форма* молекули ДНК за Уотсоном і Кріком).

Згідно з моделлю Уотсона - Кріка, молекула ДНК складається з двох *антипаралельних* полінуклеотидних ланцюгів. Ці ланцюги сполучені між собою водневими зв'язками, що утворюються між протилежно розташованими, так званими *комплементарними* азотистими основами (аденіном і тиміном та гуаніном і цитозином, відповідно), що пояснює зазначені вище емпіричні правила Чаргафа.

Два антипаралельні полінуклеотидні ланцюги утворюють стабілізовану водневими зв'язками правообертальну спіраль, в якій обидва полінуклеотидні ланцюги закручені навколо центральної осі.

Структурні особливості подвійної спіралі: діаметр спіралі - 2 нм; відстань між азотистими основами впродовж осі спіралі 0,34 нм; спіральна структура повторюється з інтервалом в 3,4 нм, тобто через 10 нуклеотидних пар.

Крім водневих зв'язків, стабільність молекули ДНК підтримується також за рахунок взаємодій між *p*-електронними хмарами гетероциклів азотистих основ, що розміщені один під одним упродовж осі спіралі - так звані "стекінг-взаємодії".

Зазначені структурні особливості стосуються запропонованої Уотсоном і Кріком В-форми молекули ДНК

Крім В-форми, молекула ДНК при взаємодії з різною кількістю молекул води та катіонами набуває інших структурних форм: А, С та Z, які можуть спостерігатися в різних фізіологічних умовах, зокрема при комплексуванні з білками ядерного хроматину (С-форма).

Схема утворення водневих зв'язків між аденіном і тиміном та гуаніном і цитозином

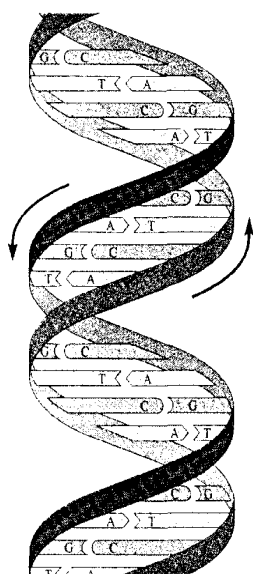
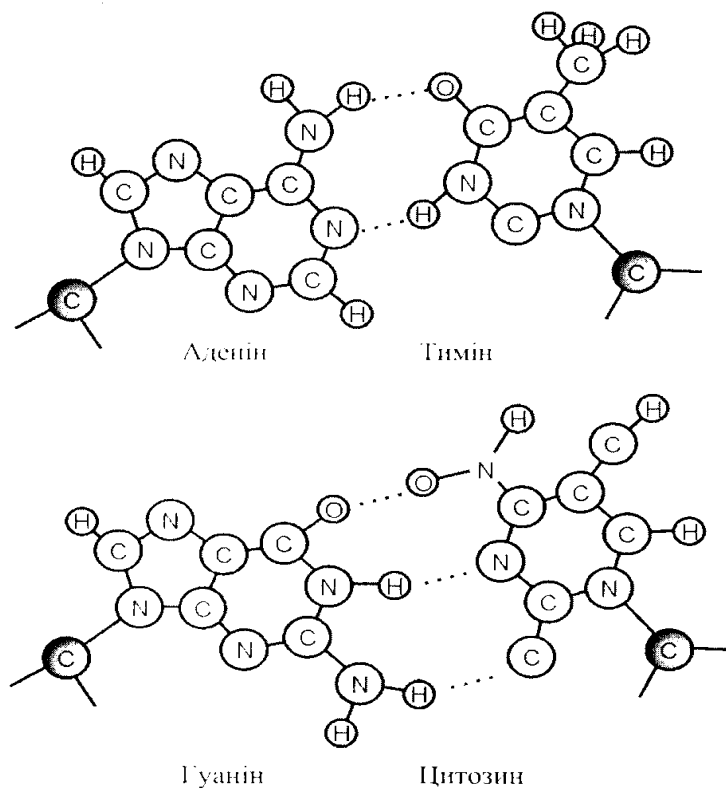


Рис. 4.12. Схематична модель двоспіральної молекули ДНК за Уотсоном і Кріком

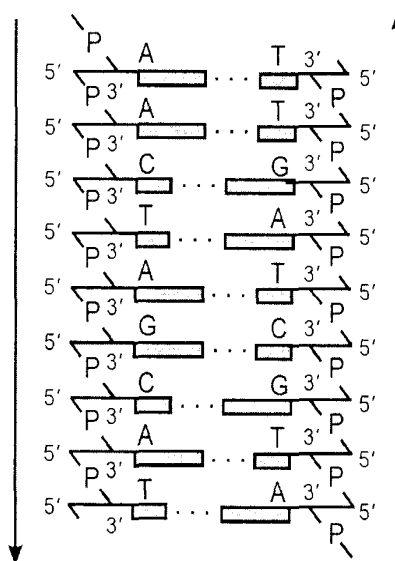


Рис. 4.13. Антипаралельність полінуклеотидних ланцюгів у молекулі ДНК

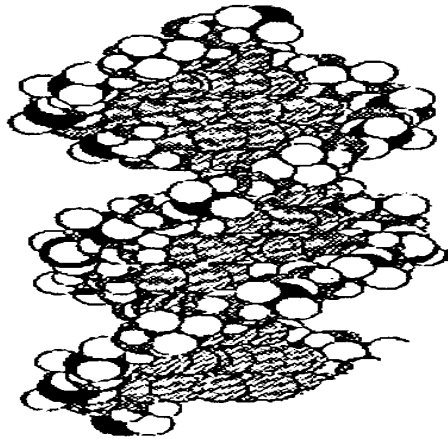


Рис. 4.14. В-форма молекули ДНК

ТРЕТИННА СТРУКТУРА ДНК

В живій клітині подвійна спіраль, що становить вторинну структуру ДНК, не має вигляду розгорнутої молекули, а додатково згорнута в просторі, утворюючи певні третинні структури *суперспіралі*.

В суперспіралізованому стані молекули ДНК в комплексі з певними клітинними білками входять до складу *нуклеоїду* прокаріотів та утворюють *нуклеосоми* ядерного хроматину еукаріотів. Завдяки суперспіралізації довгі молекули ДНК формують компактні утворення, зокрема хромосоми ядра. В результаті компактизації ядерна молекула ДНК клітин організму людини, що становить біля 8 см, вміщується в хромосомі довжиною 5 нм.

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДНК

1. Хімічні властивості ДНК

Всі полінуклеотиди, і ДНК зокрема, є сильними багатоосновними кислотами з низьким значенням рН. Кислотність ДНК обумовлена вторинними фосфатними групами, що при фізіологічних значеннях рН повністю іонізовані. Завдяки кислотним властивостям і наявності на своїй поверхні негативних зарядів молекули ДНК при фізіологічних значеннях рН активно реагують і утворюють комплекси з катіонами:

- основними білками (гістонами, протамінами);
- катіонами металів (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+});
- поліамінами (спермідіном, сперміном).

2. В'язкість розчинів ДНК

Висока молекулярна маса і значна довжина молекул ДНК зумовлюють високу в'язкість навіть дуже розбавлених їх розчинів. В'язкість молекул ДНК у розчині залежить від їх конформації і суттєво змінюється за умов *денатурації* та *ренатурації*.

3. Поглинання в УФ-області

Азотисті основи (та відповідні нуклеоїди), що входять до складу нуклеїнових кислот ДНК і РНК, мають властивість поглинати ультрафіолетове

світло з максимумом поглинання при 260 нм.

Утворення полінуклеотидів супроводжується певним зниженням УФ-поглинання порівняно з сумішшю вільних нуклеотидів. Поглинання при 260 нм нативної молекули ДНК в середньому на 40% нижче відповідного поглинання суми азотистих основ, що входять до складу полінуклеотиду – *гіпохромний ефект*. При порушенні впорядкованої двоспіральної конформації ДНК та структурних взаємовідносин між азотистими основами спостерігається *гіперхромний ефект*, тобто зростання поглинання розчинів молекул ДНК при 260 нм, що дозволяє досліджувати процес денатурації.

4. Денатурація

Денатурація ДНК - це порушення нативної двоспіральної конформації молекул ДНК та їх впорядкованого просторового розташування з утворенням неупорядкованих одноланцюгових клубків. *Ренатурація* — відновлення нативної вторинної конформації ДНК, що спостерігається за певних умов.

Денатурація спричиняється:

- різкими змінами рН в кислий або лужний бік;
- нагрівання розчинів ДНК до певних температур.

За умов денатурації ковалентні зв'язки в ДНК зберігаються, проте відбувається розкручування подвійної спіралі з втратою специфічних взаємодій між азотистими основами. Молекулярною основою денатурації молекул ДНК є руйнування водневих зв'язків між комплементарними азотистими основами А-Т та Г-Ц. Денатурація ДНК супроводжується *гіперхромним ефектом* та зменшенням в'язкості її розчинів.

Нуклеїнові кислоти, що зазнали денатурації, втрачають свої біологічні властивості.

Термічна денатурація ДНК дістала назву процесу *плавлення*. Для кожного стану молекул ДНК (тобто молекул, що мають певний нуклеотидний склад) характерна відповідна температура денатурації, що позначається як температура (точка) плавлення — Т.

Оскільки між гуаніном та цитозином у складі двоспіральної молекули ДНК утворюється три водневих зв'язки (на відміну від двох — між аденіном та тиміном), термічна дисоціація пари Г-Ц потребує більших затрат енергії, тобто відбувається при вищих температурах, ніж руйнування пари А-Т. Виходячи з цього, температура плавлення (Т) молекул ДНК прямо пропорційна вмісту в них Г-Ц-пар, що дозволяє використати визначення Т як показника нуклеотидного складу ДНК.

4. БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ФУНКЦІЇ РНК

Рибонуклеїнові кислоти (РНК) – за характером структури та біологічних функцій підрозділяються на такі класи:

- інформаційні (матричні) РНК (мРНК),
- транспортні РНК (тРНК),
- рибосомні РНК (рРНК)

Кожен з цих класів РНК виконує свої специфічні функції в переносі та

реалізації генетичної інформації в клітині.

Тип РНК	Відносна кількість, %	Маса, кД	Кількість нуклеотидів
Рибосомальна РНК (рРНК)	80	$1,2 \times 10^3$	3700
		$0,55 \times 10^3$	1700
		$3,6 \times 10^1$	120
Транспортна РНК (тРНК)	15	$2,5 \times 10^1$	75
Інформаційна (матрична) РНК (мРНК)	5	Гетерогенний	склад

Первинна структура РНК. За первинною структурою РНК є полірибонуклеотидами. На відміну від дволанцюгових ДНК молекули РНК вищих організмів є одноланцюговими полінуклеотидами. Разом з тим, одноланцюгові РНК за рахунок внутрішньомолекулярних взаємодій набувають конформацій, що позначаються як вторинні та третинні структури.

Вторинна структура одноланцюгових полірибонуклеотидів еукаріотів характеризується наявністю ділянок, що мають двоспіральну структуру. Ці ділянки молекул РНК - так звані "шпильки" - утворюються за рахунок згинів полірибонуклеотидного ланцюга та взаємодії між собою комплементарних азотистих основ (А—У та Г—Ц) в межах одного ланцюга. Такі спіралізовані ділянки включають в себе 20-30 нуклеотидних пар і чергуються з неспіралізованими фрагментами РНК.

Біосинтез окремих типів РНК каталізується *РНК-полімеразами* різної клітинної локалізації та специфічності.

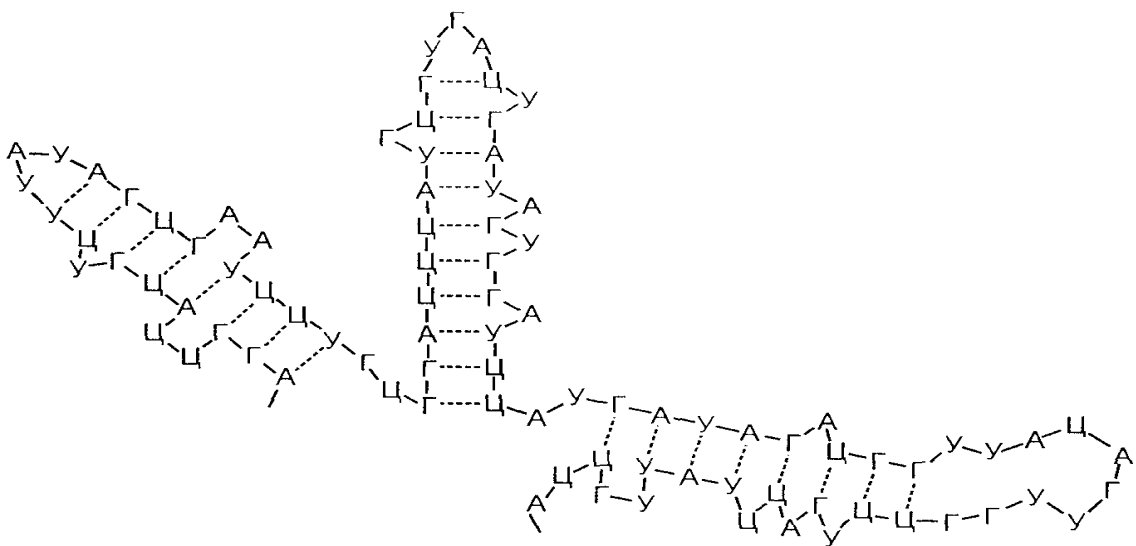


Рис. 4.16. Механізм утворення "шпильок" у вторинній структурі РНК

Фізико-хімічні властивості РНК

Подібно до ДНК, полінуклеотиди РНК характеризуються максимумом поглинання при 260 нм, обумовленим азотистими основами, мають гіпохромний ефект, підлягають денатурації при дії жорстких фізико-хімічних факторів.

ІНФОРМАЦІЙНІ (МАТРИЧНІ) РНК

Це - клас РНК, що складає 2-5% загальної кількості клітинної РНК. мРНК виконують функцію переносників генетичної інформації від генома (ядерної ДНК) до білок-синтезуючої системи клітини (рибосом).

Для мРНК властиві найбільша гетерогенність молекулярної маси та розмірів молекул з константами седиментації 6-25s - та метаболічна нестабільність. Широкий спектр молекул мРНК відповідає кількості білків організму, носіями генетичної інформації для синтезу яких вони є.

Первинна структура мРНК. За своїм нуклеотидним складом мРНК відповідає (з урахуванням принципу комплементарності) нуклеотидній послідовності фрагменту одного з ланцюгів ядерної ДНК, транскриптом якого вона (мРНК) є. Виходячи з цього, мРНК є інформаційними матрицями, які визначають амінокислотні послідовності в поліпептидах, що синтезуються в рибосомах.

Особливістю первинної структури мРНК є наявність на 5' та 3'-кінцях молекули характерних для цього класу РНК нуклеотидних послідовностей.

Вторинна структура мРНК характеризується численними внутрішньоланцюговими двоспиральними ділянками — "шпильками", до складу яких входить до 40-50 % нуклеотидного складу полірибонуклеотиду.

ТРАНСПОРТНІ РНК

На частку тРНК припадає 10-20 % клітинної РНК. Молекули тРНК являють собою полірибонуклеотидні ланцюги довжиною в 70-90 нуклеотидів. Молекулярна маса тРНК - 23-28 кДа.

Всього в клітинах знаходиться не менше 20 типів тРНК, що відповідає кількості природних L-амінокислот, з якими тРНК взаємодіють у ході трансляції.

Первинна структура тРНК відзначається великою кількістю мінорних нуклеотидів - метилованих, псевдоуридилових та дигідроуридилових залишків.

Вторинна структура молекул тРНК у двовимірному просторі має конформацію "листка конюшини", що утворюється за рахунок специфічної взаємодії комплементарних азотистих основ протягом полірибонуклеотидного ланцюга.

Неспарені нуклеотидні послідовності формують специфічні для будови тРНК структурні елементи:

акцепторну гілку (стебло) - 3'-кінець молекули, який містить термінальну послідовність нуклеотидів ЦЦА. Кінцевий аденозин через 3'-гідроксильну

групу рибози акцептує амінокислоту в процесі трансляції;

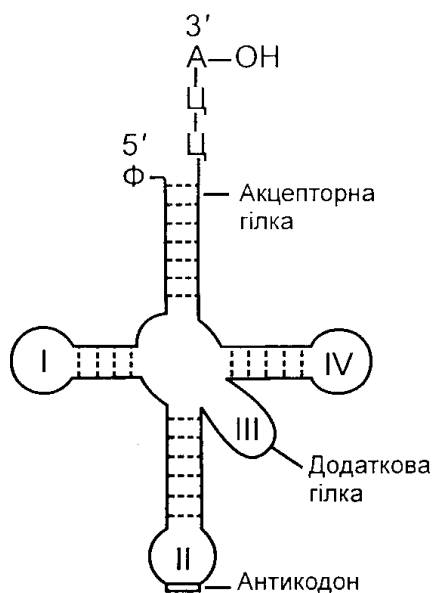
антикодонову петлю - містить групу з трьох нуклеотидів (антикодон), які комплементарні триплету нуклеотидів (кодону) в складі мРНК. Антикодонова петля відповідає за взаємодію тРНК з певними нуклеотидами мРНК в процесі трансляції;

дигідроуридилова петля - складається з 8-12 нуклеотидів; містить у собі 1—4 дигідроуридилові залишки;

псевдоуридилова петля - ділянку тРНК, яка містить у своєму складі нуклеотид псевдоуридил; вважають, що псевдоуридилова петля необхідна для взаємодії тРНК з рибосомою.

додаткову гілку структуру, за кількістю нуклеотидних залишків у якій тРНК поділяються на два класи: тРНК класу I містить 3—5 нуклеотидів та тРНК класу II (13-21 нуклеотид).

Притаманні тРНК структури типу "листка конюшини" можуть утворювати більш компактні просторові конформації-третинні структури. За даними рентгеноструктурного аналізу, третинна структура молекул тРНК нагадує велику латинську літеру L



Узагальнена схема вторинної структури молекули тРНК типу "листка конюшини"

РИБОСОМНІ РНК

Рибосомні РНК (рРНК) - клас клітинних РНК, що входять до складу рибосом прокаріотичних та еукаріотичних клітин. На частку рРНК припадає до 90 % загальної кількості клітинних РНК.

рРНК разом із специфічними білками складають основу структури та функції рибосом - рибонуклеопротейінових часточок, в яких відбувається процес *трансляції*— біосинтез поліпептидних ланцюгів на основі коду, що поставляється мРНК. Рибонуклеїнові кислоти цього типу є метаболічно стабільними молекулами; взаємодіючи з рибосомними білками, вони виконують функцію структурного каркасу для організації системи білкового

синтезу.

Модифікованих (мінорних) основ у складі рРНК значно менше, ніж в тРНК. Проте рибосомні РНК є також високометилованими полірибонуклеотидами, в яких метильні групи зв'язані або з азотистими основами, або з 2'-гідроксильними групами рибози.

Вторинна структура рРНК представлена значною кількістю коротких двоспіральних ділянок, що мають вигляд "шпильок" або паличок.

Крім зазначених класів РНК, в ядрах клітин ссавців містяться рибонуклеїнові кислоти різної молекулярної маси, так звані *гетерогенні ядерні РНК (гяРНК)*. Молекулярна маса гяРНК може бути значною і перевищувати 104 кДа. ГяРНК являють собою продукти транскрипції генів, що не зазнали посттранскрипційної модифікації - процесингу.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (12) термінів: компліментарність, локус, матричний ланцюг, нуклеозид, нуклеотид, олігонуклеотид, репарація ДНК, реплікатор, рибонуклеаза, іРНК, рРНК, тРНК .

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Будова, властивості та функції нуклеотидів.
2. Первинна структура нуклеїнових кислот; полярність полінуклеотидів.
3. Будова, властивості та функції ДНК.
4. Будова, властивості та функції РНК.

3. Заповніть таблицю за наведеною нище формою

Порівняльна характеристика ДНК та РНК

Ознаки	ДНК	РНК
Місцезнаходження в клітині		
Місцезнаходження в ядрі		
Будова макромолекули		
Склад нуклеотида		
Типи нуклеотидів, властивості та функції		

4. Розрахуйте задачі:

Задача № 1. Довжина ділянки молекули ДНК складає 850 нм. Визначте кількість нуклеотидів в одному ланцюгу ДНК.

Задача № 2. Визначте кількість водневих зв'язків у фрагменті ДНК – Г-Т-Ц-А-Т-Г-Г-А-Т-А-Г-Т-Ц-Ц-Т-А-Т.

Задача №3. Фрагмент кодуючого ланцюга ДНК має наступну послідовність: А-Г-А-Ц-Т-Т-А-Г-Ц-Т-Ц-А-Г-Т-Ц. Відновіть другий ланцюг ДНК і визначте послідовність нуклеотидів іРНК, яка транскрибована з даного фрагменту.

Задача № 4. Фрагмент іРНК має наступну послідовність нуклеотидів У-Г-А-Г-Ц-А-У-Ц-А-Г-А-Ц-У-Г-У. Визначте послідовність нуклеотидів фрагмента молекули ДНК, з якої транскрибований даний фрагмент іРНК.

Задача № 5. Правий ланцюг ДНК має наступну структуру А-Т-Г-Г-Т-Ц-А-Т-Ц. Визначте структуру іРНК, транскрипція якої відбулася з лівого ланцюга ДНК.

Задача № 6. В молекулі ДНК знайдено 880 гуанілових нуклеотидів, які складають 22% від загальної кількості нуклеотидів у цій ДНК. Визначте: а) скільки інших нуклеотидів у цій ДНК? б) яка довжина цього фрагменту?

Задача № 7. Фрагмент молекули ДНК складається із 1000 нуклеотидів, із них аденілових нуклеотидів 23%. Визначте кількість гуанілових, тиміділових та цитиділових нуклеотидів.

Задача № 8. До складу іРНК входять нуклеотиди: аденіну – 28%, гуаніну – 16%, урацилу – 24%. Визначте % склад нуклеотидів у дволанцюговій молекулі ДНК, інформація з якої «переписана» на іРНК.

Задача № 9. Ділянка молекули ДНК (1 ланцюг) містить 150 нуклеотидів – аденіну, 50 нуклеотидів – тиміну, 300 нуклеотидів – цитозіну, 100 нуклеотидів – гуаніну. Визначте кількість нуклеотидів у другому ланцюзі з А, Т, Г, Ц і загальну кількість нуклеотидів з А, Т, Г, Ц у двох ланцюгах ДНК.

Задача № 10. Скільки міститься нуклеотидів аденіну, тиміну, гуаніну у фрагменті молекули ДНК, якщо в ньому знайдено 1500 нуклеотидів цитозину, що складає 30% від загальної кількості нуклеотидів в цьому фрагменті ДНК?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №6

Структура генома вірусів і фагів

Віруси – позаклітинна форма життя, яка має власний геном і здатна до відтворення тільки в клітинах живих організмів. Віріон (або вірусна частка) складається із однієї чи декілька молекул ДНК чи РНК, які містяться в білковій оболонці (капсид), іноді мають ліпідні чи вуглеводні компоненти.

Віруси розмножуються тільки після інфікування живих клітин. Різні віруси проникають в тваринні і рослинні клітини, а також бактерії (віруси бактерій називаються бактеріофагами). Віруси є внутрішньоклітинними паразитами на генетичному рівні і використовують для свого розмноження білок-синтезуючий апарат клітини-хазяїна.

Життєвий цикл вірусу починається з проникнення всередину клітини. Для цього він зв'язується зі специфічними рецепторами на її поверхні і або вводить свою нуклеїнову кислоту всередину клітини, залишаючи білки віріону на її поверхні, або проникає цілком в результаті ендоцитозу. В останньому випадку після проникнення вірусу всередину клітини відбувається його «роздягання» – звільнення геномних нуклеїнових кислот від білків оболонки. В результаті цієї процедури вірусний геном стає доступним для ферментних систем клітини, що забезпечують експресію генів вірусу. Саме після проникнення вірусної геномної нуклеїнової кислоти в клітину укладена в ній генетична інформація розшифровується генетичними системами господаря і використовується для синтезу компонентів вірусних частинок. У порівнянні з геномами інших організмів вірусний геном відносно малий і кодує лише обмежене число білків, в основному білки капсиду й один або кілька білків, що беруть участь в реплікації та експресії вірусного генома. Необхідні метаболіти та енергія поставляються клітиною-господаря.

Геном вірусів, укладений всередині віріонів, може бути представлений ДНК або РНК, останні можуть бути одно-і дволанцюговими, кільцевими і лінійними. Значення молекулярних мас ДНК вірусів знаходяться в межах $1 \cdot 10^6 - 200 \cdot 10^6$; РНК – $1 \cdot 10^6 - 15 \cdot 10^6$ дальтона.

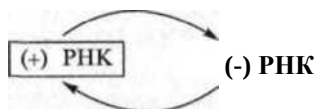
За складністю будови геному віруси широко варіюють - від фага Q_B, (РНК-вмісний вірус бактерій), що має 4 гена, до вірусу віспи (ДНК-вмісний вірус), геном якого нараховує близько 250 генів. Крім того, всі гени вірусів можуть бути укладені в одній молекулі нуклеїнової кислоти або розподілені в межах декількох молекул, які разом і складають геном такого вірусу. Наприклад, у реовірусів геном представлений двокільцевою РНК і складається з 10 молекул (або сегментів). Геноми вірусів, що містять одноланцюгову РНК, також можуть бути або цілими (ретровірус), або сегментованими (вірус грипу). Геном РНК-вмісних вірусів представлений тільки лінійними молекулами РНК.

Всі відомі ДНК-вмісні віруси хребетних мають геном, укладений в одній молекулі ДНК, лінійної або ланцюгової, одно-або дволанцюгової. У деяких вірусів, наприклад у вірусу гепатиту В, геном представлений кільцевою молекулою дволанцюгової ДНК, в обох ланцюгах якої в різних місцях виявлені одноланцюгові ділянки.

ТИПИ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ ТА МЕХАНІЗМ ЙОГО РЕПЛІКАЦІЇ У РІЗНИХ ВІРУСІВ

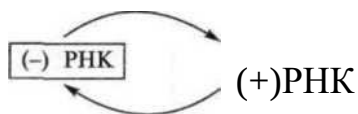
РНК-віруси (РНК→РНК). Геноми майже всіх відомих РНК-вірусів - це лінійні молекули, їх зручно розділити на 3 групи.

Перша група - це ондониткові геноми позитивної полярності, тобто нуклеотидна послідовність, відповідає мРНК. Такі геноми позначають як (+) РНК. Одониткових (+) РНК-геном характерний для фага Q_B, вірусів тютюнової мозаїки, поліомієліту, кліщового енцефаліту. Вірусні (+) РНК-геноми кодуєть кілька білків, серед яких РНК-залежна РНК-полімераза (репліказа), здатна синтезувати молекули РНК без участі ДНК. За допомогою цього ферменту синтезують спочатку (-) нитки РНК фагу, а потім при наявності особливого білку, так званого «фактора господаря», репліказа здійснює синтез (+) нитки РНК. На заключній стадії із вірусних білків, що накопичились і (+) РНК формуються віріони. Спрощена схема цього процесу така:



(в рамку заключена та форма нуклеїнової кислоти, яка присутня у віріоні)

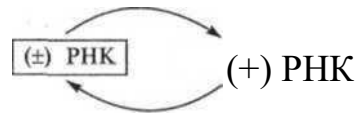
Друга група - це ондониткові геноми з негативною полярністю, тобто (-) РНК-геноми. До вірусів з негативним РНК-геномом відносяться віруси грипу, кору, сказу, жовтої карликовості картоплі та ін. Оскільки (-) РНК не може виконувати функції мРНК, для утворення «своїх» мРНК вірус заглиблює в клітину не тільки геном, але і фермент, що вміє знімати з цього генома комплементарні копії за схемою:



Цей вірусний фермент (РНК-залежна РНК-полімераза) упакована у вібріоні в зручній формі для доставки в клітину. Інфекційний процес починається з того, що вірусний фермент копіює вірусний геном, утворюючи (+) РНК, яка виступає в якості матриці для синтезу вірусних білків, в тому числі РНК-залежної РНК-полімерази, яка входить до складу віріонів.

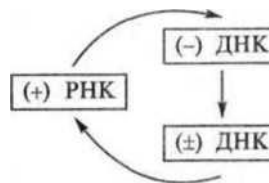
Третю групу складають двониткові геноми, (±) РНК-геноми. Відомі двониткові геноми завжди сегментовані (складаються з декількох різних молекул). Сюди відносяться реовіруси. Їх розмноження проходить за варіантом, близькому до попереднього. Разом з вірусною РНК в клітину потрапляє і вірусна РНК-залежна РНК-полімераза, яка забезпечує синтез

молекул (+) РНК. У свою чергу (+) РНК забезпечує виробництво вірусних білків на рибосомах клітини господаря і слугує матрицею для синтезу нових (-) РНК-ланцюжків вірусної РНК-полімеразою:



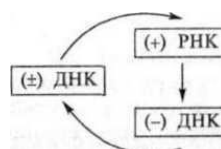
Ланцюжки (+) і (-) РНК, комплексуючись один з одним, утворюють двонитковий (±) РНК-геном, який упаковується в білкову оболонку.

РНК-вмісні віруси (РНК → ДНК → РНК). Сюди відносяться віруси, у яких цикл реплікації геному можна розбити на дві головні реакції: синтез РНК на матриці ДНК і синтез ДНК на матриці РНК. При цьому до складу вірусної частинки в якості генома може входити або РНК (ретровіруси), або ДНК (ретроїдні віруси). У цю групу входять вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) і деякі збудники злоякісних новоутворень. Вірусна частка містить дві молекули геномної одноланцюгової (+) РНК. У вірусному геномі закодований незвичайний фермент (зворотна транскриптаза, або ревертаза), який володіє властивостями як РНК-залежної, так і ДНК-залежної ДНК-полімерази. Цей фермент потрапляє в заражену клітину разом з вірусною РНК і забезпечує синтез її ДНК-копії спочатку в одноланцюговій формі [(-) ДНК], а потім в дволанцюговій [(±) ДНК]:



Вірусний геном у формі нормального дуплексу ДНК (так званої провірусної ДНК) вбудовується в хромосому клітини господаря. В результаті дволанцюгової ДНК вірус являє собою по суті додатковий набір генів клітини, який реплікується разом з ДНК хазяїна при діленні. Для утворення нових ретровірусних частинок провірусні гени (гени вірусу в хромосомах господаря) транскрибуються в ядрі клітини транскрипційним апаратом господаря в (+) РНК-транскрипти. Одні з них стають геномом нового «потомства» ретровірусів, а інші піддаються процесингу в мРНК і використовуються для трансляції білків, необхідних для складання вірусних частинок. До цієї ж групи належать онкогенні ретровіруси: вірус саркоми Рауса (птахів), вірус лейкозу мишей і т.д. Розвиток пухлини визначає один ген ретровірусу - онкоген.

ДНК-вмісні віруси. Перша група - віруси з дволанцюговою ДНК, реплікація яких здійснюється за схемою: ДНК → РНК → ДНК. Вони отримали назву *ретроїдні* віруси. Представниками цієї групи вірусів є вірус гепатиту В та вірус мозаїки цвітної капусти. Реплікація ДНК-генома цих вірусів здійснюється за участю проміжних молекул РНК:



Молекули РНК утворюються в результаті транскрипції вірусних ДНК у клітинному ядрі ферментом господаря ДНК-залежної РНК-полімеразою. Транскрибується лише одна з ниток вірусної ДНК. Синтез ДНК на РНК-матриці відбувається в результаті реакції, що каталізується зворотною транскриптазою; спочатку синтезується (-) нитка ДНК, а потім на нових (-) нитках ДНК той же фермент будує (+) нитку. У цілому загальна схема реплікації геному ретроїдних вірусів схожа на схему реплікації геному ретровірусів. Дана схожість має під собою і еволюційну основу, так як первинна структура зворотної транскриптази цих вірусів виявляє певну схожість між собою.

Друга група - віруси з дволанцюговою ДНК, реплікація яких здійснюється за схемою ДНК → ДНК. У зараженій клітині ДНК-залежна РНК-полімераза транскрибує з генома цих вірусів молекули мРНК ((+) РНК), які беруть участь у синтезі вірусних білків, а розмноження вірусного генома здійснює фермент ДНК-залежна ДНК-полімераза.

В одних випадках виробництвом як мРНК, так і ДНК займаються клітинні ферменти; в інших випадках віруси використовують власні ферменти. Буває, що ті й інші ферменти обслуговують процес реплікації і транскрипції. До цієї групи відносяться віруси герпесу, віспи та ін.

Третя група - віруси з одностанцюговою ДНК, або з негативною, або з позитивною полярністю. Потрапивши в клітину, вірусний геном спочатку перетворюється в дволанцюгову форму, це перетворення забезпечує клітинна ДНК-залежна ДНК-полімераза.

ТИПИ ВЗАЄМОДІЇ ВІРУСА З КЛІТИНОЮ-ГОСПОДАРЯ

Існують два типи взаємодії вірусу і клітини, де головною відмінністю є ступінь автономії вірусу від клітини-хазяїна. Це детально досліджено на прикладі бактеріофага λ . Коли бактеріофаг λ заражає потрібну клітину кишкової палички, він негайно реплікується і утворює кілька сотень дочірніх фагових часток, які виходять назовні у момент лізису клітини. Лізис клітинної стінки здійснює кодуєний фагом фермент лізоцим. Це так званий *літичний* шлях інфекції - він закінчується загибеллю клітини-хазяїна. У даному випадку вірус не підпорядковується клітинному контролю.

Альтернативним є *лізогенний* шлях інфекції, при якому лінійні інфікуючі молекули ДНК фага λ замикаються в кільце і включаються (інтегрують) в кільцеву хромосому клітини-хазяїна. Ця інтеграція здійснюється шляхом сайт-специфічної генетичної рекомбінації, що каталізується особливим білком фага, так званою інтегразою. Клітина, що утримує ДНК фага λ в своїй хромосомі, називається *лізогенною* клітиною, а вбудована ДНК фага λ - *профагом*. Клітини і їх хромосоми діляться, а разом з хромосомами в кожну дочірню клітину потрапляють і фагові гени. За певних обставин, а саме при впливі будь-якого пошкоджуючого зовнішнього фактору (наприклад, ультрафіолетових променів,

іонізуючого випромінювання, хімічних реагентів), активуються так звані «SOS»-функції, призначені для усунення порушень. У лізогенній клітині це призводить до відщеплення (ексцизії) профага з клітинної ДНК і початку звичайного, властивого фагу циклу розмноження, тобто відщеплений профаг вступає в літичний цикл реплікації. Інтегрований профаг, таким чином, не гине разом з пошкодженою клітиною-господаря, а у нього є шанс перейти в сусідню непошкоджену клітину кишкової палички.

У тваринних клітинах, як і у бактерій, ДНК-віруси можуть розмножуватися літичним шляхом, що призводить до загибелі клітини. Такі тваринні клітини називають *пермісивними*. Клітини, в яких розмноження вірусів блокується, називаються *непермісивними*; вірусна хромосома в таких випадках або включається в геном клітини-господаря і потім розмножується разом з ним, або утворює плазмиду – кільцеву молекулу ДНК, реплікація якої регулюється і не веде до загибелі клітини. Іноді це викликає в непермісивних клітинах певну генетичну зміну, в результаті якої починається їх неконтрольоване зростання, тобто нормальні клітини перетворюються в ракові. Відповідний ДНК-вірус називають в таких випадках пухлинним ДНК-вірусом; до них відносяться найбільш вивчені представники паповавірусів - SV40 і вірус полііоми.

У ретровірусів (РНК-вмісних вірусах: вірус саркоми Рауса, вірус СНІДу і т.д.) ревертаза перетворює їх РНК у форму ДНК, яка вбудовується в клітинну хромосому. В результаті транскрипції інтегрованої вірусної ДНК клітинної ДНК-залежної РНК-полімерази утворюється велика кількість молекул вірусної РНК, ідентичних вихідному інфікуючому геному. Завершується процес трансляцією цих молекул РНК.

Ретровіруси - це велика група вірусів, представники якої розрізняються як за біологічними властивостями (наприклад, за здатністю викликати злоякісні пухлини), так і за морфологією; існують і помітні варіації в структурі їх геномів. Загальні риси цих геномів наступні:

1) вірусна РНК - одноланцюгова молекула довжиною до десяти тисяч нуклеотидів, являє собою (+) нитку, молекули РНК кепіровані на 5'-кінці і поліаденільовані на 3'-кінці;

2) в молекулах РНК є прямий кінцевий повтор (R) довжиною кілька десятків нуклеотидів (на 3'-кінці він передує полі (A)-тракту);

3) у вірусної РНК записана інформація для синтезу трьох груп вірус-специфічних білків: структурних білків серцевини віріону (Сag-білків), ферментативних білків, які беруть участь у зворотній транскрипції вірусного генома і в інтеграції вірус-специфічної ДНК в клітинну хромосому (продуктів гена *pol*) і білків, що входять до складу зовнішньої ліпопротеїнової оболонки віріона (Env-білків). У деяких ретровірусів є додаткові гени;

4) вірусна частка містить дві молекули геномної РНК; таким чином, рідкісною (якщо не унікальною) особливістю ретровірусів є диплоїдний набір геному. Фундаментальні дослідження ретровірусів, що викликають пухлини у птахів і ссавців, вказали шлях до вирішення клінічних проблем, пов'язаних з раковими захворюваннями людини і синдромом набутого імунного дефіциту -

СНІДом. СНІД викликає один з ретровірусів ВІЛ (вірус імунодефіциту людини), який інфікує макрофаги і один з типів Т-лімфоцитів, виводячи з ладу імунну систему хворого. Інші лімфотропні ретровіруси людини також інфікують Т-клітини, але викликають лейкози. Вірусна частка має сферичну форму, її діаметр близько 100 нм. Оболонка часточки утворена подвійним шаром ліпідів, пронизаних глікопротеїнами. Ліпідна мембрана походить із зовнішньої мембрани клітини-хазяїна. У кожній глікопротеїновій молекулі є дві субодиниці: gp41, яка пронизує мембрану, і gp 120, що знаходиться зовні. У середині оболонки є серцевина вірусу, утворена білками p17 та p24. У серцевині вірусної частинки знаходяться вірусна РНК і молекули зворотної транскриптази. В даний час розшифрована структура геному ВІЛ-1. Білки, закодовані в геномі ВІЛ, представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Білки, закодовані в геномі ВІЛ-1

Ген Білок		Функція
Білки віріона		
	MA(p17)	Матричний білок; зв'язок з мембраною, зборка вірусу
<i>gag</i>	CA (p24)	Білок капсида; зборка вірусу
	NC (p9)	Білок нуклеокапсида; РНК-зв'язування; зборка вірусу
	PR(pll)	Протеаза; дозрівання вірусу
<i>pol</i>	R(p66/p51)	Зворотна транскрипта та реплікація вірусу
	IN (p32)	Інтеграза; реплікація вірусу
<i>env</i>	SU (gp 120)	Вірусний білок оболонки; зв'язування СО 4-рецептора, інфікування вірусу
	TM (gp41)	Трансмембранний глікопротеїн оболонки; і інфікованість вірусу
Допоміжні білки		
<i>vpr</i>	Vpr	Вірусний білок R: переміщення передінтеграційного комплексу в ядро
<i>vif</i>	Vif	Фактор вірусної інфекційності
<i>vpu</i>	Vpu	Вірусний білок і дозрівання вірусної оболонки та вихід вірусу
Регуляторні білки		
<i>tat</i>	Tat	Трансактиватор; стимулює елонгацію транскрипції
<i>rev</i>	Rev	Регулятор експресії пізніх генів; стимулює появу несплайсованих мРНК в цитоплазмі
<i>nef</i>	Nef	Регулює сигнальні шляхи Т-клітин

З даних таблиці видно, що геном ВІЛ містить 9 генів, але процесинг (клітинними і вірусними ферментами) генерують 14 білкових продуктів. Ген *gag* кодує внутрішні білки віріона; вони синтезуються у вигляді поліпротеїну, з якого потім протеаза вирізає конкретні білки. Наступний кодуючий ділянку, *pol*, детермінує синтез зворотної транскриптази. Фермент поліфункціональний:

він здатний синтезувати ДНК, використовуючи в якості матриці або РНК, або ДНК; крім того, він веде себе подібно РНКазі Н (тобто руйнує ланцюг РНК, що входить до складу РНК / ДНК дуплексу) і володіє ендонуклеазною активністю. Ген *pol* кодує і інтегрази, що здійснюють включення ДНК вірусу в геном зараженої клітини. Ген *env* кодує компоненти вірусної оболонки, яка захоплює частину клітинної цитоплазматичної мембрани. У геномі ВІЛ представлені також гени допоміжних і регуляторних білків. Так, білки Tat і Rev спільно забезпечують значне збільшення синтезу вірусних білків при переході провіруса з латентної в активну форму.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (10) термінів: ампліфікація, бактеріофаг, біосинтез, вектор, віріон, віруси, геном, ДНК-полімераза, імунітет, капсид.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке вірус? Вкажіть елементи його будови.
2. Що таке бактеріофаг? Яким чином розмножуються віруси?
3. Вкажіть життєвий цикл вірусу.
4. Надайте характеристику вірусного геному.
5. Надайте характеристику першої групи РНК вірусів.
6. Надайте характеристику другої групи РНК вірусів.
7. Надайте характеристику третьої групи РНК вірусів.
8. Надайте характеристику РНК-вмісних вірусів.
9. Надайте характеристику першої групи ДНК-вмісних вірусів.
10. Надайте характеристику другої групи ДНК-вмісних вірусів.
11. Надайте характеристику третьої групи ДНК-вмісних вірусів.
12. Охарактеризуйте літичний тип взаємодії вірусу з клітиною господаря.
13. Охарактеризуйте лізогенний тип взаємодії вірусу з клітиною господаря.
14. Які клітини називаються пермісивними та непермісивними?
15. Що таке ретровіруси?
16. Вкажіть загальні риси ретровірусів.
17. Охарактеризуйте білки, що заковані в геномі ВІЛ-1.

3. Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Характеристика фагу λ »;
2. «Характеристика фагу ϕ X174»;
3. «Характеристика вірусу SV40»;
4. «Характеристика фагу M13».

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7

Структура генома прокариот

Основною рисою молекулярної організації прокариотів є відсутність в їх клітинах ядра, відгородженого ядерною мембраною від цитоплазми. Відсутність ядра є лише зовнішнім проявом особливої організації геному у прокариот. Геном прокариотів побудований дуже компактно. Кількість некодуючих послідовностей нуклеотидів мінімальна. Більшість механізмів регуляції експресії генів, що використовуються у еукаріотів, ніколи не зустрічаються у прокариот. Простота будови геному прокариотів пояснюється їх простим життєвим циклом.

СТРУКТУРА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ХРОМОСОМИ

П'ятдесят років тому всі хромосоми прокариотів вважалися лінійними. Але в 1956 р. Ф. Жакоб і Е. Вільман запропонували кільцеву модель бактеріальної хромосоми. З тих пір ця модель вважалася загальноприйнятою до появи методу прямого аналізу фізичної структури хромосом - електрофорезу в пульсуючому полі. У 1989 р. вперше цим методом була ідентифікована лінійна бактеріальна хромосома у збудника кліщового спірохетозу *Borrelia burgdorferi*. Незабаром було виявлено, що лінійна і кільцева хромосоми співіснують одночасно у *Agrobacterium tumefaciens*, а у грампозитивних бактерій роду *Streptomyces*, що володіють одним з найбільших бактеріальних геномів (8000 тис. н.п.), є одна лінійна хромосома. Лінійні хромосоми у бактерій часто співіснують з лінійними плазмідами і широко поширені в природі. Склад геномів деяких бактерій наведений в табл. 1.

Таблиця 1

Склад складних геномів бактерій		
Бактерія	Геном	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	1 лінійна хромосома; 2 плазмід	1 кільцева хромосома
<i>Bacillus cereus</i> F0836 76	1 кільцева хромосома; 1 мегаплазмід	
<i>Brucella melitensis</i>	2 кільцеві хромосоми	
<i>Leptospira interrogans</i>	1 кільцева хромосома; 1 мегаплазмід	
<i>Rhizobium meliloti</i>	1 кільцева хромосома; 2 мегаплазмід	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2 кільцеві хромосоми	
<i>Rhodococcus jaciens</i>	1 лінійна хромосома; лінійна плазмід	
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	1 лінійна хромосома	

Розмір геному у різних бактерій коливається від 580 тис. н.п. у *Mycoplasma genitalium* до 9500 тис. н.п. у *Mycobacterium tuberculosis*. Для кишкової палички *E. coli* розмір генома становить 4600 тис. н.п. (молекулярна маса близько $3 \cdot 10^9$ Да, довжина молекули близько 1,5 мм). У бактеріальних клітинах хромосома сильно компактизована. Так, кільцева молекула ДНК *E. coli* завдовжки 1,5 мм укладена в клітину, що має форму палички діаметром 1 мкм і довжиною 2 мкм.

В останні роки спостерігається прогрес у дослідженні первинної структури бактеріальних хромосом. На кінець 2001 р. була визначена повна нуклеотидна послідовність 100 прокаріотичних геномів (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика деяких бактеріальних геномів, які визначені за їх нуклеотидною послідовністю

Видова назва	Розмір генома, тис. н.п.	Кодуючі послідовності	Кількість ORF (приблизна кількість генів)	Ідентифіковано генів	Характеристика	
Mycoplasma genitalium	580	89,7	479	324	69	Викликає запалення сечостатевих шляхів Збудник пневмонії
Mycoplasma pneumoniae	817	88,7	677	333	49	
Borrelia burgdoferil	1300	93,0	863	499	58	Збудник кліщового спірохетоза (хвороба Лайма)
Helicobacter pylory	1700	91,0	1590	907	57	Викликає виразкову хворобу, гастрит
Methanococcus jannaschii	1700	-	1692	776	46	Анаероб, метаноген, T _{росту} =85 °С
Haemophilus influenzae	1800	-	1740	1015	58	Викликає отит, ГРЗ, менінгіти
Synechocystis sp.	3600	87,0	3168	1402	48	Фотосинтезуюча ціанобактерія
Bacillus subtilis	4200	87,0	4000	2320	58	Автотроф
Mycobacterium tuberculosis	4400	91,0	3924	1600	40	Збудник туберкульоза
Escherichia coli K-12	4600	88,6	4288	2656	62	Прототрофна ентеробактерія

Структури, пов'язані з реплікацією. Повна нуклеотидна послідовність бактеріальної хромосоми дозволяє визначити структури генома, пов'язані з його функціонуванням, тобто з процесами реплікації, транскрипції, трансляції, регуляції і т.д. Реплікація бактеріальної хромосоми починається в точці *ori* C (*origines*) і продовжується в обох напрямках до ділянки термінації реплікації *ter* C (*terminus*). У більшості бактерій ділянки *ori* C і *ter* C ділять кільцеву хромосому на дві майже рівні репліхори. Область початку реплікації в багатьох бактеріальних геномах має консервативну структуру. Подібні структури знайдені майже у всіх секвенованих бактеріальних геномах. Для лінійних хромосом точка *ori* C визначається рівно посередині її. Напрямок транскрипції більшості генів бактерій з високою швидкістю росту збігається з напрямком реплікації. Структура області ініціації реплікації ДНК архебактерій невідома. Відсутність асиметрії GC в геномі архей вказує на наявність множинних ділянок ініціації реплікації.

Відкриття рамки зчитування та визначення функцій білку. Відкрита рамка зчитування (англ. open reading frame, ORF) складається з ряду триплетів, що кодують амінокислоти; не містить якихось термінуючих кодонів; потенційно може транлюватися в білок. У встановлену нуклеотидну послідовність генома прокаріот за допомогою комп'ютерних програм виявлені відкриті рамки зчитування. Середній розмір їх в прокаріотичних геномах відповідає приблизно 300 амінокислотним залишкам. Зіставлення складу ORF за функціями (також за допомогою комп'ютерних програм) дозволяє ідентифікувати компоненти геному, загальні для всіх організмів, загальні для даної групи видів та унікальні, специфічні тільки для даного організму. Функціональна класифікація генів і генних продуктів є основою для порівняння геномів і виявлення подібності та відмінності їх метаболізму. В якості модельного об'єкту використаний геном *E. coli*. Всі білки і кодуючі їх гени класифіковані на три функціональні групи: енергообмін, інформація, комунікація (внутрішньо-і позаклітинна). Розподіл функцій генів *E. coli*, виявлених за йодною нуклеотидною послідовністю генома, представлено на рис. 1. Серед 4288 ORF *E. coli* не виявлені функції у 40% ORF. Приблизно така ж частина генів з невідомою функцією відмічена і в інших прокаріотичних геномах.



Рис. 1 Функціональна характеристика генів *E. coli*, які виявлені за повною нуклеотидною послідовністю її генома

Мінімальний розмір генома прокаріот. На підставі аналізу первинної структури прокаріотичних геномів було складено перелік генів, абсолютно необхідних для існування вільно живучих клітин. Цей перелік генів одержав назву мінімальний набір генів. Він кодує 256 білків і включає наступні життєво важливі генетичні системи мікроорганізмів: майже повний набір генів системи реплікації; гени рудиментарної системи репарації та рекомбінації; гени апарату транскрипції, в якій майже повністю відсутні гени регуляції транскрипції; великий набір генів, що кодують білки, гомологічні шаперонів; гени, які контролюють анаеробний метаболізм, включаючи гени гліколізу і фосфорилування субстратів; гени біосинтезу ліпідів; гени системи транспорту білків; гени, що кодують ферменти, що використовують складні кофактори; набір генів, які забезпечує транспорт метаболітів; повний набір генів утилізації нуклеотидів *de novo* і гени їх біосинтезу (табл. 3). Якщо ж з генома прокаріотів організму відняти консервативний мінімальний набір генів для

мікроорганізмів, що живуть в схожому середовищі, то можна отримати ті гени, які визначають специфічні фенотипічні характеристики, що складають унікальність організму.

Таблиця 3

Функції білків, що відповідають мінімальному набору із 256 генів

Функція	Кількість білків
Перетворення енергії	28
Транспорт і метаболізм амінокислот	11
Транспорт і метаболізм нуклеотидів	20
Транспорт і метаболізм вуглеводів	5
Метаболізм кофакторів	8
Метаболізм ліпідів	6
Трансляція і біогенез рибосом	94
Реплікація, транскрипція, рекомбінація, рапарація	35
Структурна функція (білки зовнішньої мембрани)	7
Секреція і адгезія	5
Шаперони	13
Транспорт неорганічних іонів	4
Передбачувана гіпотетична функція	15
Невідома функція	4

Екологічна специфічність на рівні генома. Адаптація до певних умов існування проявляється як у зміні загальних характеристик геному (ГЦ-склад, суперспіралізації ДНК), так і в наявності генів, продукти яких забезпечують пристосування мікроорганізму до тих чи інших умов. Показовим у цьому відношенні геном хелікобактерії, що мешкає в шлунку людини і викликає виразкову хворобу. Хелікобактерії здатні до перебування в кислому середовищі, так як встановлюють позитивний внутрішньомембранний потенціал при низьких рН і модифікують мікросередовище за допомогою уреаз. Білки *H. pylori* містять удвічі більше основних амінокислотних залишків аргініну і лізину, ніж білки *E. coli*. З паразитизмом пов'язана наявність у *H. pylori* не менше п'яти різних систем адгезії для прикріплення до епітеліальних клітин шлунка. Несподіваним є наявність в геномі *H. pylori* 14 генів (більше 1% геному), що відносяться до системи рестрикції. Ймовірно, ця система, крім розщеплення чужорідної ДНК, має іншу, невідому поки біологічну функцію. Відсутність певних генів також вказує на особливості метаболізму, пов'язані з умовами життя мікроба. Якщо організм забезпечений ресурсами за рахунок їх адсорбції, то механізми синтезу (а значить, і гени) можуть зникнути.

СТРУКТУРА ПРОКАРІОТИЧНИХ ГЕНІВ

Ген - одиниця спадкової інформації, що займає певне положення в геномі або хромосомі і контролює виконання певної функції в організмі. За результатами дослідження прокаріот, головним чином *E. coli*, ген складається з

двох основних елементів: регуляторної частини або власне кодуючої частини. Регуляторна частина гена забезпечує перші етапи реалізації генетичної інформації, укладеної в структурній частині гена; структурна частина гена містить інформацію про структуру кодованого даним геном поліпептиду. Кількість некодуючих послідовностей в структурній частині гена у прокаріотів мінімальна. 5'-кінець прокаріотів гена має характерну організацію регуляторних елементів, особливо на відстані 50 - 70 н.п. від точки ініціації транскрипції. Ця ділянка гена називається промотором. Він важливий для транскрипції гена, але сам в РНК не транскрибується. Протилежний 3'-кінець - термінаторна область, необхідна для термінації транскрипції. У РНК він також не транскрибується. Транскрипція починається зі стартової точки (+1). Промотор має дві консервативні послідовності: одна складається з 6 або 7 пар основ і розташована на відстані 10 основ від стартової точки; її позначають як -10-послідовність, або бокс Прібнова, - на честь її першовідкривача. Друга послідовність, довжина якої дорівнює зазвичай 9 нуклеотидам, розташована на відстані 35 основ від сайту ініціації. Ця 35-послідовність бере участь у зв'язуванні РНК-полімерази; в боксі Прібнова РНК-полімераза починає локальне розкручування спіралі і створює умови для ініціації синтезу РНК. Послідовності ДНК, які є сигналами зупинки транскрипції, знаходяться на 3'-кінці гена і називаються транскрипційними термінаторами. Вони містять послідовності, які в транскрибуємої РНК формують структуру шпильки. Послідовність основ у цьому місці сприяє утворенню стабільних пар G-C за рахунок водневих зв'язків. Слідом за шпильковою структурою в транскрипт РНК знаходиться декілька залишків U (відповідно в гені послідовність A_{5_6}), що дають слабе зв'язування РНК з ДНК. Це і полегшує термінацію транскрипції. Ділянка ДНК між промотором і термінатором називається одиницею транскрипції. Послідовності, що кодують білки, бувають звичайно фланковані нетранслюємі сегменти (їх позначають 5'-НТП і 3'-НТП). Гени РНК перемежуються спейсерними (від англ. Spacer - розпірка) послідовностями, які вирізаються в ході процесингу рРНК і тРНК. Число генів, виявлене в результаті розшифровки нуклеотидної послідовності геномів деяких прокаріотів, див. у табл. 3.

Оперонна організація геномів прокаріотів. У *E. coli* гени, що кодують білки одного і того ж метаболічного шляху, або визначають - близькоспоріднені функції, часто бувають зчеплені. Вони транскрибуються з промотора, що знаходиться на 5'-кінці такої групи генів (кластера), у вигляді єдиної молекули РНК, так званої поліцистронним (або полігенним) транскриптом. Група координовано експресованих генів називається опероном. Три гени, що кодують ферменти, відповідальні за метаболізм галактози у *E. coli*, організовані в оперон з промотором (Р) і прилеглим до нього регуляторним сегментом-оператором (О) на 5'-кінці транскрибуємої послідовності. При порівнянні геномів *E. coli* і *B. subtilis*, що мають близько 1000 загальних генів, зазначено, що 100 з них знаходяться у складі одних і тих же оперонів, хоча в деяких випадках порядок генів у опероні змінений (арабінозний оперон ara ABD у *B. subtilis* і ara BAD у *E. coli*).

Гени, що кодують кілька споріднених функцій, не завжди утворюють єдиний оперон. Так, гени, що кодують рибосомні білки, організовані під множинні оперони, до складу яких іноді входять гени, що кодують інші білки, що беруть участь у транскрипції чи трансляції. Як правило, окремі оперона, що кодують споріднені функції, мають однакові або подібні регуляторні послідовності і тому реагують на певний регуляторний сигнал подібним чином. Збереження генів у складі одного оперона дає певні переваги: по-перше, забезпечує координовану експресію генів, по-друге, таке розташування генів важливе для їх розповсюдження шляхом горизонтального переносу. Горизонтальний перенос генів вносить свій внесок в еволюцію прокаріотичних геномів. Показано, що він відбувається як між спорідненими, так і між неспорідненими бактеріями. Гени, що з'явилися в даному геномі в результаті горизонтального переносу, називають ксенологами. Відзначений горизонтальний перенос генів між еукаріотів та прокаріотів: найбільше число генів еукаріотичного типу (близько 30) виявлено в геномі хламідії.

БАКТЕРІАЛЬНІ ПЛАЗМІДИ

Крім хромосоми у більшості бактерій існують інші здатні до автономної реплікації структури - **плазмід**и. Це дволанцюгові кільцеві ДНК розміром від 0,1 до 5% розміру хромосоми, що несуть гени, необов'язкові для клітини-господаря, або гени, необхідні лише в певному середовищі. Саме такі позахромосомні елементи і містять гени, які надають клітинам спадкову стійкість до одного або декількох антибіотиків. Вони отримали назву факторів резистентності, або R-факторів. Інші плазмід

и визначають хвороботворність патогенних бактерій, наприклад патогенних штамів *E. coli*, збудників чуми і правця. Треті - визначають здатність ґрунтових бактерій використовувати незвичайні джерела вуглецю, наприклад вуглеводні нафти. Існують різні види класифікації плазмід, але найчастіше основу класифікації складає наявність в плазмідах певних модульних сегментів ДНК. Для своєї реплікації плазмід

и використовують реплікативний апарат клітини-господаря, однак реплікація плазмід відбувається незалежно від хромосоми. Кожна плазмід

а є самостійним репліконом, сама контролює власну реплікацію. Для цієї мети вона повинна мати один або кілька реплікативних модулів (область ініціації реплікації), які і дозволяють їй автономно реплікуватись. В одному з класів плазмід (F-плазмід) реплікація і сегрегація регулюються узгоджено з реплікацією бактеріального генома, і в кожній клітині міститься одна або дві копії плазмід

и. Про такому типі реплікації говорять як про реплікацію зі суворим контролем. Другий тип реплікаційного модуля вільний від такого контролю, що призводить до існування в клітині багатьох копій плазмід (10-30 копій). Подібний тип реплікації отримав назву реплікації з ослабленим контролем. Наявність інших модулів, не пов'язаних з реплікацією, не є обов'язковим для кожної визначеної плазмід

и. Статеві чинники, тобто кон'югативні (або самотрансмисивні) плазмід

и, подібно F-фактору мають модулі, що містять гени і регуляторні області (гени *tra*), необхідні для перенесення плазмід

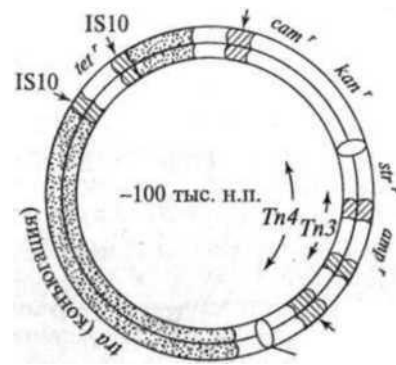
и з однієї клітини в іншу. Трансмисивні плазмід

и кодують спеціальні ворсинки, статеві пили, які

з'являються на поверхні клітин, що містять плазмід, і здатні специфічно зв'язуватися з поверхнею бесплазмідних клітин. Подальше скорочення пилу притягує клітини один до одного, і між ними утворюється місток, через який плазмідна ДНК може передаватися в нову клітину. Здатність передаватися в нові клітини - корисна для плазмід якість, але лише великі плазмід можуть кодувати складну систему поверхневих змін клітини, що забезпечує кон'югацію. Некон'югативні плазмід (втратили модуль кон'югації) не здатні до самотрансмисивності, але здатні до передачі в присутності трансмісивних плазмід, використовуючи їхній апарат кон'югації. Такі плазмід називають **мобілізуючими**. Модулі іншого типу містять гени, білкові продукти яких (наприклад, β -лактамаза та ін) інактивують антибіотики. Плазмід, що несуть такі модулі, часто називають R-плазмід (від англ. Resistance - стійкість). Одна плазмід забезпечує стійкість до декількох антибіотиків, при цьому всі або декілька генів резистентності різного типу можуть бути згруповані в одному модулі. Є ще один тип модулів, що зустрічається в плазмідах: *Col*-модулі. Вони кодують один з декількох білків-коліцини (антибактеріальних агентів, які продукуються бактеріями). Коліцини розрізняються за структурою і способом дії. Плазмід, що кодують певний коліцини, часто містять гени, що забезпечують імунну до цього коліцини, страхуючи клітину-продуцент від пошкоджень, що викликаються її власним засобом захисту. Деякі плазмід містять також модулі, що кодують системи рестрикції-модифікації. Прикладом такого модуля є система Eco RI.

Типова плазмід. Модульну будову типових R-плазмід схематично представлено на рис. 2. Близько 50% послідовностей з приблизно 100 тис. н.п. цих плазмід гомологічні одному з ділянок F-плазмід. Ця область включає гени, необхідні для кон'югації (*tra*) і реплікації зі суворим контролем. У F-подібної області знаходиться додатковий модуль, що містить гени, які контролюють стійкість до тетрацикліну. Друга половина R-плазмід містить модулі, відповідальні за резистентність до антибіотиків (стрептоміцину, сульфаніламідів, хлорамфеніколу і канаміцину). Плазмід, виділені незалежно і навіть в різних частинах світу, часто містять близькоспоріднені модулі (одні й ті ж гени резистентності до антибіотиків). На підставі цих даних виникло уявлення про те, що між геномами відбувається обмін деякими генетичними модулями у вигляді інтактних сегментів ДНК. Швидке поширення генів резистентності до антибіотиків пояснюється саме обміном модулями між плазмідами. Ці та інші дані, отримані при вивченні генетики бактерій, привели до ідентифікації рухомих елементів, названих інерційними послідовностями (IS) і транспозони, які здатні переміщатися не тільки між плазмідами, але і між плазмідними і клітинними геномами, а також в межах самого бактеріального генома.

Світлий овал — область
початку реплікації (*ori*).
Гени резистентності до
антибіотиків: тетрацикліну —
tet^r, хлорамфеніколу — *cam^r*,
канаміцину — *kan^r*,
стрептомицину — *str^r*,
ампіциліну — *amp^r*. Точками
виділені сегменти, необхідні
для кон'югації (*tra*),
штриховкою — мобільні
елементи.



IS1 Початок реплікації

Рис. 2. Структура типової кон'югативної R-плазмід.

IS-ЕЛЕМЕНТИ І ТРАНСПОЗОНИ БАКТЕРІЙ

IS-елементи (від англ. Insertion sequences - послідовності-вставки) - це сегменти ДНК, здатні як ціле переміщатися з однієї ділянки локалізації в іншу. IS-елементи містять лише ті гени, які необхідні для їх власного переміщення - транспозиції. Крім того, IS-елементи мають особливу послідовність на кінцях, як правило, інвертовані повтори. При вбудовуванні в нову послідовність ДНК IS-елементи викликають невелику дуплікацію: дуплікована ділянка з двох сторін фланкує вбудований IS-елемент.

Транспозонами (Tn-елементами) називають сегменти ДНК, що володіють тими ж властивостями, що і IS-елементи, але містять також гени, які не мають безпосереднього відношення до транспозиції (гени стійкості до антибіотиків, гени токсинів або гени додаткових ферментів клітинного метаболізму). Загалом, для транспозонів характерні ті ж гени, які існують в плазмідах. Більш того, нерідко присутність у складі плазмідного ДНК відповідного транспозону. Він може бути влаштований так само, як IS-елемент, але з додатковим геном. Однак важливо відзначити, що часто два IS-елемента, що опинилися поблизу один від одного, здатні переміщатися разом, одночасно переносячи укладений між ними сегмент ДНК. Таким чином, транспозон можуть утворити два розташованих поруч IS-елемента. Транспозони і IS-елементи відповідальні за цілий ряд генетичних явищ у бактерій. Вбудовування мобільного елемента в який-небудь ген може призвести до його інактивації. Крім того, деякі IS-елементи і транспозони викликають генетичну нестабільність поблизу від місця своєї локалізації: в околицях елемента помітно підвищується частота делецій і інверсій, причому одна із меж перебудови завжди збігається з одним з кінців IS-елемента, автономного або в складі транспозона. Мобільні елементи здатні також викликати транслокації.

Механізми переміщення мобільних елементів бактерій. Існує два типи транспозицій з одного генома в інший. В ході транспозиції першого типу, так званої коінтеграційної, донорний геном, який несе IS-елемент або транспозон,

зливається з реципієнтною молекулою ДНК. Реплікація за рахунок клітинного реплікативного апарату призводить до подвоєння мобільного елемента. Утворюється проміжний коінтеграт з дуплікацією мобільного елемента. Щоб відбувся поділ коінтеграта на вихідні репліконів (один з яких придбав би нову копію мобільного елемента), необхідна дію продукту гена *tnpR*, так званною резолвазою (від англ. Resolution - дозвіл), яка розрізає коінтеграт на вихідні реплікатори (рис. 3).

Транспозиція другого типу називається простим вбудовуванням. Мобільний елемент переміщається в новий геномний локус, при цьому ніяких інших перебудов, крім дуплікації сайту-мішені, не відбувається. Цей вид транспозиції іноді називають консервативним (або нереплікативним). Для завершення процесу потрібний лише обмежений репаративний синтез ДНК.

Генетична мінливість бактерій. Мобільні елементи викликають генетичну нестабільність поблизу від ділянки своєї локалізації, особливо в процесі реплікативного механізму транспозицій. В залежності від того, як внесені розриви в ДНК-мішень, вийде або делеція, або інверсія генетичного матеріалу між місцем розташування транспозона і мішенню його переміщення.

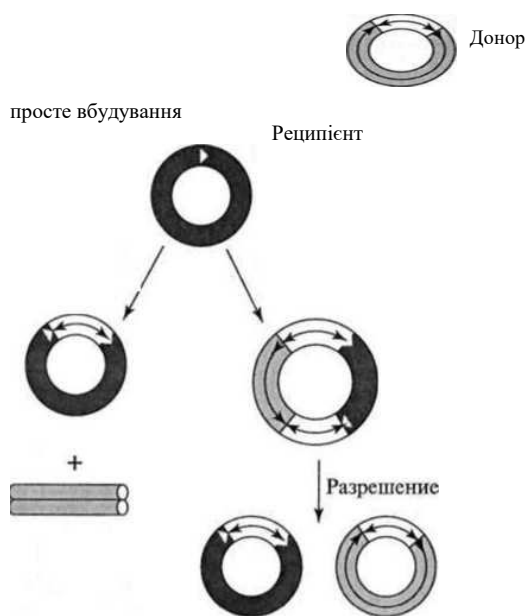


Рис. 3. Типи вбудовування мобільного елемента у новий геном

У зв'язку з цим цікаво відзначити, що хромосоми споріднених видів бактерій відрізняються один від одного численними перебудовами саме цього типу. По-видимому, мобільні елементи зіграли істотну роль в дивергенції і видоутворенні бактерій. Вбудовування IS-елементів поблизу від мовчазного гена може призводити до його активації за рахунок транскрипції з промотора IS-елемента, тобто змінюється регуляція бактеріального гена. Дуже важливо, що мобільні елементи служать рухомими ділянками гомології, гомологічна рекомбінація між якими може призводити до дуплікації генів (рис. 4).

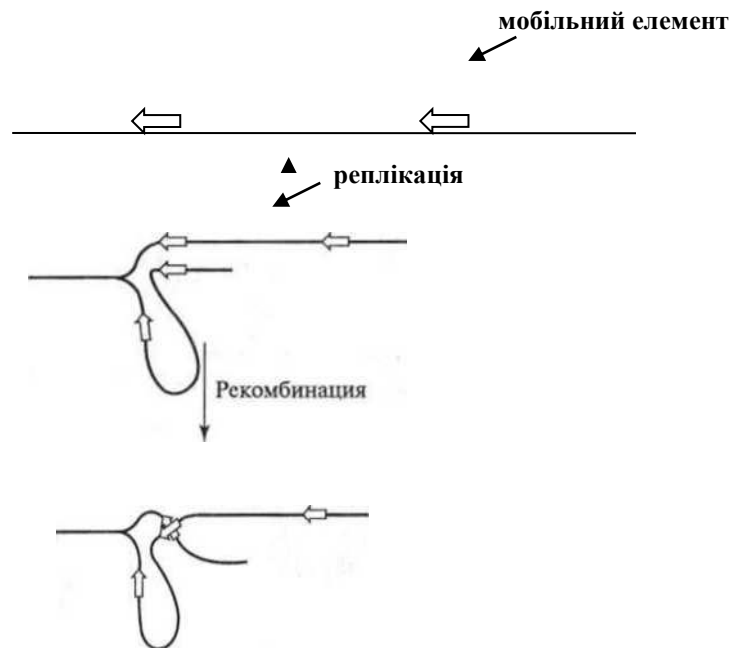


Рис. 4. Механізм вбудування мобільного елемента у новий геном

Вважається, що дуплікація - один з основних шляхів еволюційного виникнення нових функцій. Дійсно, «зайва» копія гена виходить з-під тиску природного добору і отримує можливість накопичувати зміни. Найчастіше це призводить до втрати якої б то не було функції, але іноді може вийти ген з новими функціями. Не можна забувати і той факт, що клітина може отримати селективну перевагу за рахунок придбання у складі транспозона гена, який сам по собі здатний виявитися вигідним для бактерій в певних умовах. Дійсно, на транспозонах «подорожуються» гени стійкості до різних бактеріальних отрут, у тому числі до важких металів і антибіотиків, гени додаткових метаболічних шляхів, що дозволяють використовувати незвичайне джерело вуглецю, нарешті, гени деяких токсинів, що роблять бактерії патогенними і дозволяють їм тим самим істотно змінити спосіб життя. Сказане рівною мірою відноситься і до плазмід, оскільки більшість корисних для клітини-господаря плазмідних генів перебуває у складі транспозонів.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (10) термінів: енхансер, ефектор, інверсія, індукція профага, інтеграза, кон'югативні плазміди, кон'югація, плазміда, профаг, сайт.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Охарактеризуйте структуру бактеріальних хромосом. Для цього використовуйте дані таблиці 1.
2. Охарактеризуйте структури, пов'язані з реплікацією.
3. Рамка зчитування геному прокаріот.
4. Функції білків геному прокаріот.
5. Охарактеризуйте мінімальний набір генів прокаріот.

6. Екологічна специфічність прокаріот на рівні геному.
7. Охарактеризуйте структуру прокаріотів генів.
8. Охарактеризуйте організацію геномів прокаріотів.
9. Бактеріальні плазміди, їх характеристика.
10. Типова плазміда, її характеристика.
11. IS-елементи і транспозони бактерій.
12. Механізми переміщення мобільних елементів бактерій.
13. Охарактеризуйте генетичну мінливість бактерій.

3. Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Ферменти генної інженерії»;
2. «Методи визначення нуклеотидної послідовності ДНК»;
3. «Методи конструювання рекомбінантних ДНК».

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №8

Структура генома еукаріот

Кількісні особливості геному еукаріот. Головна кількісна особливість генетичного матеріалу еукаріот - наявність надлишкової ДНК. Цей факт легко виявляється при аналізі відношення числа генів до кількості ДНК в геномі бактерій та ссавців. Якщо середній розмір гена бактерій 1500 пар нуклеотидів (п.н.), а довжина кільцевої молекули ДНК хромосоми *E. coli* та *B. subtilis* становить понад 1 мм, то в такій хромосомі можуть розміститися близько 3 тисяч генів. Приблизно таке число генів було експериментально визначено у бактерій за числом типів іРНК. Якщо це число помножити на середній розмір гена, то вийде, що близько 95% генома бактерій складається з кодуєчих (генних) послідовностей. Решта 5%, очевидно, зайняті регуляторними елементами. Інша картина спостерігається у еукаріотичних організмів. Наприклад, у людини налічують приблизно 50 тисяч генів (мається на увазі тільки сумарна довжина кодуєчих ділянок ДНК - екзонів). У той же час розмір генома людини 3×10^9 (три мільярди) п.н. Це означає, що кодуєча частина його геному складає всього 15 ... 20% від тотальної ДНК. Існує значне число видів, геном яких у десятки разів більший генома людини, наприклад деякі риби, хвостаті амфібії. Надлишкова ДНК характерна для всіх еукаріотів. У цьому зв'язку необхідно підкреслити неоднозначність термінів генотип і геном. Під генотипом слід розуміти сукупність генів, що мають фенотипічний прояв, тоді як поняття генома позначає кількість ДНК, що знаходиться в гаплоїдному наборі хромосом даного виду.

Нуклеотидні послідовності в геномі еукаріотів. В кінці 60-х років роботами американських вчених Р. Бріттена, Е. Девідсона та інших була відкрита фундаментальна особливість молекулярної структури геному еукаріот - нуклеотидні послідовності різного ступеня повторюваності. Це відкриття було зроблене за допомогою молекулярно-біологічного методу вивчення кінетики ренатурації денатурованої ДНК. Розрізняють такі фракції в геномі еукаріотів.

1. Унікальні послідовності, представлені в одному екземплярі. Як правило, це цистрони - структурні гени, що кодуєть білки.

2. Низькочастотні повтори - послідовності, що повторюються десятки разів.

3. Проміжні, або середньочастотні, повтори - послідовності, що повторюються сотні і тисячі разів. До них відносяться гени рРНК (у людини 200 на гаплоїдний набір, у миші - 100, у кішки - 1000, у риб і квіткових рослин - тисячі), тРНК, гени рибосомних білків і білків-гістонів.

4. Високочастотні повтори, число яких досягає 10 мільйонів (на геном). Це короткі (~ 10 пн) некодуєчі послідовності, які входять до складу пріцентромерного гетерохроматину.

ДНК мишей на 70% складається з унікальних послідовностей, на 20% - з низькочастотних і середньочастотних повторів, на 10% - з високочастотних. Повтори утворюють так звані сімейства, під якими розуміють сукупність послідовностей, повністю або здебільшого гомологічних один одному. Нерідко

через істотні відмінності у нуклеотидному складі високочастотних повторів і решті ДНК. Перші утворюються при центрифугуванні в градієнті щільності хлористого цезію так звані сателітні піки, які мають більшу або меншу плавучу щільність, ніж решта ДНК. Ця фракція генома представлена невеликим (10 ... 15) числом сімейств коротких (5 ... 12 п.н.) повторів, що утворюють протяжні блоки. У середині блоків групи повторів окремих сімейств можуть чергуватися один з одним, так що сателітна ДНК має як би клаптикову структуру. Гібридизація фракцій високочастотних послідовностей з ДНК безпосередньо на препаратах хромосом дозволила встановити, що ця фракція генома локалізована в районах конститутивного гетерохроматину, найчастіше пріцентромерного або теломерного. Ще в 30-х роках було показано, що в генетичному відношенні ці райони інертні, тобто не містять генів. У дійсності такі малі послідовності, складові сателітної ДНК, не можуть кодувати нічого, крім олігопептидів. Більш того, гетерохроматичні райони не транскрибуються. Таким чином, у разі високочастотних послідовностей ДНК виявляється тотожність молекулярної організації та генетичних властивостей хромосомної ДНК еукаріот. Слід зазначити, що ця фракція у величезної більшості видів займає не більше 10% генома. Близькі види, наприклад миша і щур, мають зовсім різні високочастотні послідовності, у пацюка їх нуклеотидний склад не відрізняється від основної ДНК, тоді як геном миші містить чіткий АТ-багатий сателіт. Це означає, що високочастотна ДНК здатна до швидких змін в ході видоутворення. Інші 90% геному еукаріот, його еухроматична частина, побудована за принципом чергування (інтерсперсії) унікальних і повторюваних послідовностей. Умовно виділяють два основних типи інтерсперсії, що отримали назви з тих видів, у яких вони вперше були описані: інтерсперсія типу «ксенопус» (виявлена жаби *Xenopus laevis*) і типу «дрозофіла» (вперше описана у плодової мушки *D. melanogaster*). Приблизно в 50% геному *Xenopus laevis* унікальні послідовності з 800 ... 1200 п.н. чергуються з повторюваними, середній розмір яких 300 п.н. В решті частини геномів типу «ксенопус» відстані між сусідніми повторами значно перевищують 1 ... 2 п.н. Структура геному типу «ксенопус» широко поширена, особливо серед тварин. Ссавці і людина також відносяться до цього типу організації геному. Особливість геному людини та інших приматів складають інтерсперсні високочастотні повтори довжиною близько 300 п.н. У людини ці повтори містять сайт, що розрізується ферментом рестрикції *Alu* I. Число *Alu*-подібних повторів в геномі людини досягає 5×10^5 , а за деякими даними, навіть 10^6 . *Alu*-подібні послідовності приматів являють собою часткові дуплікації (подвоєння) послідовності *B1* в геномі гризунів, вперше описаної Г. П. Георгієвою і його співробітниками. У *D. melanogaster* параметри інтерсперсії різко відрізняються від видів з типом геному «ксенопус»: повторювані послідовності довжиною 5600 п.н. чергуються з унікальними, довжина яких не менше 13000 п.н. Цікаво відзначити, що у домашньої мухи геном влаштований за типом «ксенопус». Цей факт прямо вказує на те, що в ході еволюції можливі дуже швидкі перетворення характеру чергування послідовностей і в еухроматичній частині геному. Птахи по параметрам інтерсперсії займають проміжне положення між

типом «ксенопус» і типом «дрозофіла». Як показують результати досліджень останніх років, багато видів тварин і рослин по організації генома не можуть бути строго віднесені ні до того, ні до іншого типу. Так, в геномах ссавців зустрічаються довгі повтори - в кілька тисяч пар нуклеотидів, в геномах лілійних до 90% ДНК може бути представлено повторюваними послідовностями. Наприклад, геном гороху не містить унікальних послідовностей, що перевищують по довжині 300 п.н. Інша особливість повторюваних послідовностей в геномах еукаріотів - інвертовані повтори, або паліндроми. В умовах ренатурації вони практично миттєво формують дуплексні структури. По суті, паліндроми являють собою частину проміжних повторів. Однак деякі високочастотні повтори в еухроматичній частині геному, наприклад члени Alu-сімейств, можуть зустрічатися як в прямому, так і в інвертованому положенні. Іноді між інвертованими повторами вклинюються інші послідовності.

Гетерогенність ДНК еукаріот за нуклеотидним складом. У еукаріотів описані деякі особливості структури ДНК, зумовлені специфікою нуклеотидного складу окремих послідовностей. Так, зустрічаються розташовані в одному ланцюзі блоки нуклеотидів, що складаються з декількох десятків пуринів. Тоді комплементарна частина в іншому ланцюзі ДНК буде представлена піримідинами. Подібні послідовності названі поліпуріновими (поліпіримідиновими) блоками. Інший вид гетерогенності пов'язаний з нерівномірністю змісту по довжині ДНК пар аденін-тимін (АТ-пари) і гуанін-цитозин (ГЦ-пари). Так, в геномі дрозоді періодично зустрічаються послідовності довжиною приблизно в 100 п. н., які на 85% складаються з АТ-пар. Оскільки аденін пов'язаний з тиміном двома водневими зв'язками, а гуанін з цитозином - трьома, дестабілізуючі ДНК-впливи будуть легше ініціювати розплітання дуплексів ДНК з утворенням ділянок часткової денатурації в АТ-багатих областях. Тому останні розглядаються в якості сайтів ініціації елементарних генетичних процесів: реплікації, транскрипції та рекомбінації. Слід відзначити, що перераховані вище особливості молекулярної структури ДНК еукаріот не були передбачені ні класичною генетикою (за винятком, мабуть, властивостей гетерохроматину), ні моделлю подвійної спіралі Уотсона і Крику. Вони були розкриті при дослідженні структури геномів різних еукаріотичних організмів фізико-хімічними методами. Функції більшості повторюваних і унікальних послідовностей поки не визначені. Проте цілком імовірно, що сама по собі молекулярна структура ДНК еукаріот служить дзеркалом генетичної регуляції і еволюції вищих тварин і рослин.

Хроматин і компактизація хромосом. Основою генетичного апарату еукаріотів є лінійні хромосоми. В основі хромосоми лежить лінійна двоспіральна право закручена молекула ДНК, пов'язана зі специфічними білками-гістонами. Відомо 5 типів гістонів: Н1, Н2А, Н2В, Н3, Н4. У ядрах еритроцитів птахів Н1 частково заміщується на Н5. У дріжджів відсутня Н1, а у деяких видів хламідомонад гістони взагалі не виявлені. Гістони відсутні також у мезокаріот (одноклітинних організмів - динофлагеллят, ночесвіток), в сперматозоїдах деяких риб. Відсутність гістонів в перерахованих випадках

розглядається як вторинне явище. Гістони H2 - H4 еволюційно стійкі: з 102 амінокислот H4 спостерігаються відмінності лише по 1-2 амінокислотам у вищих рослин, риб і ссавців. Гістон H1 вельми варіабельний, і навіть в тканинах одного організму зустрічається 3 - 6 варіантів цього білку. Гістони H2 - H4 утворюють білкове ядро з 8 поліпептидів (кожен гістон повторюється 2 рази). Навколо цього ядра укладена ділянка ДНК довжиною 140 пн, створюючий 1,75 витка по периферії. Така структура називається нуклеосома. Окремі нуклеосоми - це дископодібні частинки діаметром близько 10 нм. Закручування ДНК навколо нуклеосоми зменшує її довжину в сім разів. Ділянки ДНК між нуклеосомою довжиною 15 ... 10 пн називаються лінкерами (зв'язками). Структура лінкерів стабілізується за допомогою гістону H1. Послідовність нуклеосом утворює або ще одну спіраль діаметром 25 ... 20 нм (соленоїд), або послідовність нуклеосомних угруповань - нуклеомерів. Ці вищі структури утворюють петлі або домени. Конденсація ДНК в структурі соленоїда додатково (до нуклеосомного рівня) зменшує її довжину в шість разів. У інтерфазних хромосомах шляхом ще одного циклу конденсації соленоїди утворюють порожнисті трубочки діаметром 200 нм, що зменшує довжину ДНК ще в 18 разів. Описана структура хромосом у еукаріотів забезпечує їх стійкість і недоступність основної маси ДНК для хімічних мутагенів. При транскрипції, тобто синтезі РНК, і реплікації відбувається деспіралізація хромосом, що забезпечує можливість контакту певних ділянок ДНК з ДНК-полімеразою або РНК-полімеразою. Певні ділянки хромосом в ядрі тісно пов'язані з ядерною мембраною. Завжди пов'язані з мембраною кінцеві (теломерні) ділянки і деякі інші (інтерстиціальні) ділянки. Такі зв'язки забезпечують певну структуру ядра і захищають хромосоми від руйнування ферментами-нуклеазами. Ю. С. Ченцовим і його співробітниками відкрита спеціальна частинка, яка забезпечує зв'язок хроматину з ядерною мембраною, яку запропоновано називати анкоросою (якірною часткою). У метафазі внаслідок подальшої конденсації виникає велика освічена дезоксинуклеопротейдом спіраль діаметром близько 600 нм. У результаті строго впорядкованої ієрархії спіралей, в основі якої лежить нуклеосома, в мітозі і мейозі хромосоми еукаріотів скоюють цикл компактизації - декомпактизації. Внаслідок цього циклу - вкорочення метафазних хромосом у порівнянні з розмірами укладеної в них молекули ДНК у 103 ... 104 разів. По-видимому, цикл компактизації-декомпактизації регулюється білками хроматину негістонового типу. Можливо, що деякі з них виконують і структурну роль, утворюючи елементи каркаса метафазних хромосом. Особливості реплікації еукаріотичних хромосом. Як і у прокаріотів, реплікація ДНК в клітинах еукаріотичних організмів здійснюється напівконсервативний, про що свідчить розподіл Н-тімідінової мітки по сестринських хроматидах у другому та наступному мітозу після інкубації клітин з радіоактивними попередниками. З'ясовано, що реплікація в еукаріот носить двонаправлений характер.

Принцип регуляції реплікації ДНК еукаріот в онтогенезі був відкритий англійським цитогенетиком Г. Келланом в 1972 р. За допомогою радіоавтографії мічених 3Н-тимідину волокон ДНК, отриманих із клітин

тварин безпосередньо на предметному склі, Келлан визначив швидкість реплікації і відстань між сусідніми центрами ініціації в S- фазі соматичних і ембріональних клітин. За першим показником між цими типами клітин великих відмінностей не спостерігалось. Число сайтів ініціації реплікації було максимальним в ранньому ембріогенезі, мінімальним у предмейотичній S-фазі і проміжним в соматичних клітинах. Ці дані в принципі були підтверджені пізніше прямим електронно-мікроскопічним аналізом. Таким чином, суть регуляції процесу реплікації в еукаріот полягає в зміні числа сайтів ініціації реплікації. Цей механізм дозволяє збільшити тривалість фази S (а, отже, всього мітотичного циклу) з 3,5 хв (на ранніх стадіях дроблення яєць дрозофіли) до десятків годин в предмейотичній S-фазі. Упаковка ДНК і гістонів в нуклеосомах відбувається у фазі S, оскільки гістони синтезуються синхронно з реплікацією ДНК.

Перемикання генів у еукаріотів. У еукаріотів оперона відсутні, і система управління активністю генів більш складна. По-перше, у еукаріотів включаються не три гена (або трохи більше), а цілі батареї генів. По-друге, регуляція активності генів відбувається не за рахунок зв'язування оператора з білком-репресором, а за рахунок спіралізації і деспіралізації хромосом. По-третє, у еукаріотів регуляція роботи генів відбувається не за принципом «так-ні», а за принципом «більше-менше». У прокаріотів регуляторні ділянки складають приблизно 5% від всієї ДНК, а в еукаріот довжина регуляторних ділянок порівняно із загальною довжиною структурних генів. Регуляторні білки в еукаріот впливають не тільки на роботу генів в одній хромосомі, але і на активність функціонально схожих генів в різних хромосомах. Наприклад, а- і b-ланцюга гемоглобіну кодуються генами, розташованими в різних хромосомах. Однак кількість а-ланцюгів дорівнює кількості b-ланцюгів. Промотори і оператори у еукаріотів можуть бути віддалені від структурних генів на значну відстань. У багатоклітинних еукаріотів в ході онтогенезу з вихідної клітини розвивається цілісний організм. На різних етапах онтогенезу в різних тканинах з різною інтенсивністю експресуються різні гени. Активність генів у еукаріотів регулюється різноманітними ендо- і екзогенними факторами, в тому числі, і гормонами. Здатність вихідної клітини реалізовувати генетичну інформацію в ході клітинних поділів і диференціювання клітин називається тотіпотентністю. У рослин тотіпотентні запліднена яйцеклітина, і майже всі соматичні клітини. У тварин тотіпотентна тільки зигота (а також деякі клітини нижчих безхребетних). Тому методи клонування тварин засновані на пересадці ядер із соматичних клітин у енуклеювану яйцеклітину (тобто яйцеклітину із вбитим ядром). Вимикання генів може бути оборотним і необоротним. У тварин існує два типи дроблення зиготи: недетермінований (диференціювання клітин на пізніх стадіях онтогенезу) і детермінований (диференціювання клітин на ранніх етапах дроблення зиготи). У першому випадку можна пересадити ядро з клітин кишкового епітелію пуголовка в яйцеклітину з убитим за допомогою ультрафіолетового опромінення ядром. З такої синтезованої клітини розвинеться нормальна жаба. У другому випадку клітини передньої частини бластодебри дрозофіли здатні формувати тільки структури передньої

частини тіла імаго, а клітини задньої частини бластодерми - тільки структури задньої частини тіла.

ЕНХАНСЕРНІ ДІЛЯНКИ ГЕНА

У 1979 році було встановлено, що послідовності ДНК, розташовані в тисячах пар нуклеотидів від промотору еукаріотичного типу, можуть активувати його транскрипцію. Зараз відомо, що ці енхансерні (тобто підсилюють, від англ. Enhance - посилювати) послідовності служать в якості специфічних ділянок (сайтів) зв'язування особливих регуляторних білків, що підсилюють або активують процес транскрипції. Цей тип контролю генної активності на відстані є скоріше правилом, ніж винятком. Як ці білки можуть діяти на великих відстанях?

Згідно найпростішої моделі, ДНК між енхансером і промотором утворює петлю, в результаті чого білки, пов'язані з енхансерами, безпосередньо взаємодіють з одним із загальних факторів транскрипції або з молекулою самої РНК-полімерази. Одним із прикладів енхансерів може служити система GAL4-UAS, виявлена у дріжджів. Ген GAL4 кодує особливий білок, що має два домена. Один з них володіє спорідненістю до ДНК, інший служить для активування транскрипції. Своїм доменом, мають спорідненість до ДНК, білок GAL4 зв'язується з енхансерною ділянкою ДНК, званим UAS (upstream activator sequence - активує послідовність, яка розташована вище точки початку транскрипції), а за допомогою другого домену взаємодіє з білками комплексу TFIIB і TFIID.

Число загальних факторів транскрипції невелике, хоча вони рясно представлені в клітині, оскільки зв'язуються з промоторами всіх генів, транскрибуємих РНК-полімеразою II. Крім цього, в клітині існують десятки різних інших регуляторних білків, що зв'язуються з сайтами контролюючої зони. Їх набори розрізняються в різних клітинах і в різних генах. Кожен з цих білків представлений малим числом молекул. Більшість з цих білків розпізнають особливу, специфічну тільки для них послідовність нуклеотидів в регуляторних сайтах генів. За допомогою білків-регуляторів кожен ген специфічно вмикається або вимикається.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (6) термінів: полілінкер, полімерази, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), тотіпотентність, спейсер, сплайсинг.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Охарактеризуйте кількісну особливість геному еукаріот.
2. Охарактеризуйте нуклеотидну послідовність в геномі еукаріот.
3. Охарактеризуйте гетерогенність ДНК еукаріот по нуклеотидному складу.
4. Що таке хроматин і компактизація хромосом?
5. Що таке перемикування генів в еукаріот?

6. Охарактеризуйте енхансерні ділянки генів.

3. Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Створення і скринінг геномних бібліотек»;
2. «Отримання цукрів з використанням генетично модифікованих бактерій з органічних відходів»;
3. «Отримання і застосування стовбурових клітин»;
4. «Генна інженерія еукаріотичних об'єктів»;
5. «Безпека навколишнього середовища та трансгенні організми».

IV ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ

«МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ САМОВІДТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ»

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №9

РЕПЛІКАЦІЯ ДНК

Генетична програма всіх живих організмів, за винятком РНК-вірусів, записана у нуклеотидній послідовності ДНК. Отже, для збереження унікальних властивостей організму необхідне точне відтворення цієї послідовності в кожному наступному поколінні. *E. coli*, наприклад, повинна дуплікувати практично без помилок повний геном розміром $4 \cdot 10^6$ нуклеотидних пар при утворенні кожного наступного покоління; точно так само повинні бути скопійовані майже 6 мільярдів н.п. в 23 парах хромосом людини при кожному акті поділу клітин. Основною властивістю ДНК є те, що вона служить матрицею і визначає порядок, в якому нуклеотиди шикуються в нові полінуклеотидні нитки.

Власне реплікація ДНК в широкому сенсі - дуже важливий для ділення клітини процес. У нього входить також підготовка хроматину до реплікації і недопущення повторного мітозу. Це забезпечує одноразову дуплікацію ДНК протягом одного клітинного циклу, підтримуючи таким чином стабільність геному. Генетична стабільність живих організмів в значній мірі визначається функціонуванням комплексу білків, що здійснюють реплікацію ДНК. Очевидно, що реплікація ДНК регулюється безліччю білок-білкових і ДНК-білкових взаємодій, механізм яких залишається невідомим. Крім того, комплекс реплікації ДНК працює взаємоузгоджено з комплексами білків, що здійснюють репарацію пошкоджень ДНК. Одночасно процес передачі інформації від батьківського організму до дочірнього супроводжується рекомбінацією молекул ДНК для створення більшого спадкового розмаїття.

Процес ДНК-рекомбінації докладно описаний при мейотичному кроссинговері в процесі утворення статевих клітин. Враховуючи все різноманіття і узгодженість процесів ДНК-метаболізму, можна припустити ще більшу різноманітність і складну взаємодію білкових комплексів, що здійснюють стабільне відтворення спадкового матеріалу в поколіннях. Важливо усвідомлювати, що в ДНК закодована інформація про механізм її власного подвоєння: одні гени кодують ферменти, які синтезують нуклеотидні попередники ДНК, інші - білки, що здійснюють збірку активованих нуклеотидів в полінуклеотидних ланцюжках. Є гени, що координують процес реплікації з іншими клітинними подіями, а також гени, що кодують білки, які упаковують ДНК в хроматин. Розуміння регуляції та динаміки цих систем є ключовим завданням молекулярної біології XXI століття.

Реплікація - полімеразна реакція. Відповідно до загальноприйнятої моделі, реплікація всіх двониткових ДНК напівконсервативна. Таким чином, після кожної події реплікації одна нитка в обох дочірніх молекулах є батьківською, консервативною, а інша - новосинтезованою, дочірньою. Саме такий механізм копіювання і називається напівконсервативним. Якщо геном представлений одною молекулою ДНК (як у деяких вірусів), то ця єдина нитка служить матрицею для утворення комплементарної нитки, з якої вона утворює дуплекс, а потім на цьому дуплексі синтезуються або дочірні дуплекси, або одониткові копії однієї з матричних ниток. Уотсон і Крик вже в другій своїй роботі 1953 припустили можливий механізм копіювання спадкового матеріалу. Легко уявити, що в ланцюзі молекули ДНК розходяться і кожна з них стає матрицею, на якій синтезується новий комплементарний ланцюг. В результаті утворюються дві дочірні двоспиральні молекули ДНК, не відмітні від батьківської молекули. У 1957 р. А. Корнберг виявив у бактерії *E. coli* фермент, що каталізує процес полімеризації ДНК з нуклеотидів - ДНК-полімеразу 1. У 1959 р. Артуру Корнбергу (A. Kornberg) була присуджена Нобелівська премія за відкриття механізму біосинтезу ДНК. Він показав, що в основі подвоєння молекул ДНК лежать звичайні біохімічні реакції. У загальному вигляді реакцію приєднання 5'-дезоксінуклеотидної групи до 3'-ОН-групі кінцевого нуклеотиду праймерної ланцюга можна представити таким чином: $[DNMP]_n + dNTP \leftrightarrow [dNMP]_{n+1} + PP_i$, де dNMP- будь-який з чотирьох звичайних нуклеотидів. За один акт реплікації нитка, що містить 3'-кінець, подовжується на один нуклеотидний залишок, при цьому одночасно відбувається видалення пірофосфату. Реакція приєднання нуклеотиду оборотня, але так як неорганічний фосфат в клітинах швидко руйнується, то реакція активно спрямована в бік синтезу. Реплікація ДНК завжди йде від 5'-кінця нитки ДНК (тобто містить 5'-дезоксінуклеотидну групу) до 3'-кінця (то що містить вільну 3'-ОН-групу) і потребує наявності раніше синтезованого фрагмента нитки ДНК в якості затравки для реакції полімеризації. Такий ДНК-фрагмент, що має вільний 3'-кінець, називається праймером. Ферменти, що каталізують праймер-залежну, детермінуємих ДНК-матрицею реакцію приєднання дезоксінуклеотидів, називаються ДНК-полімераза. До теперішнього часу виділено і охарактеризовано кілька різних класів ДНК-полімераз, детально описані властивості цих ферментів і реакції, які вони каталізують.

Вилка реплікації. Процес реплікації відбувається в спеціальних структурах, названих вилками реплікації. Схематичне пристрій реплікативної вилки *E.coli* представлено на рис. 1. Те, що дві нитки молекули ДНК розташовані антипаралельно один одному, створює ряд проблем для їх одночасної різноспрямованої реплікації. У міру руху вилки одночасно повинні синтезуватися два дочірніх ланцюга. Вилка рухається в напрямку від 5' до 3' на одному ланцюзі і від 3' до 5' - на іншому. Однак нуклеїнові кислоти синтезуються тільки від 5'-до 3'-кінця. Проблема вирішується таким чином, що на одній з батьківських ниток нова нитка синтезується безперервно в напрямку

5'-3', що збігається з рухом вилки реплікації. Це називається лідируючою або ведучою. Інша нитка називається відстаючою або запізнюється, так як синтез на ній йде з деякою затримкою в порівнянні з лідируючою ниткою. Це пов'язано з тим, що ДНК на цій нитці синтезується також від 5' до 3', але в напрямку, протилежному руху вилки, і короткими фрагментами. Завдяки цьому різноспрямований синтез ДНК може здійснюватися в рамках однієї структури - реплікативної вилки.

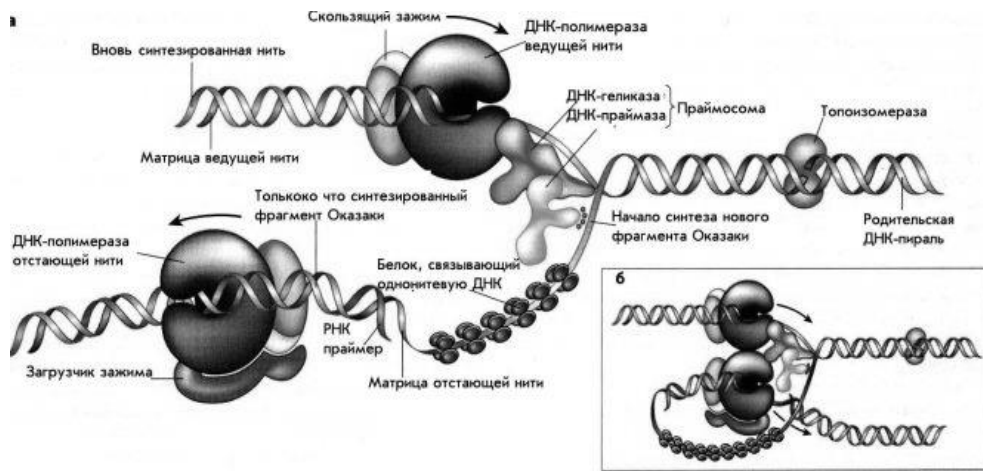


Рис. 1. Схема реплікативної вилки

Довжина таких коротких фрагментів у прокаріотів складає 1000-2000 п.н. і вони були названі «фрагментами Окадзакі», на ім'я вченого, який їх відкрив. У міру руху реплікативної вилки кінці сусідніх фрагментів Окадзакі з'єднуються з утворенням безперервної відстаючої нитки. Для того, щоб процес на обох нитках йшов синхронно, полімеразні комплекси лідируючої і відстаючої нитки з'єднуються між собою, утворюючи складну тривимірну структуру (рис. 1, б). Вилка реплікації може рухатися як в одну сторону від точки початку реплікації, так і в обидві сторони. В залежності від цього процес називається односпрямованим або двонаправленою реплікацією. Як це виглядає схематично, показано на рис. 2.

У еукаріотів реплікація зазвичай двонаправлена. Також і у *E.coli*. Механізми ініціації реплікації в точці початку реплікації і при утворенні фрагментів Окадзакі у відстаючому ланцюзі в принципі аналогічні, хоча є деякі тонкі відмінності. В обох випадках відбувається утворення коротких РНК-затравок (праймерів), комплементарних матричній ДНК, у вигляді продовження яких синтезується новий ланцюг ДНК. Надалі короткі вставки РНК замінюються сегментами ДНК, окремі фрагменти Окадзакі потім об'єднуються з утворенням безперервної відстаючої нитки.

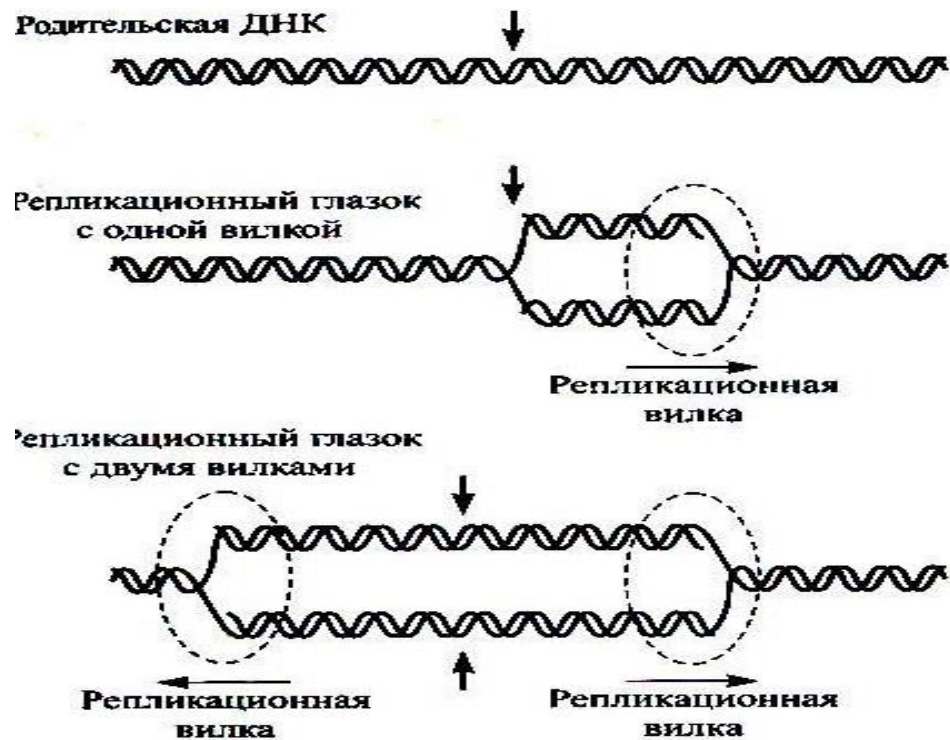
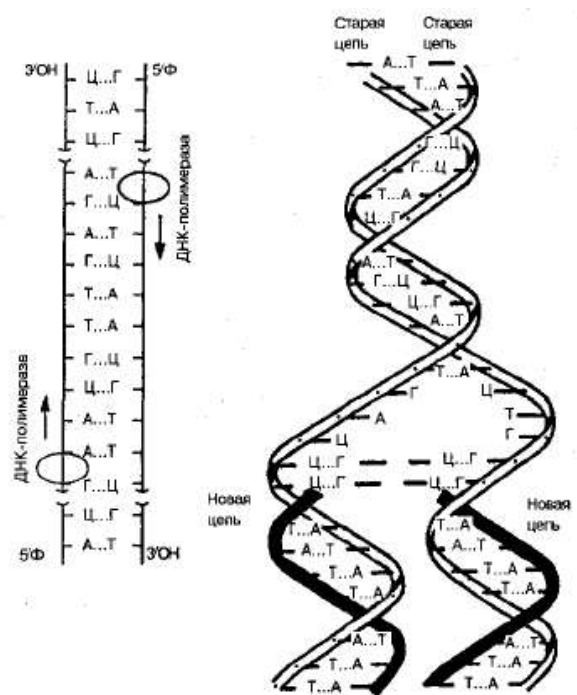
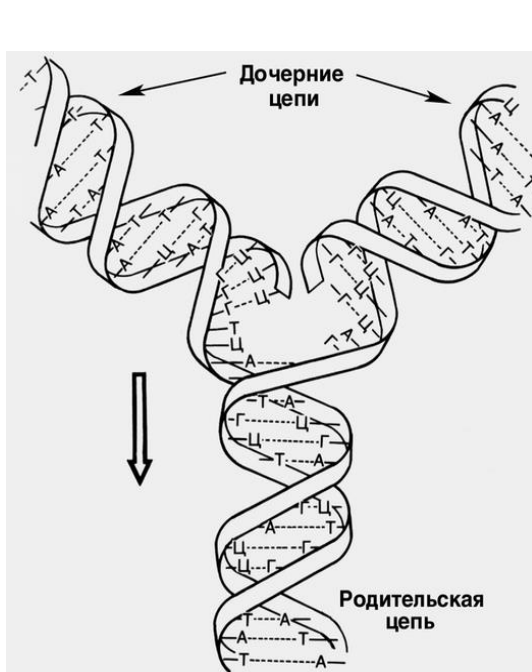
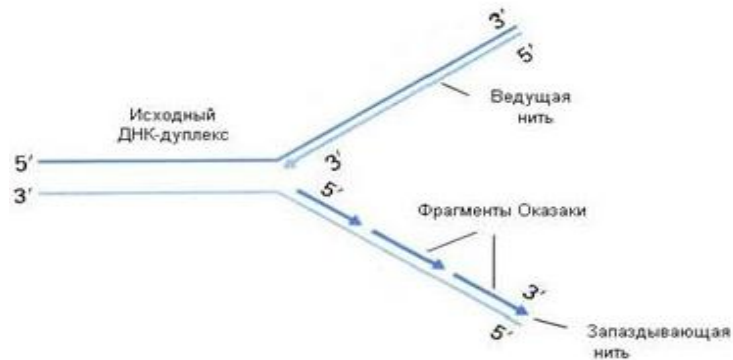


Рис. 2. Можливий рух реплікативної вилки

Початок реплікації. Молекула ДНК, здатна до автономної реплікації, отримала назву реплікона. Реплікон містить всі необхідні гени і регуляторні послідовності, які забезпечують регульоване подвоєння його ДНК. Ділянка реплікону, в якому починається реплікація, називається реплікатором, або областю початку реплікації (англ. replication origin), у *E. coli* - *ori C*. При ініціації реплікації ініціатор, який кодується репліконом (у *E. coli* - білок Dna A), взаємодіє з реплікатором. Ціла хромосома *E. coli* є репліконом; у еукаріотів репліконом називають відрізок ДНК, реплікація якого протікає під контролем єдиної точки початку реплікації. Точка початку реплікації має специфічну послідовність основ, багату парами А-Т, що, ймовірно, полегшує розподіл ланцюгів. В результаті ініціації раунду реплікації в точці *ori* утворюється одна або дві реплікативних вилки. При односпрямованій реплікації виникає одна реплікативна вилка (плазміда ColF1), і синтез закінчується в точці *ori* (рис.3). При двонаправленій реплікації (хромосома *E. coli*) ініціюються дві реплікативних вилки, що переміщуються в протилежних напрямках до тих пір, поки вони не зустрінуться на протилежній стороні кільця. Для геномів еукаріотів зазвичай характерна наявність множинних точок початку реплікації, розкиданих по хромосомі на відстані 20 тис. н.п., тобто еукаріотичні хромосоми мають полірепліконну організацію. Після ініціації реплікація продовжується в двох напрямках від кожної точки до тих пір, поки реплікативні вилки двох сусідніх точок початку реплікації не зіллються. Повнорозмірні ДНК кожної дочірньої хромосоми виходять шляхом з'єднання більш коротких, незалежно ініційованих новосинтезованих ланцюгів.

РЕПЛИКАТИВНАЯ ВИЛКА

**Білки та ферменти, що беруть участь у реплікації ДНК**

ДНК-полімераза - фермент, що бере участь в реплікації ДНК. Ферменти цього класу каталізують полімеризацію дезоксирибонуклеотидів уздовж ланцюжка нуклеотидів ДНК, яку фермент "читає" і використовує як шаблон. Тип нового нуклеотиду визначається за принципом комплементарності з шаблоном, з якого ведеться зчитування. Зібрана молекула комплементарна шаблонній моноспіралі і ідентична другому компоненту подвійної спіралі.

Виділяють ДНК-залежну ДНК-полімеразу, що використовує в якості матриці одну з ланцюгів ДНК, і РНК-залежну ДНК-полімеразу (інша назва зворотна транскриптаза), здатну також до зчитування інформації з РНК (зворотна транскрипція).

ДНК-полімеразу вважають холоферментом, оскільки для нормального функціонування вона потребує присутності іонів магнію в якості кофактора. За відсутності іонів магнію про неї можна говорити як про апофермент.

ДНК-полімераза починає реплікацію ДНК, зв'язуючись з відрізком ланцюга нуклеотидів. Середня кількість нуклеотидів, що приєднується за

допомогою ферментів ДНК-полімеразою за один акт скріплення / дисоціації з матрицею, називають процесингом.

ДНК-праймаза — спеціальна РНК-полімераза, основною роллю якої є створення праймерів в процесі реплікації ДНК. Праймаза має ключову важливість в процесі реплікації ДНК, тому що ніяка відома ДНК-полімераза не може ініціювати синтез нового ланцюжка ДНК без початкового праймера. Назва праймази різних організмів відрізняється, так у бактерії *E. coli* праймаза називається DnaG (є продуктом гену *dnaG*), еукаріоти мають праймазу, що складається з двох субодиниць, що у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* називаються Pri1 і Pri2 (є продуктами генів PRI1 і PRI2), у дріжджів *Schizosaccharomyces pombe* — Spp1 і Spp2, у людини та інших ссавців — Prim1 і Prim2.

У бактерій праймаза зв'язується ДНК-геліказою, формуючи комплекс, називаємий праймосомою. Праймаза активізує ДНК-геліказу, яка розплітає подвійну спіраль ДНК, а це потім синтезує короткий праймер РНК приблизно 11 ± 1 нуклеотидів завдовжки, до якого нові ДНК-нуклеотиди додаються вже ДНК-полімеразою.

У еукаріотів праймаза формує комплекс з ДНК-полімеразою α , в якому праймаза синтезує праймер ДНК довжиною лише кілька РНК-нуклеотидів, після чого полімераза приєднує до нього ДНК-нуклеотиди. Після того, як довжина ланцюжка досягне близько 20 нуклеотидів, комплекс відділяється, і синтез продовжується іншими ДНК-полімеразами.

ДНК-лігаза — фермент класу лігаз, що з'єднує разом дволанцюжкові молекули ДНК, що мають дволанцюжкові розриви (розрив в обох ланцюжках ДНК). Одноланцюжкові розриви є значно менш небезпечними пошкодженнями і легко виправляються ДНК-полімеразою, використовуючи комплементарний ланцюжок в якості шаблону, але вони також вимагають ДНК-лігази для створення останнього фосфодіестерного зв'язку, щоб повністю відновити ДНК.

У живих клітинах ДНК-лігаза залучена як до процесу репарації, так і реплікації ДНК. Крім того, ДНК-лігаза широко застосовується в дослідженнях із молекулярної біології та роботах із генної інженерії для молекулярного клонування.

Цей фермент спостерігається у вигляді поодинокого поліпептиду, молекулярна маса якого 75000 Да. Приймає участь у реакції аденілювання ДНК-лігази, трансаденілюванні, лігіруванні.

ДНК-хеліказа (англ. helicase, від лат. Helix - спіраль, по-російськи іноді названі геліказами) - це клас ферментів, які зустрічаються у всіх живих організмів. Їх відносять до класу «молекулярних машин», оскільки вони використовують енергію гідролізу нуклеотидтрифосфатів (АТФ, ГТФ) для руху уздовж цукрофосфатної основа нуклеїнових кислот (ДНК, РНК, гібридів між ДНК і РНК) і розриву всередині-чи міжмолекулярних водневих зв'язків між основами. Класифікують дві великі позасистемні групи - ДНК-хелікази і РНК-хелікази. Багато процесів життєдіяльності, що відбуваються в клітині, вимагають поділу ланцюгів і розплітання біополімерів вторинної структури нуклеїнових кислот: реплікація ДНК, рекомбінація, репарація ДНК,

транскрипція, сплайсинг, трансляція. Хелікази поділяють ланцюги дволанцюжкової молекули ДНК або внутрішньомолекулярні зв'язки в молекулах РНК, використовуючи енергію гідролізу АТФ або ГТФ. Вони рухаються вздовж ланцюга нуклеїнової кислоти в напрямку (5'→3' або 3'→5'), характерному для даного ферменту. У клітині існує кілька десятків хеліказ (в *E. coli* відомо 14, в людських клітинах - 24). Хеліказам властиві декілька типів структурної організації, вони можуть бути активні в якості мономеру або димеру, хоча найбільш добре вивчені хелікази, наприклад, DnaB активні в якості гексамерів, що утворює баранкоподібну структуру.

Білки, що зв'язують одноланцюжкові ДНК (англ. Single-strand binding protein, SSB, SSBP) - пов'язують одноланцюгові фрагменти ДНК, і запобігають комплементарному поєднанню. Білки SSB запобігають утворенню дуплексу і дозволяють компонентам вилки реплікації здійснювати реплікацію ДНК. Білки SSB виявлені у всіх живих організмах, від вірусів до людини. Багато SSB фагів і вірусів функціонують як мономери, SSB еукаріотів, наприклад реплікативний білок А є гетеротримерним, SSB *E. coli* - гомотетрамер.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (7) термінів: транспозиція, транспозони, рекомбінантна плазміда, рамка зчитування, промотор, лігаза, лігирування.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке реплікація ДНК?
2. Охарактеризуйте вислів «реплікація – полімеразна реакція».
3. Охарактеризуйте вилку реплікації.
4. Що таке початок реплікації, надайте її характеристику?
5. Охарактеризуйте ферменти, які приймають участь у процесі реплікації ДНК?
6. Охарактеризуйте білки, що беруть участь у реплікації ДНК.

3. Самостійно зарисуйте схему реплікації та позначте ферменти, які приймають участь у цьому процесі.

4. Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Клонування ембріонів тварин: історія, методи, види та перспективи»;
- 2 «Отримання метану з використанням генетично модифікованих бактерій з органічних відходів»;
3. «Основні шляхи і механізми природного синтезу білків»;
4. «Принципи медико-генетичного консультування»;
5. «Молекулярно-генетичні дослідження в криміналістиці».

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №10

РЕПЛІКАЦІЯ ДНК

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 ізо́топ азоту. В результаті дослідження вдалося виявити, що ДНК синтезується за напівконсервативним механізмом.

Молекулярний механізм реплікації дволанцюгової ДНК

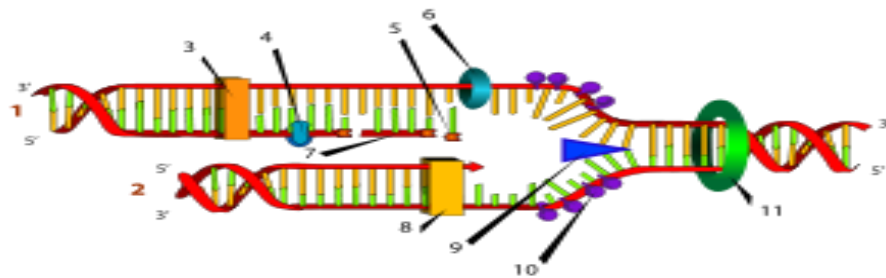


Рис. 1. Процес реплікації ДНК

Схематичне зображення процесу реплікації, цифрами позначені:

1- ланцюг, що відстає; 2 - ланцюг-лідер; 3 - ДНК-полімераза (Polα);
 4 - ДНК лігаза; 5 - РНК-праймер; 6 - ДНК-праймаза; 7 - фрагмент Окадзакі;
 8 - ДНК-полімераза (Polδ); 9 - хеліказа; 10 - одиничний 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.

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.

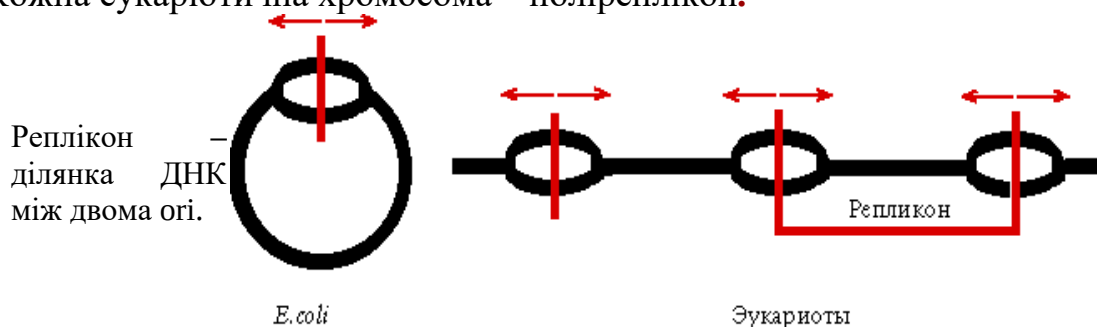
В процесі негомологічної рекомбінації (негомологічного з'єднання кінців), що виникає в результаті зовнішніх пошкоджень, дві спіралі ДНК розриваються, після чого неперервність спіралей відновлюється в процесі репарації клітиною дволанцюжкових розривів ДНК, але не обов'язково в правильному порядку. Тому 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 приєднатися до одного з ланцюжків другої хроматиди. Інший розрив в ланцюжку другої хроматиди дозволяє їй також відокремитися і приєднатися 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.



У еукаріотів ДНК закріплюється білками у декількох місцях на ядерній мембрані. На кожній окремій ділянці працює *топоізомераза*. Скільки ділянок, стільки і *ori*.

Хоча у клітині у людини ДНК на 3 порядки більше ніж у *E. coli*, час реплікації майже еквівалентний (за рахунок більшої кількості *ori*).
Кожна еукаріотична хромосома – поліреплікон.



Розмір фрагментів Окадзакі у еукаріотів менший (200-400 нукл). Швидкість роботи ДНК-полімераз еукаріотів на порядок нижча, ніж у прокаріотів.

Організм	Кількість репліконів	Середній розмір реплікона, тис.п.н.	Швидкість руху реплікаційної вилки П.Н. / Хв.
E.coli	1	4200	50000
Дріжджі	500	40	3600
Дрозофіла	3500	40	2600
Ксенопус (жаба)	15000	200	500
Миша	25000	150	2200
Боби	35000	300	2200

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

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 тіломір у середньому на 50 пар нуклеотидів. Оскільки тіломірні 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 тіломіри 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 різних хромосомам.

Отже, **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.

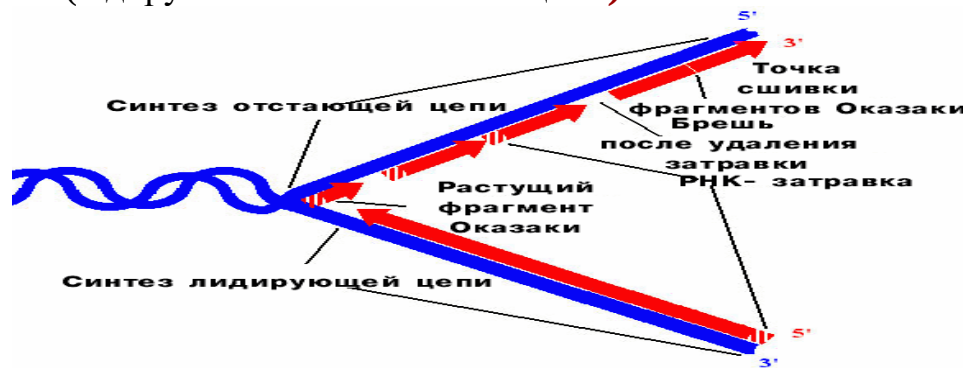
Принципи реплікації

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 $5' \rightarrow 3'$.

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

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.

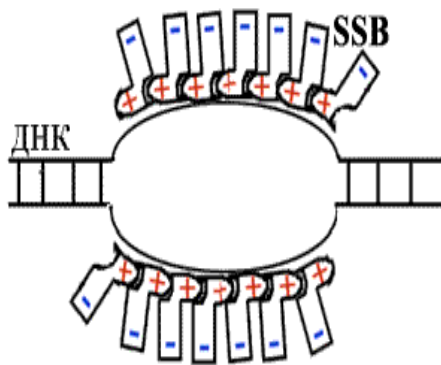
Якщо подіяти рифампіцином, то блокується не тільки транскрипція і всі наступні процеси, але і реплікація I.

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

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 вилиці 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-полімеразу *E. coli*. **SSB не ферменти** - вони потрібні у стехіометричній кількості.

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 якій 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.

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.

Регуляція реплікації у бактерій.

Реплікація хромосом бактерій тісно поєднана з метаболізмом клітин. Наприклад, частота ініціації 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.

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 CpNpNr, 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. 2. 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 унеможливорює 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?

Реплікація плазмід

Плазміда (*лат.*, *англ.* *plasmid*) — молекула ДНК, окрема від хромосомної ДНК та здатна до автономної реплікації. Вона звичайно кругла і дволанцюжкова. Плазміди 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 плазміди (особливо для певних штучних плазмід, сконструйованих для отримання високого числа копій, наприклад, плазміди серії pUC). Термін «плазміда» був вперше введений американським молекулярним біологом Д. Ледербаргом у 1952 році.

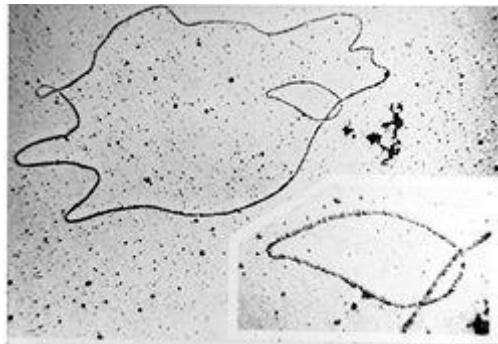


Рис. 3. Кільцева дволанцюгова ДНК плазміда під растровим електронним мікроскопом.

Реплікація плазмід відбувається незалежно від реплікації хромосоми, причому на одну хромосому в бактерії може припадати одна або кілька однакових плазмід. *Епісоми* - це плазміди, здатні включатися в хромосому бактерії. Деякі позахромосомні елементи можуть вести себе як епісоми в одних бактеріях і, як плазміди в інших. Плазміди 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 хромосомою, а потім і виходити з неї, захоплюючи з собою при цьому інші гени, то таку плазмиду називають фактором статі.

Для своєї реплікації плазміди 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 якось 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.

Помилки реплікації та репарації

Помилкове включення нуклеотидів під час реплікації є досить вагомою 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 Г, Т. Рівновага зсунута в бік аміно-та кетоформ, які й присутні у складі подвійних спіралей і для яких реалізуються правила компліментарності А-Т, Г-С. Але спарювання основ підпорядковується іншим правилам для мінорних таутомерних форм: наприклад, іміноформа А та аміноформа С утворюють між собою два водневих зв'язки, 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.

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.

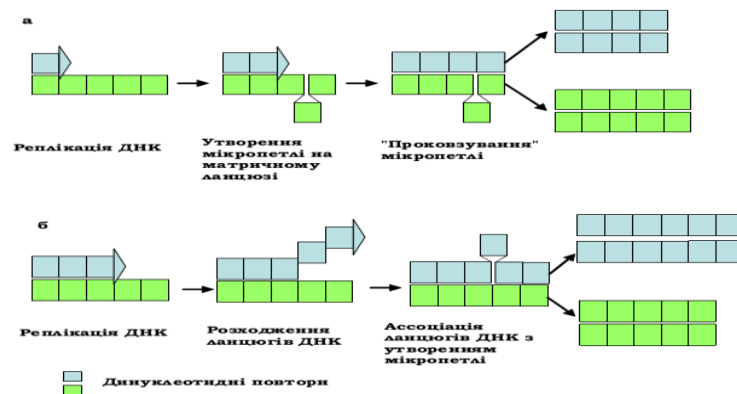


Рис. 6. Зменшення(а) і збільшення(б) кількості повторів при утворенні мікропетлі в ДНК під час реплікації.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (8) термінів: атенуація, білок-репресор, блотинг, ген-регулятор, елонгація, ендонуклеази, індуктор, кодон.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке реплікація? Гіпотези реплікації ДНК.
2. Молекулярний механізм реплікації дволанцюгової ДНК.
3. Характеристики інших механізмів реплікації.
4. Реплікація кінців ДНК хромосом еукаріотів.
5. Вкажіть принципи реплікації.
6. Що таке рифампіцин та хлорамфенікол?
7. Топологічні проблеми реплікації ДНК.
8. Що таке ДНК-полімераза?
9. Які існують види ДНК-полімераз?
10. Характеристика ДНК-полімерази I та її роль у синтезі ДНК і РНК?
11. Характеристика ДНК-полімерази II?
12. Характеристика голоферменту ДНК-полімерази III?
13. Що таке фрагменти Окадзакі?
14. Який механізм дії фрагментів Окадзакі?
15. Як відбувається регуляція реплікації плазмід?
16. Що таке метилювання ДНК?
17. Роль метилювання ДНК в регуляції реплікації?
18. Метилювання ДНК у людини.
19. Що таке плазміда?
20. Що таке двонаправлена реплікація?
21. Вкажіть помилки реплікації та репарації.

4. Самостійне опрацювання (записати у зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Фармакогенетика, методи, задачі, значення»;
2. «Типи спадкових захворювань тварин та людини»;
3. «Хромосоми тварин та людини в нормі та патології».

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №11

РЕПАРАЦІЯ ДНК



Рис. 1. Пошкоджені хромосоми

Репарація - особлива функція клітин, що полягає в здатності виправляти хімічні пошкодження і розриви в молекулах ДНК, пошкодженої при нормальному біосинтезі ДНК у клітині або в результаті впливу фізичними або хімічними агентами. Здійснюється спеціальними ферментними системами клітини. Ряд спадкових хвороб (напр., пігментна ксеродерма) пов'язані з порушеннями систем репарації.

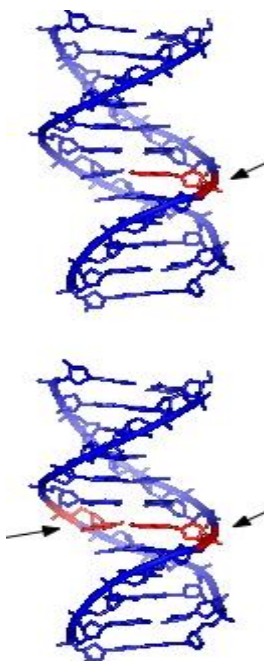


Рис. 2. Однониткові і двониткові пошкодження ДНК

Історія відкриття

Початок вивчення репарації було покладено роботами А. Келнера (США), який в 1948 виявив явище фотореактивації (ФР) - зменшення ушкодження біологічних об'єктів, що викликається ультрафіолетовими (УФ) променями, при подальшому впливі яскравим видимим світлом (світлова репарація).

Р. Сетлоу, К. Руперт (США) та ін незабаром встановили, що фотореактивації - фотохімічний процес, що протікає за участю спеціального ферменту і призводить до розщеплення димерів тиміну, що утворилися в ДНК при поглинанні УФ-кванта.

Пізніше при вивченні генетичного контролю чутливості бактерій до УФ-світла та іонізуючим випромінюванням була виявлена темнова репарація - властивість клітин ліквідувати пошкодження в ДНК без участі видимого світла. Механізм темної репарації опромінених УФ-світлом бактеріальних клітин був передбачений А. П. Говард-Фландерс та експериментально підтверджено в 1964 Ф. Ханавальтом і Д. Петіджоном (США). Було показано, що у бактерій після опромінення відбувається вирізання пошкоджених ділянок ДНК із зміненими нуклеотидами і ресинтез ДНК в утворених прогалини.

Системи репарації існують не тільки у мікроорганізмів, але також у клітинах тварин і людини, у яких вони вивчаються на культурах тканин. Відомий спадковий недуг людини - пігментна ксеродерма, при якому порушена репарація.

Джерела пошкодження ДНК

- 1.УФ випромінювання
2. Радіація
3. Хімічні речовини
4. Помилки реплікації ДНК
5. Апурінізація - відщеплення азотистих основ від сахарофосфатного складу
6. Дезамінування - відщеплення аміногрупи від азотистої основи

Основні типи пошкодження ДНК

Пошкодження одиночних нуклеотидів

Пошкодження пари нуклеотидів

Розрив ланцюга ДНК

Пристрій системи репарації

Кожна з систем репарації включає наступні компоненти:

- фермент, "дізнається" про хімічно змінені ділянки в ланцюзі ДНК і здійснює розрив ланцюга поблизу від пошкодження;
- фермент, що видаляє пошкоджену ділянку;
- фермент (ДНК-полімераза), що синтезує відповідну ділянку ланцюга ДНК замість вилученого;

- фермент (ДНК-лігаза), замикає останній зв'язок в полімерному ланцюзі і тим самим відновлює її безперервність.

Типи репарації

У бактерій є 3 ферментні системи, що ведуть репарацію - пряма, ексцизійна і постреплікативна.

Пряма репарація . Пряма репарація найбільш простий шлях усунення пошкоджень у ДНК, в якому зазвичай задіяні специфічні ферменти, здатні швидко (як правило, в одну стадію) усувати відповідне пошкодження, відновлюючи вихідну структуру нуклеотидів. Так діє, наприклад, ОН-метилгуанін- ДНК-метилтрансфераза, яка знімає метильну групу з азотистої основи на один з власних залишків цистеїну.

Ексцизійна репарація. Ексцизійна репарація (англ. excision - Вирізання) включає видалення пошкоджених азотистих основ з ДНК і подальше відновлення нормальної структури молекули.

Постреплікативна репарація Тип репарації, що має місце в тих випадках, коли процес ексцизійної репарації недостатній для повного виправлення пошкодження: після реплікації з утворенням ДНК, яка містить пошкоджені ділянки, утворюються одноланцюжкові проломи, що заповнюються в процесі гомологічної рекомбінації за допомогою білка RecA. Постреплікативна репарація була відкрита в клітинах E. Coli, не здатних відщеплювати тимінові димери. Це єдиний тип репарації, що не має етапу розпізнавання пошкодження.

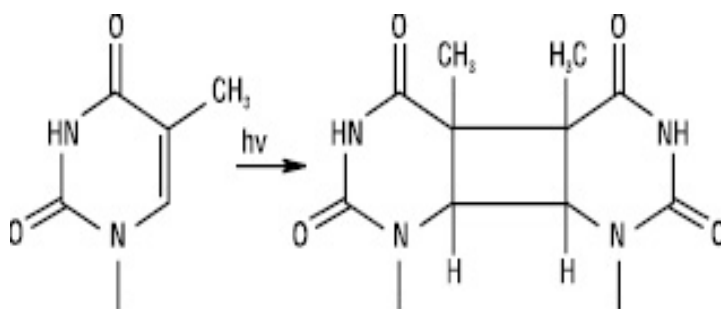
Вважають, що від 80% до 90% всіх ракових захворювань пов'язані з відсутністю репарації. Пошкодження ДНК під впливом чинників навколишнього середовища, а також нормальних метаболічних процесів, що відбуваються в клітині, відбувається з частотою від декількох сотень до 1000 випадків у кожній клітині, щогодини.

Отже, репарація (лат. reparatio — відновлення) — процес виправлення пошкоджень ДНК, зумовлених дією різних хімічних і фізичних факторів. Передавання спадкової інформації у незмінному вигляді — найважливіша умова виживання як кожного організму, так і виду в цілому. Отже, у ході еволюції сформувалася система, яка дозволяє клітині виправляти пошкодження ДНК, викликані помилками реплікації чи впливом пошкоджуючих факторів навколишнього середовища. Усі репараційні механізми ґрунтуються на тому, що генетична інформація записана в обох ланцюгах подвійної спіралі і, якщо нуклеотидна послідовність одного ланцюга змінена, інформацію можна відновити на основі другого (комплементарного) ланцюга.

Фізичні (УФ-опромінення, іонізуюча радіація) і хімічні (ксенобіотики) фактори викликають у ДНК пошкодження чотирьох типів: 1) зміни в одиничних нуклеотидах (депуринізація, дезамінування цитозину до урацилу, дезамінування аденіну до гіпоксантину та ін.); 2) зміни в парі нуклеотидів (УФ-індуковане утворення тимінових димерів, поперечні зшивки біфункціональним алкілюючим агентом); 3) розриви ланцюгів; 4) поперечні зшивки (між основами

одного або різних ланцюгів, між ДНК і молекулами гістонів). Пошкоджені ділянки можуть підлягати репарації, бути заміщені шляхом рекомбінації або залишатися без змін. В останньому випадку виникають мутації, які потенційно ведуть до загибелі клітини. ДНК можуть бути репаровані за допомогою спеціальних механізмів.

Основний шлях репарації ДНК має три етапи. На першому змінена ділянка пошкодженого ланцюга ДНК розпізнається і видаляється за допомогою специфічних ферментів ДНК-репаруючих нуклеаз; вони здійснюють гідроліз фосфодієфірних зв'язків між пошкодженими нуклеотидами і рештою молекули ДНК, унаслідок чого в спіралі ДНК у цьому місці виникає просвіт. На другому етапі фермент ДНК-полімераза зв'язується з 3-кінцем пошкодженого ланцюга ДНК і заповнює цей просвіт шляхом приєднання одного нуклеотида за другим, копіюючи інформацію, яка міститься в неушкодженому матричному ланцюгу. У кінці фермент ДНК-лігаза зшиває ДНК і таким чином завершує відновлення інтактної молекули. При дії УФ-опромінення ушкодження ДНК найбільш часто виникають у клітинах бактерій та в незахищеній шкірі людини, і один із найкраще вивчених механізмів репарації — вирізання тимінового димеру, який утворюється в цих умовах. Тимінові димери виникають унаслідок взаємодії між собою в одному ланцюгу ДНК сусідніх тимінових залишків з утворенням ковалентної зшивки:



Такі димери порушують структуру ДНК і тим самим блокують її реплікацію, доки ушкодження не буде усунуте. Для видалення тимінових димерів у клітині існує два механізми: фотореактивація та ексцизійна репарація. Фотореактивація відбувається при дії світла, що активує специфічний фотореактивуючий фермент — ДНК-фотолазу, який розщеплює димери на мономери і відновлює водневі зв'язки між тиміном і аденіном комплементарних ланцюгів ДНК. Ексцизійна репарація не залежить від наявності світла, тому її ще називають темною репарацією. Ці два види репарації між собою дещо подібні. Відновлення нормальної структури ДНК при ексцизійній репарації здійснюється за участю комплексу ферментних систем за схемою:

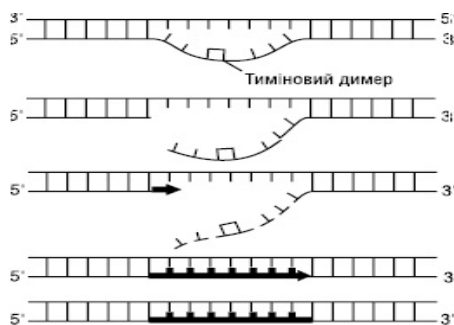
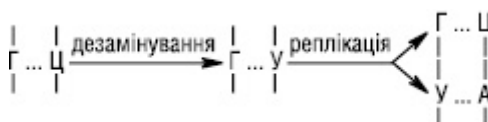


Рис. 3. Репарація фрагмента ДНК з тиміновим димером

Спочатку діє фермент УФ-специфічна ендонуклеаза, яка знаходить місце ушкодження і розриває зв'язок поблизу від димеру з 5'-кінця. Після цього репараційна ДНК-полімераза синтезує фрагмент ділянки ДНК з неушкодженими нуклеотидами в напрямку $5' \rightarrow 3'$, який комплементарний матричному ланцюгу. У ході цього синтезу фрагмент ланцюга, що містить тиміновий димер, видаляється. На наступному етапі ділянка, де розташований тиміновий димер, вирізається під дією $5' \rightarrow 3'$ екзонуклеази. Нарешті, новосинтезований фрагмент з'єднується з кінцем старої частини ланцюга ДНК за участю ферменту ДНК-лігази. За допомогою темної репарації може відбуватися виправлення більшості потенційно летальних порушень геному. Так, у бактерій вона може усувати розриви полінуклеотидних ланцюгів ДНК, викликаних дією рентгенівських променів; може видаляти зшивки пуринових основ у ДНК, викликаних дією іприту. Деякі спадкові захворювання людини пов'язані з дефектами в репарації ушкоджень ДНК, напр. пігментна ксеродерма. При цій патології шкіра пацієнтів є надзвичайно чутливою до сонячного світла, що може спричинити розвиток раку шкіри. Найбільш поширена форма пігментної ксеродерми зумовлена спадковим порушенням синтезу УФ-специфічної ендонуклеази, яка гідролізує ДНК поряд із тиміновим димером, що призводить до порушення всього механізму репарації ДНК. Інший шлях репарації пов'язаний з участю набору ферментів, які мають назву ДНК-глікозилази. Кожний із цих ферментів пізнає один тип змінених основ в ДНК і каталізує гідролітичне відщеплення такої основи. Вважають, що існує не менше шести типів ферментів цієї групи. Серед них ферменти, які видаляють дезамінований цитозин, дезамінований аденін, алкіловані основи різних типів та ін. Так, в ДНК можуть відбуватися зміни, зумовлені хімічною лабільністю цитозину у водневому середовищі. Залишки цитозину спонтанно, дуже повільно втрачають свою аміногрупу внаслідок гідролізу і перетворюються на залишки урацилу, який зазвичай відсутній в ДНК. Дезамінування цитозину є потенційно мутагенним, оскільки урацил, що утворився, є комплементарним аденіну, а отже, один із дочірніх ланцюгів буде містити УА-пару основ замість ЦГ-пари:



Коли новий ланцюг ДНК, що містить неправильний залишок А, у свою чергу

реплікується, то в комплементарному ланцюгу на цьому місці з'явиться Т. Унаслідок цього дочірня дволанцюгова ДНК буде містити пару А–Т у тому положенні, де в материнській ДНК до ушкодження знаходилася пара Г–Ц. Ця мутація виправляється під дією репараційної системи, яка розпізнає чужерідний урацил у молекулі ДНК. Спочатку репаруючий фермент — урацил-ДНК-глікозилаза видаляє шляхом гідролізу неправильну основу, тобто урацил з ушкодженого ланцюга, утворюючи пентозо-фосфатний ланцюг без азотистої основи. Потім специфічна ендонуклеаза розпізнає цей факт і розщеплює 3'-5'-фосфодієфірний зв'язок поруч з відсутньою основою, і далі ДНК-полімераза вбудовує цитозин на місце видаленої основи. Завершує репарацію ДНК-лігаза, що ковалентно зшиває розрив у ланцюгу ДНК. Аналогічним чином унаслідок дезамінування під дією азотистої кислоти, яка утворюється із нітритів і нітратів, аденін перетворюється на гіпоксантин, а гуанін — на ксантин, які виділяються із ДНК також за допомогою специфічних ферментів, після чого репарацію продовжують ДНК-полімераза і ДНК-лігаза. Крім азотистої кислоти, відомі інші хімічні мутагени — інгібітори синтезу ДНК, вільні радикали, радіотоксини, аналоги пуринових і піримідинових основ, деякі антибіотики.

Репарація необхідна для зберігання нативної структури генетичного матеріалу протягом усього життя організму. Тому в процесі еволюції у клітинах з'явилося багато різних механізмів, які забезпечують їх виживання і сприяють зменшенню проявів мутацій.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (7) термінів: аутополіплоїдія, ампліфікатор ДНК, генетичний код, делеція, іммобілізація, імунологічний аналіз, липкі кінці .

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке репарація, її функція?
2. Історія відкриття репарації ДНК.
3. Джерела пошкодження ДНК.
4. Основні типи пошкодження ДНК.
5. Пристрій системи репарації.
6. Типи репарації, їх характеристика.
7. Етапи шляху репарації ДНК.

3. Зарисуйте схему темної репарації та напишіть ферменти, які приймають участь у цьому процесі.

4. **Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:**

1. «Структурні гени та гени регулятори»;
2. «Генетичний код та його властивості»;
3. «Синтез РНК (транскрипція ДНК)».

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №12

ГЕНЕТИЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ

Генетична рекомбінація, реорганізація генетичного матеріалу, обумовлена обміном окремими сегментами (ділянками) подвійних спіралей ДНК. Генетична рекомбінація - головний фактор непостійності геному, основа більшості його змін, що обумовлює природний відбір, мікро-і макроеволюції. Розрізняють два основних типи генетичної рекомбінації:

- 1) «законну» (загальну, або гомологічну), при якій відбувається обмін гомологічними (однаковими) ділянками молекул ДНК;
- 2) «незаконну» (негомологічну), в основі якої лежить обмін негомологічними ділянками ДНК.

Якщо обмін між різними молекулами ДНК здійснюється тільки в ділянках зі строго визначеними нуклеотидними послідовностями, генетична рекомбінація називається сайт-специфічною, якщо в будь-яких місцях молекули ДНК - сайт-неспецифічною. Законна генетична рекомбінація зазвичай сайт-неспецифічна, хоча досить часто у бактерій і вищих організмів вона може проявляти риси сайт-специфічності, тобто вибірковість до певних нуклеотидних послідовностей ДНК (т. зв. гарячі точки рекомбінації). Такі послідовності різко підвищують частоту генетичної рекомбінації в тих ділянках генома, в яких вони локалізовані. Незаконна генетична рекомбінація може бути як сайт-неспецифічною, так і вельми специфічною щодо ділянки обміну. Законна генетична рекомбінація спостерігається, наприклад, між двома копіями хромосоми. У еукаріотів (всі організми, за винятком бактерій і синьо-зелених водоростей) найбільш типовий обмін ділянками гомологічних хромосом у мейозі (поділ клітин, в результаті якого відбувається зменшення числа хромосом у дочірніх клітинах - основна стадія утворення статевих клітин). Цей обмін може відбуватися між щільно кон'югованими хромосомами на ранніх стадіях розвитку яйця або сперматозоїда. Рідше-законна генетична рекомбінація здійснюється при звичайному розподілі клітин (із збереженням числа хромосом) – мітозі.

У прокаріотів (бактерії і синьо-зелених водорості), у яких відсутній мейоз, а геном представлений тільки однією молекулою ДНК, законна генетична рекомбінація сполучена з такими природними формами обміну і перенесення генетичного матеріалу, як кон'югація (хромосоми з донорської клітини передаються до реципієнтної через протоплазматичний місток-пінь), трансформація (ДНК проникає з середовища через клітинну оболонку), трансдукція (передача ДНК здійснюється бактеріофагом, або вірусом бактерій). У вірусів генетична рекомбінація відбувається при зараженні ними клітин. Після лізису клітини виявляються віруси з рекомбінантними ДНК. У прокаріотів генетичну рекомбінацію здійснюють спеціальні клітинні білки (багато з них ферменти). В основі молекулярного механізму законної генетичної рекомбінації лежить принцип «розрив-з'єднання» двох

гомологічних молекул ДНК. Цей процес (називається кросинговер). Включає кілька проміжних етапів: 1) впізнавання ділянок, 2) розрив і реципрокне (хрест-навхрест) з'єднання молекул: заміна одних ланцюгів гомологічними, 3) усунення помилок, що виникають в результаті неправильного спаровування ділянок. Точка обміну може виникати на будь-якій ділянці гомологічних нуклеотидних послідовностей хромосом, що втягуються в обмін.

При цьому в точці обміну зазвичай не відбувається зміни нуклеотидних послідовностей. Точність розриву і з'єднання надзвичайно велика: ні один нуклеотид не втрачається, не додається і не перетворюється на інший. Основою всіх запропонованих схем генетичної рекомбінації послужила так звана модель Холлідєя, згідно з якою генетична рекомбінація починається з розриву тільки однієї з двох ланцюгів спіралі ДНК. Слідом за розривом один кінець ланцюга витісняється іншим кінцем, який нарощується ДНК-полімеразою.

Витіснений кінець розірваного ланцюга злучається з другої молекули ДНК (утворюється т. з. гетеродуплекс), у свою чергу витісняючи там ділянку однієї з її ланцюгів. Зрештою одиночні гомологічні ланцюги обмінюються реципрокно. Після цього етапу спарювання дві гомологічні спіралі ДНК утримуються разом завдяки перехресному обміну ланцюгами - по одній від кожної спіралі (див. рис.). Точка перехрестя далі може мігрувати, в результаті чого додатково утворюються або ростуть гетеродуплексні ділянки на обох молекулах ДНК.

Структура з перехрещеними ланцюгами може існувати в різних стереоізомерних формах, що виникають в результаті обертання складових її елементів відносно один одного. Ізомеризація, яка як й інші стадії генетичної рекомбінації контролюється генетично, змінює положення двох пар ланцюгів: два ланцюга, що раніше перехрещувалися стають неперехрещуваними і навпаки.

Для того щоб знову відновилися дві окремі спіралі ДНК і тим самим припинився процес спарювання, в кожному з двох перехрещених ланцюгів повинен відбутися розрив. Якщо він відбувається до того, як пройшла ізомеризація, то дві вихідні спіралі ДНК відокремлюються один від одного так, що у кожної з них генетично перебудованої виявляється тільки один ланцюг. Якщо ж розрив двох перехрещених ланцюгів відбувається після ізомеризації, то обидві молекули ДНК зазнають повну реорганізацію: частина кожної вихідної спіралі виявляється приєднаної (ступінчастим з'єднанням) до частини іншої спіралі. Законна генетична рекомбінація призводить до виникнення нових комбінацій специфічних алелей (різної форми одного і того ж гена, що зумовлюють різні варіанти розвитку однієї і тієї ж ознаки-групи.

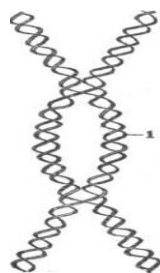


Схема спарювання двох гомологічних спіралей (одна з них позначена жирною лінією, інша-подвійною), 1 – гетеро дуплекс.

Незаконна генетична рекомбінація має виражений локальний характер. В цьому випадку весь процес з його початковим етапом впізнавання, який зводить разом дві спіралі ДНК, іде особливим рекомбінаційним ферментом; спарювання основ тут не потрібно. Інтеграція транспозонів, плазмід і помірних фагів в бактеріальний геном може служити прикладом генетичної рекомбінації цього типу. Подібний механізм існує також і в еукаріотичних клітинах. При незаконній генетичній рекомбінації в обмін вступають короткі специфічні нуклеотидні послідовності однієї або обох спіралей ДНК, що беруть участь в цьому процесі. Таким чином, така генетична рекомбінація змінює розподіл нуклеотидних послідовностей, в геномі-з'єднуються ділянки ДНК, які до цього не розташовувалися в безперервній послідовності поруч один з одним. Подібний обмін гетерологічними ділянками ДНК призводить до виникнення вставок, делецій, дуплікацій і транслокацій генетичного матеріалу. У еукаріотів переміщення різних генетичних елементів, пов'язані з незаконною генетичною рекомбінацією, здійснюються переважно не в мейозі, коли контактують парні хромосоми, а під час звичайних клітинних циклів (мітозі). Незаконна генетична рекомбінація грає важливу роль в еволюційній мінливості, так як завдяки їй здійснюються найрізноманітніші, нерідко кардинальні, перебудови геному і, отже, створюються передумови для якісних змін в еволюції даного організму.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (9) термінів: гомологічні хромосоми, група зчеплення, дрейф генів, картирування генів, маркерний ген, мутація, нокаут (генний таргетинг), праймер, процессинг.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:
 1. Що таке генетична рекомбінація, її значення та види?
 2. Характеристика видів генетичної рекомбінації.
 3. Що таке сайт-специфічна генетична рекомбінація?
 4. Що таке сайт-неспецифічна генетична рекомбінація?
 5. Генетична рекомбінація у прокариот.
 6. Етапи кросинговеру та їх характеристики.
 7. Характеристика законної генетичної рекомбінації.
 8. Характеристика незаконної генетичної рекомбінації.

3. **Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:**

1. «Біонанотехнології та перспективи їх практичного застосування»;
2. «Новітні технології транскриптоміки і протеоміки»;
3. «Сплайсінг та його механізми».

У ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ

«РЕАЛІЗАЦІЯ СПАДКОВОЇ ІНФОРМАЦІЇ»

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №13

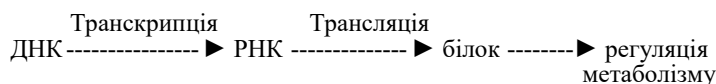
ТРАНСКРИПЦІЯ

Транскрипція – біосинтез РНК на матриці ДНК. Це перша стадія реалізації генетичної інформації, в процесі якої певні ділянки нуклеотидної послідовності ДНК «переписуються» у комплементарні одноланцюгові молекули РНК. В результаті транскрипції утворюються мРНК, що кодують амінокислотні послідовності білків, а також тРНК, рРНК та інші види РНК, які виконують структурні, регуляторні та каталітичні функції.

В основі транскрипції лежить фундаментальний принцип комплементарності азотистих основ полінуклеотидних ланцюгів ДНК та РНК, а сам процес забезпечується участю відповідних ферментів – РНК-полімераз та групою білків – регуляторів транскрипції.

У генах задована інформація про білки, що синтезуються в клітині. Однак, сама ДНК не використовується в якості безпосередньої матриці для синтезу білка. Реалізація генетичної інформації становить двостадійний процес. На першій стадії ген є матрицею для синтезу молекул РНК, на які досконало *транскрибується* (переписується) послідовність нуклеотидів відповідного гена і, отже, інформація про послідовність амінокислот, що задована в ньому. На другій стадії нуклеотидна послідовність РНК *транслюється* (перекладається) у поліпептидний ланцюг.

Таким чином, потік генетичної інформації у клітині здійснюється за таким напрямом:



РНК - це лінійна полінуклеотидна молекула, що відрізняється від ДНК за двома відношеннями. По-перше, моноцукром у РНК є рибоза, що містить не одну, а дві гідроксильні групи; вони пов'язані з 2'- і 3'-атомами вуглецю. По-друге, одним із чотирьох основ у РНК є урацил (U), що займає місце тиміну. Більшість молекул РНК одноланцюгові, хоча часто в них є взаємокомплементарні ділянки, що утворюють дволанцюгові структури - «шпильки». Спарювання основ відбувається таким чином, як і в ДНК, за винятком того, що замість пари А-Т утворюється А- U.

Існують три основних типи РНК: інформаційна, або матрична (іРНК, мРНК), яка є матрицею для синтезу білка. Кожному структурному гену (або групі генів) відповідає власна молекула мРНК; транспортна (тРНК), що переносить амінокислоти в активованій формі до рибосом, де здійснюється синтез молекули білка; рибосомна (рРНК) - необхідний компонент рибосом.

Усі вони відіграють важливу роль у процесі розшифровки генетичної інформації. У більшості прокаріотів транскрипція всіх РНК здійснюється за допомогою одного ферменту - РНК-полімерази. В еукаріот мРНК, рРНК і тРНК транскрибуються різними РНК- полімеразами.

Транскрипція багато в чому подібна до реплікації. Матрицею при синтезі РНК є певна ділянка одного з ланцюгів ДНК. РНК- полімераза копіює цю ділянку, послідовно з'єднуючи рибонуклеотиди один з одним за допомогою 3'-5'-фосфодієфірних зв'язків відповідно до правила комплементарності. Транскрипція починається після приєднання РНК-полімерази до специфічної нуклеотидної послідовності — *промотору*. Завершується транскрипція коли РНК-полімераза досягає послідовності стоп-сигналу, або сигналу *термінації* транскрипції. Ділянка ДНК, що обмежена промотором і стоп-сигналом, становить одиницю транскрипції - *транскриптон*. Дроблення ДНК на множину транскриптонів забезпечує можливість незалежного зчитування різних генів, їх індивідуального вмикання і вимикання.

У ході транскрипції новосинтезована молекула РНК від'єднується від ДНК і подвійна спіраль ДНК відновлюється. Щоб забезпечити транскрипцію тільки окремих сегментів ДНК, повинні існувати якісь сигнальні послідовності, що вказують, де починається (*ініціюється*) транскрипція й де вона зупиняється (*термінується*). Сигнал ініціації звичайно розташовується перед послідовністю, що кодує, а сигнал термінації - слідом за нею. Ділянка ДНК, що передує гену, який транскрибується, називається 5'-фланкуючою послідовністю, а розташована за ним - 3'-фланкуючою.

Цикл транскрипції можна поділити на чотири основні стадії, до кожної з яких входить багато елементарних подій:

- зв'язування з ДНК ;
- *ініціація* ланцюга РНК;
- ріст (*елонгація*) ланцюга РНК;
- *термінація* (припинення) росту ланцюга РНК.

Цикл транскрипції починається із приєднання РНК-полімерази до *промотору* — певної ділянки ДНК, що визначає місце початку синтезу РНК. При зв'язуванні РНК-полімерази з промотором створюється так званий закритий промоторний комплекс, в якому ДНК зберігає двоспіральну структуру. Закритий комплекс може обертатися у відкритий, причому цей процес - зворотний. Після утворення відкритого комплексу РНК-полімераза розплітає приблизно один виток подвійної спіралі ДНК в районі стартової точки - нуклеотиду, з якого починається комплементарне копіювання матриці. У відкритому комплексі зв'язок РНК-полімерази із ДНК суттєво зміцнюється.

Наступна стадія, ініціація, здійснюється за наявності субстратів РНК-полімерази, нуклеозидтрифосфатів і полягає в утворенні перших декількох ланок ланцюга РНК. Ріст ланцюга РНК відбувається в напрямку 5'—>3', як і під час реплікації ДНК, а РНК-полімераза пересувається вздовж матричного ланцюга в напрямку 3'—>5'.

Ефективність ініціації на різних промоторах, їх «сила», суттєво розрізняється: з деяких промоторів за період поділу клітини може ініціюватися

всього одна-дві молекули РНК, в той час як на інших — ініціювання відбувається кожні одну-дві секунди.

На стадії елонгації в ДНК розплетено біля 18 п.н. Близько 12 нуклеотидів матричної нитки ДНК створює гібридну спіраль з наростаючим кінцем ланцюга РНК. Відповідно до руху РНК- полімерази вздовж матриці попереду неї здійснюється розплітання, а позаду - відновлення подвійної спіралі ДНК. Одночасно відбувається звільнення синтезованої РНК із комплексу з матрицею і з РНК- полімеразою. Максимальна швидкість елонгації становить близько 50 нуклеотидів за секунду.

На відміну від ДНК-полімерази РНК-полімераза не володіє здатністю до самокорекції. У зв'язку з цим надійність транскрипції значно нижча, ніж надійність реплікації. Частота помилок під час синтезу РНК дорівнює: одна на 10^6 нуклеотидів. Низька надійність синтезу РНК компенсується клітиною значною кількістю копій РНК- транскриптів з одного гена.

Термінація транскрипції також ретельно регулюється, як й ініціація. За відсутності спеціальних білкових факторів термінації РНК-полімераза здатна зупиняти синтез РНК на тих термінаторах, нуклеотидна послідовність в районі яких відрізняється двома особливостями. По-перше, за ходом транскрипції знаходиться ділянка, яка містить багато GC нуклеотидів і для неї здатна центральна симетрія, по-друге, слідом йде ділянка, що складається з 4...8 розташованих поряд аденінів (полі-А). Транскрипція закінчується наприкінці полі-А послідовності, або одразу після неї. Вважають, що після проходження РНК-полімеразою першої ділянки, в РНК-продуктів виникає «шпилька», що призводить до зупинки ферменту і звільнення РНК-продукту.

РЕГУЛЯЦІЯ ТРАНСКРИПЦІЇ

Всі процеси, що відбуваються в бактеріальній клітині, - створення амінокислот, нуклеотидів, реплікація, трансляція, звільнення енергії - потребують участі білків. Однак, енергетичних ресурсів клітини не вистачає для одночасного здійснення транскрипції і трансляції всіх *структурних генів* (гени, в яких закодована інформація про структуру кінцевого продукту). Тому постійно відбувається експресія лише тих генів, які кодують білки, що підтримують основні клітинні функції, а транскрипція інших структурних генів регулюється.

РЕГУЛЯЦІЯ ТРАНСКРИПЦІЇ У БАКТЕРІЙ

У бактерій часто білки одного метаболічного шляху кодуються суміжними структурними генами. Нуклеотидна послідовність, у якій закодовано більше одного білка, називається *опероном*. Звичайно оперон перебуває під контролем єдиного промотору, і при його транскрипції утворюється одна довга молекула мРНК, що кодує кілька білків. За трансляції такої мРНК, у якій стоп-кодон послідовності, що кодує один білок, є сусідом зі старт-кодоном гена наступного білка, синтезується набір дискретних білків.

У більшості структурних генів *E. coli* є два сайти зв'язку для РНК-полімерази. Один з них, звичайно, являє собою нуклеотидну послідовність

ТАТААТ
АТАТТА
(ТАТА-бокс, або бокс Прибнова), а інший -
ТТГАС
ААСТГ.

ТАТА-бокс і послідовність ТТГАС розташовані за 10 (ділянка - 10) і 35 (ділянка -35) нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції відповідно (нуклеотид +1). Звичайно, від ділянки між ТАТА-боксом і нуклеотидом +1 набагато залежить, чи буде відбуватися транскрипція даного оперона. Для вмикання й вимикання різних оперонів у ході еволюції сформувалася безліч регуляторних систем.

Відповідно до моделі оперона нуклеотидна послідовність містить, якнайменш, чотири компоненти регулювання: структурний ген (або гени, що контролюють взаємозв'язані біохімічні функції S_1 , S_2 , S_3), ген-регулятор (R), ген-оператор (O), ген-промотор (P) (рис. 1).

Ген-регулятор визначає структуру білка репресора. Білок-репресор здатний зв'язуватися з ген-оператором (O), у цьому разі процес *зчитування інформації припиняється*, оскільки РНК-полімераза не може пересуватися вздовж молекули ДНК. Ген-оператор (O) відповідає за порядок зчитування інформації, ген-промотор (P) є початковою ділянкою для зв'язування РНК-полімери, ферменту, який каталізує транскрипцію ДНК в мРНК.

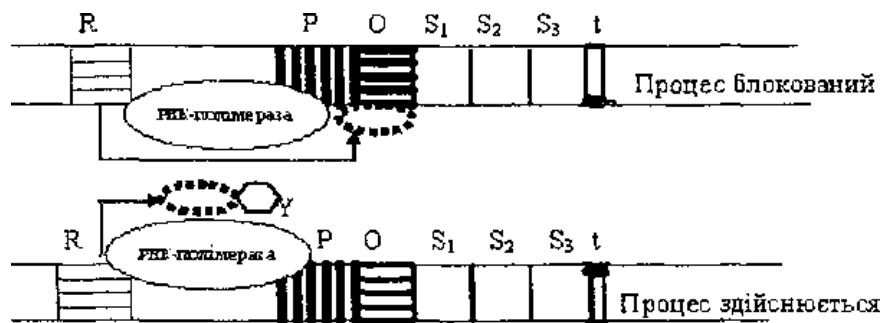


Рис. 1. Модель оперона: R – ген-регулятор, P – ген-промотор, O – ген-оператор, S_1 , S_2 , S_3 – структурні гени, t – термінуюча ділянка, Y – речовина індуктор

Якщо у середовище додати речовину-індуктор (Y), то білок репресор блокується, втрачає здатність з'єднуватися з ген-оператором і процес транскрипції здійснюється. Звичайно індуктор руйнується клітинними ферментами. Коли його концентрація знижується, репресор зв'язується з операторною ділянкою, і транскрипція знову припиняється. Операторна ділянка специфічна для кожного оперона, а індуктор взаємодіє тільки з певним репресором.

У разі, коли необхідно, щоб експресія відбувалася постійно, проводять мутації в гені-регуляторі, тоді змінюється структура білка-репресора і він

втрачає здатність зв'язуватися з геном-оператором, або мутацію здійснюють у гені-операторі, тоді білок-репресор не розпізнає його і зв'язок також не відбувається. Такі мутанти мають назву *конститутивні мутанти*.

РЕГУЛЯЦІЯ ТРАНСКРИПЦІЇ У ЕУКАРІОТ

У еукаріот більшість структурних генів складається з декількох дискретних ділянок, що кодують (*екзонів*), розділених ділянками, що не кодують (*інтронами*). По завершенні транскрипції еукаріотичного структурного гена інтрони вирізають із первинного продукту транскрипції за допомогою ферментів (*процесинг*), а екзони скріплюються один з одним «торець у торець» (*сплайсинг*) з утворенням функціональної мРНК (рис. 2).

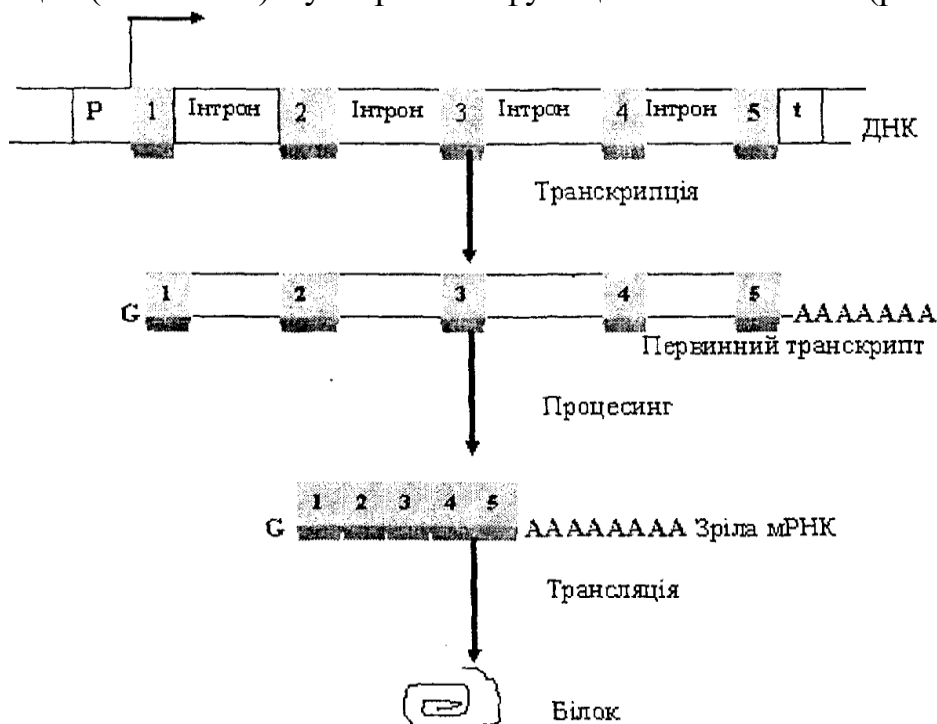


Рис. 2. Схематичний процес реалізації інформації еукаріотичного структурного гена: 1, 2, 3, 4, 5 – структурні гени

Звичайно довжина екзонів становить від 150 до 200 нуклеотидів, а довжина інтронів варіює від 40 до 10000 нуклеотидів. Деякі еукаріотичні структурні гени взагалі не мають інтронів.

Іноді сплайсинг мРНК може проходити альтернативним шляхом. Наприклад, в одній тканині функціональна мРНК може утворюватися за з'єднання всіх екзонів первинного транскрипта, а в іншій якийсь екзон буде вирізаний разом із фланкуючими його інтронами й утвориться інша функціональна мРНК. Завдяки альтернативному сплайсингу в різних тканинах можуть утворюватися різні продукти того самого структурного гена (рис. 3, 4).

Для включення й вимикання транскрипції різних еукаріотичних структурних генів використовується безліч різноманітних високоспецифічних процесів. Але так чи інакше регуляція транскрипції в еукаріот здійснюється за допомогою специфічних білків і факторів транскрипції. Багато хто з них

зв'язується безпосередньо з нуклеотидною послідовністю завдовжки менше 10 п.н., що називається регуляторним елементом. На відміну від прокаріот в еукаріот оперони здебільшого відсутні, тобто кожний еукаріотичний структурний ген має власний набір регуляторних елементів. Істотну роль у регуляції транскрипції в еукаріот, крім опосередкованої взаємодії між ДНК і білками, грають також білок-білкові взаємодії.

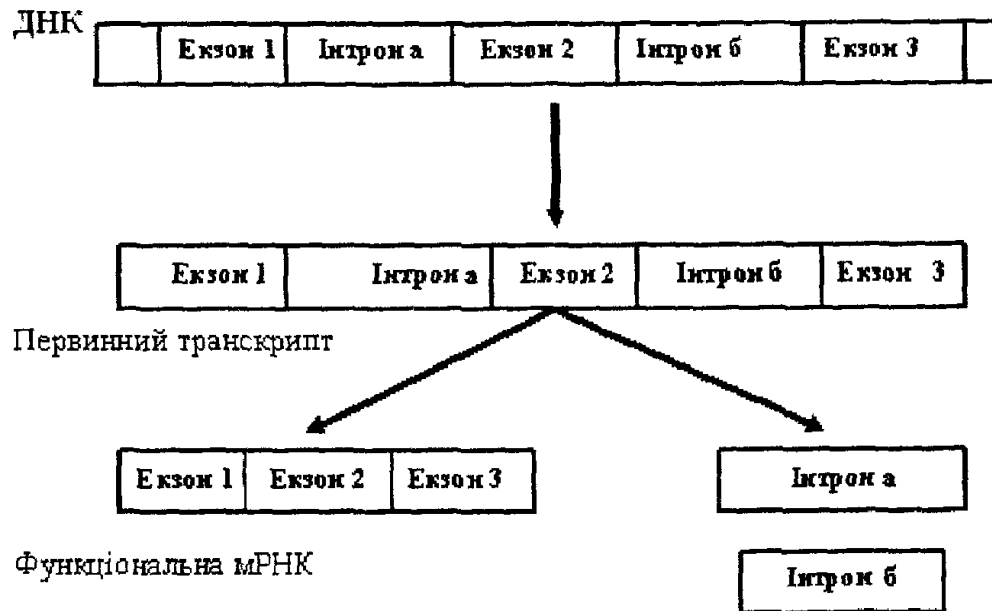


Рис. 3. Сплайсинг первинного транскрипту в еукаріот

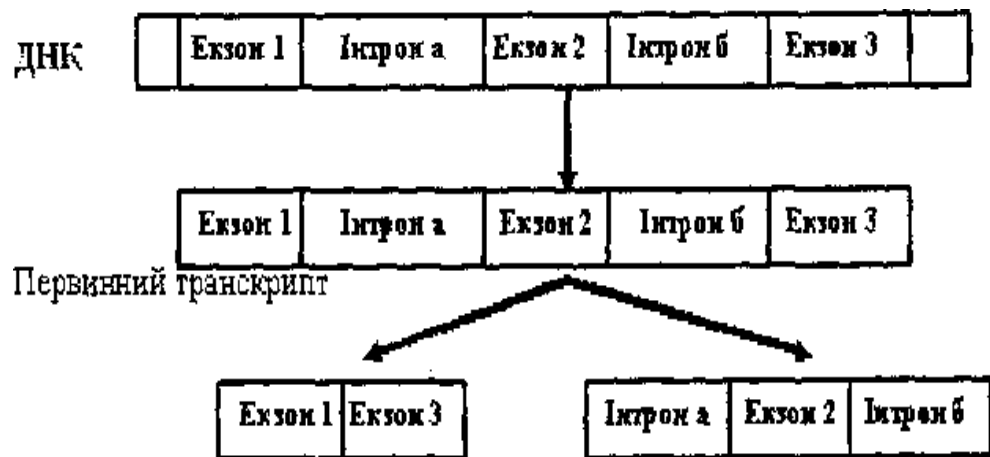


Рис. 4. Альтернативний сплайсинг первинного транскрипту в еукаріот

Незважаючи на індивідуальність набору регуляторних елементів у структурних генів еукаріот, кожен з них має промоторну ділянку (ТАТА-бокс, або бокс Хогнесса) з восьми нуклеотидів, що включає послідовність

ТАТА; послідовність ССААТ (САТ-бокс); ділянку з повторюваних дінуклеотидів GC (GC-бокс). Ці елементи перебувають на відстані 25, 75 і 90 п.н. від сайту ініціації, відповідно. Транскрипція структурного гена еукаріот починається зі зв'язування із ТАТА-боксом фактора транскрипції, що являє собою комплекс, принаймні, з 14 білків. Надалі з ними зв'язуються інші фактори транскрипції, і, нарешті, з усім цим транскрипційним комплексом зв'язується РНК-полімераза II. Далі, за участі додаткових факторів, відбувається ініціація транскрипції.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (9) термінів: альтернативний сплайсинг, антикодон, банк генів, блот-гібридизація за Саузерном, виродженність генетичного коду, гібридизація ДНК, ГМО, довгі кінцеві повтори, ініціюючий кодон.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке транскрипція?
2. За яким напрямом здійснюється потік генетичної інформації у клітині?
3. Характеристика РНК, її види.
4. Що відбувається у ході транскрипції?
5. З яких стадій складається цикл транскрипції? Поясніть їх.
6. Регуляція транскрипції.
7. Регуляція транскрипції у бактерій.
8. Регуляція транскрипції у еукаріот.

3. Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Досягнення та перспективи генетичної інженерії»;
2. «Запрограмована клітинна смерть - апоптоз»;
3. «Генетична природа онкогенезу».

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №14

ТРАНСЛЯЦІЯ

Трансляція - це процес декодування мРНК, внаслідок якого інформація з мови послідовності основ мРНК переводиться на мову амінокислотної послідовності білка. В цьому процесі погоджено взаємодіють більше сотні видів макромолекул. Крім рибосом необхідні молекули тРНК, ферменти, що активують, розчинні фактори та мРНК.

У клітині, що активно синтезує білки, містяться до 60 різних видів тРНК. тРНК - це лінійна одноланцюгова молекула завдовжки від 75 до 93 нуклеотидів. У ній є декілька взаємокомплементарних ділянок, що спаровуються між собою. За допомогою специфічних ферментів (аміноацил-тРНК - синтетаз) до 3'-кінця тРНК приєднується відповідна амінокислота. Для кожної із двадцяти амінокислот, з яких складаються всі білки, існує принаймні одна специфічна тРНК. На іншому кінці молекули тРНК розташована послідовність із трьох нуклеотидів, що називається *антикодомом*. Вона розпізнає специфічний кодон у мРНК і визначає, яка саме амінокислота буде приєднана до зростаючого поліпептидного ланцюга (рис. 1).

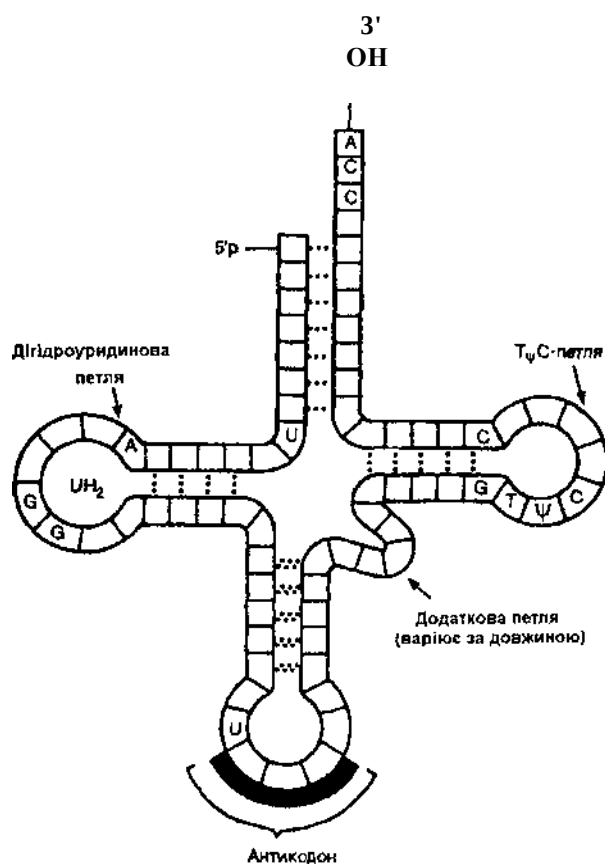


Рис. 1. Будова молекули тРНК

Синтез білка здійснюється шляхом послідовної поліконденсації окремих амінокислотних залишків, починаючи з аміно-(N)-кінця поліпептидного ланцюга у напрямку карбоксильного (C)-кінця. Транскрипції передують активація тРНК - приєднання амінокислоти до 3'-кінцевого аденозину молекули тРНК з утворенням аміноацил- тРНК.

Синтез білка відбувається за три стадії:

1 - ініціація забезпечує зв'язування ініціаторної тРНК із сигналом початку трансляції в мРНК, при цьому ініціаторна тРНК займає Р-ділянку рибосоми, одну з двох ділянок зв'язування тРНК;

2 - елонгація починається зі зв'язування аміноацил-тРНК з іншою ділянкою зв'язку на рибосомі (А-ділянкою) з наступним утворенням пептидного зв'язку із другої аміноацил-тРНК, що поєднана з ініціаторною тРНК. Діпептидил-тРНК пересувається з А-ділянки у Р-ділянку, нова амінокислота зв'язується з А- ділянкою, що звільнилася, і починається новий цикл реакції елонгації;

3 - термінація відбувається коли стоп-кодон (сигнал термінації) в молекулі тРНК зчитується фактором звільнення білка, що викликає відокремлення завершеного поліпептидного ланцюга від рибосоми.

Яким чином молекула тРНК розпізнає власну амінокислоту? Існує спеціальний набір ферментів, так званих аміноацил-тРНК- синтетаз, що приєднують амінокислоти до відповідних молекул тРНК. Кожній з амінокислот відповідає власна особлива синтетаза: вона приєднує аденін до аденінової тРНК, гліцин - до гліцинової та ін.

Аміноацил-тРНК-синтетаза виконує роль адаптера, здійснює високоспецифічну підгонку однієї молекулярної поверхні до іншої.

Молекули тРНК відіграють роль кінцевих адаптерів за переведення інформації, що закодована в нуклеотидній послідовності, на мову білка. Таким чином, генетичний код розшифровується за допомогою двох взаємопов'язаних наборів адаптерів.

Матрична мРНК може бути представлена десятками різних типів молекул, а рРНК - усього двома типами. Більша рРНК утворює із білками рибонуклеопротейдний комплекс, названий великою рибосомною субодиницею, а рРНК меншого розміру комплекс, названий малою рибосомною субодиницею. Під час синтезу білків субодиниці поєднуються з утворенням рибосоми. В еукаріот обидві рибосомні субодиниці крупніші, ніж у прокаріот.

Усі етапи білкового синтезу стають можливими внаслідок того, що трансляція здійснюється великим мультиферментним комплексом - рибосомою, що складається з молекул білків і РНК. Протягом усього процесу синтезу білка зростаючий поліпептидний ланцюг, мРНК і чергова аміноацил-тРНК залишаються прикріпленими до рибосоми. В рибосомах обох типів є борозенка, яка утримує зростаючий поліпептидний ланцюг, і борозенка, що утримує молекулу мРНК. Довжина борозенок така, що у першій розміщується до 30 амінокислот, а у другій - до 35 нуклеотидів РНК.

У рибосомі є дві ділянки, що зв'язують молекули тРНК. Одна з них

утримує молекулу тРНК, що приєднана до зростаючого кінця поліпептидного ланцюга; тому її називають пептидил-тРНК- сполучною ділянкою, або Р-ділянкою. Інша затримує щойно прибулу молекулу тРНК, що навантажена амінокислотою; її називають аміноацил-тРНК-сполучною ділянкою, або А-ділянкою. До обох ділянок молекула тРНК прикріплюється лише в тому разі, якщо її антикодон парується із комплементарним до нього кодоном мРНК. А- і Р-ділянки розташовані дуже близько одна до одної і так, що дві пов'язані з ними молекули тРНК спаровуються із двома сусідніми кодонами в молекулі мРНК

Якщо А-ділянка рибосоми занята одним із стоп-кодонів: UAA, UGA або UAG, то спаровування аміноацил-тРНК, як правило, не відбувається. Нормальні клітини не містять тРНК з антикодонами, комплементарними сигналам термінації. Останні розпізнаються білковими факторами звільнення, що свідчить про те, що білки здатні розпізнавати тринуклеотидні послідовності з високим ступенем точності.

Зв'язування фактора звільнення змінює активність пептидилтрансферази, тому вона тепер приєднує до пептидил-тРНК не вільну аміногрупу амінокислоти, а молекулу води. Внаслідок цього карбоксильний кінець поліпептидного ланцюга відокремлюється від молекули тРНК. Оскільки зростаючий поліпептид утримується на рибосомі лише за рахунок зв'язку з молекулою тРНК, завершений білковий ланцюг виявляється звільненням і, після відокремлення від рибосоми, потрапляє у цитоплазму.

ГЕНЕТИЧНИЙ КОД

Довжина білкових молекул варіює від 40 до більше 1000 амінокислотних залишків, при цьому залежно від їхньої послідовності та амінокислотного складу молекули білків набувають різної форми (конфігурацію, конформацію). Більшість функціонально активних білків складається із двох і більше поліпептидних ланцюгів (субодиниць), як ідентичних, так і дещо різних.

Білкові молекули створюють складні просторові структури, але загальний принцип їх організації полягає в тому, що структури вищого порядку визначаються безпосередньо структурою нижчого порядку, тобто послідовністю амінокислот у білкової молекулі. Таким чином, у молекулі ДНК записана інформація про первинну структуру білкової молекули.

Структура ДНК не залежить від послідовності пар нуклеотидів, але саме ця послідовність несе інформацію про послідовність амінокислот у білковій молекулі. Ген та його продукт колінеарні (від лат. *сop* - разом і *lіnea* - лінія), тобто колінеарність - це відповідність між послідовністю нуклеотидів у молекулі ДНК і послідовністю амінокислот у молекулі білка.

Поеднання трьох нуклеотидів розміщених поряд, формує генетичний код. Кожен триплет нуклеотидів, або кодон, визначає введення в

поліпептидну структуру однієї амінокислоти. Те, що кодони створенні з трьох нуклеотидів, пов'язане з необхідністю кодувати 20 амінокислот. Два нуклеотиди надають лише 16 варіантів кодонів $4^2 = 16$, (4 — кількість нуклеотидів, 2 - кількість нуклеотидів поєднана), кількість їх недостатня для кодування 20 амінокислот, у той час, як за поєднання трьох нуклеотидів маємо 64 варіанти: $4^3 = 64$. З них 61 кодон визначають амінокислоти, а три - є сигналами, що свідчать про закінчення синтезу, а один - AUG (в РНК замість Т /тиміну/ утворюється U /урацил/) старт-кодон, який кодує ще і амінокислоту метіонін.

Експериментальне підтвердження триплетної природи коду було отримано на початку 60-х років у генетичних експериментах, проведених С. Бреннером і Ф. Криком. Дослідження здійснювалися на бактеріофагу Т4. За допомогою акридинів було отримано мутанти зі вставками або делеціями нуклеотидів ДНК. Проведеними схрещуваннями виявили, що вставляння або випадання одної пари нуклеотидів обов'язково викликають утворення аномальних білків з порушеною функцією. Такий самий ефект спостерігається під час вставляння або делеції двох пар нуклеотидів у межах одного гена.

Якщо всередині незначної частини гена відбувається три вставляння або делеції, білок, що синтезується, часто зберігає активність.

Для генетичного коду характерна така особливість, як виродженість — це означає, що кілька кодонів кодують одну і ту ж амінокислоту (табл. 1).

Генетичний код і частота використання

Амінокислота	Частота використання		Кодон	Амінокислота	Частота використання	
	<i>E. coli</i>	<i>Homo sapiens</i>			<i>E. coli</i>	<i>Homo sapiens</i>
Гліцин	0,13	0,23	UAG	Стоп	0,09	0,17
Гліцин	0,09	0,26	UAA	Стоп	0,62	0,22
Гліцин	0,38	0,18	UAU	Тирозин	0,53	0,42
Гліцин	0,40	0,33	UAC	Тирозин	0,47	0,58
Глутамінова кислота	0,30	0,59	UUU	Фенілаланін	0,51	0,43
Глутамінова кислота	0,70	0,41	UUC	Фенілаланін	0,49	0,57
Аспарагінова кислота	0,59	0,44	UCG	Серин	0,13	0,06
Аспарагінова кислота	0,41	0,56	UCA	Серин	0,12	0,15
Валін	0,34	0,48	UCU	Серин	0,19	0,17
Валін	0,17	0,10	UCC	Серин	0,17	0,23
Валін	0,29	0,17	AGU	Серин	0,13	0,14
Валін	0,20	0,25	AGC	Серин	0,27	0,25
Аланін	0,34	0,10	CGG	Аргінін	0,08	0,19
Аланін	0,22	0,22	CGA	Аргінін	0,05	0,10
Аланін	0,19	0,28	CGU	Аргінін	0,42	0,09
Аланін	0,25	0,40	CGC	Аргінін	0,37	0,19
Лізін	0,24	0,60	AGG	Аргінін	0,03	0,22
Лізін	0,76	0,40	AGA	Аргінін	0,04	0,21
Аспарагін	0,39	0,44	CAG	Глутамін	0,69	0,73
Аспарагін	0,61	0,56	CAA	Глутамін	0,31	0,27
Метіонін, старт	1,00	1,00	CAU	Гістидин	0,52	0,41
Ізолейцин	0,07	0,14	CAC	Гістидин	0,48	0,59
Ізолейцин	0,47	0,35	CUG	Лейцин	0,55	0,43
Ізолейцин	0,46	0,51	CUA	Лейцин	0,03	0,07
Треонін	0,23	0,12	CUU	Лейцин	0,10	0,12
Треонін	0,12	0,27	CUC	Лейцин	0,10	0,20
Треонін	0,21	0,23	UUG	Лейцин	0,11	0,12
Треонін	0,43	0,38	UUA	Лейцин	0,11	0,06
Триптофан	1,00	1,00	CCG	Пролін	0,55	0,11
Цистин	0,43	0,42	CCA	Пролін	0,20	0,27
Цистин	0,57	0,58	CCU	Пролін	0,16	0,29
Стоп	0,30	0,61	CCC	Пролін	0,10	0,33

Завдяки виродженості помилки, що виникають при зчитуванні, не завжди супроводжуються перекрученням генетичної інформації і порушенням експресії - процесу реалізації генетичної інформації, що міститься в ДНК,

В усіх випадках дво-, три- і чотириразової виродженості зміна відбувається тільки в третьому нуклеотиді триплету. Наприклад, зміни третього нуклеотиду в кодонах, що відповідають за синтез гліцину, не викликає відповідної зміни його поліпептидної структури, оскільки специфічність кодонів визначається головним чином першими двома нуклеотидами.

Кодони не здатні перекриватися, це означає, що залежно від точки старту можливі три варіанти зчитування генетичної інформації. Якщо для зчитування використовується лише одна рамка, то при додаванні або віддаленні одного або двох нуклеотидів відбувається зсування «рамки зчитування». При цьому нуклеотидна послідовність нової рамки стане зовсім іншою і в ній буде закодована послідовність амінокислот, що позбавлено функціонального смислу. У разі трьох вставок або делецій активність білка відновлюється. При цьому відбувається додавання або втрата однієї амінокислоти, але рамка зчитування відновлюється.

Основні властивості генетичного коду:

1. Триплетність — доказана в генетичних експериментах і підтверджена біохімічним синтезом. Одна амінокислота визначається послідовністю з трьох нуклеотидів - кодону.

2. Код не перекривається. Кодони ідуть один за одним без розділових знаків, тобто два кодони не мають загальних нуклеотидів. Зчитування інформації починається із фіксованого нуклеотиду, який задає необхідну рамку.

3. Код вироджений. Більшість амінокислот кодується більш ніж одним кодоном, а кожен кодон визначає лише одну амінокислоту. Кодони, що відповідають одній тій самій амінокислоті, називаються кодонами - синонімами. Більшість синонімів розрізняється лише останньою основою триплету, тобто код вироджений за третьою основою. Можливо біологічний сенс виродженості генетичного коду полягає в тому, що ефект мутацій зводиться до мінімуму. За такої організації коду заміна основи виникла випадково, що із значною вірогідністю приведе до заміни на подібну амінокислоту або ж заміни не відбудеться зовсім.

4. Код універсальний. Генетичний код розшифрований внаслідок досліджень у безклітинних системах, отриманих з бактерій, тому було необхідно підтвердити, що результати, які отримані *in vitro*, справедливі *in vivo*. Прямий доказ універсальності отримано за порівняння нуклеотидних послідовностей ДНК і відповідних амінокислотних послідовностей. Виявилося, що в усіх бактеріальних і еукаріотичних геномах для кодування амінокислот використовуються одні ті ж набори триплетів нуклеотидів. Універсальність коду (за незначним винятком) свідчить про його раннє походження в еволюції. Можливо, на ранніх етапах лише дві перші основи

були для розпізнавання, а роль третьої основи визначилася пізніше. У певний час код був «заморожений» в його сучасному вигляді. Будь-яка мутація, що змінює код, змінює послідовність амінокислот у більшості білків. Багато з цих змін можуть бути летальними. Отже, має існувати сильний тиск проти таких мутацій. Однак, в останні роки за вивчення процесу біосинтезу білка в мітохондріях були виявлені відхилення від універсального коду. Наприклад, для всіх геномів в ДНК мітохондрій кодон UGA читається так саме, як UGG і тому є не кодоном-термінатором, а кодоном для триптофану. Також, виявлено специфічні зміни коду мітохондріальної ДНК для окремих видів. Так, у дріжджів кодон CUA кодує треонін замість лейцину, у ссавців AUA має таке саме значення, як й AUG, і визначає метіонін замість ізолейцину, а кодони AGA та AGC не кодують аргінін, а є термінаторами.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (9) термінів: клонування генів, лінкер, матричний ланцюг, міссенс-мутація, нонсенс-мутація, онкоген, оперон, первинний транскрипт, регулон.

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке трансляція?
2. Яким чином здійснюється синтез білку?
3. Вкажіть та охарактеризуйте стадії синтезу білку.
4. Яким чином молекула тРНК розпізнає власну амінокислоту?
5. Що таке генетичний код, які вчені дослідили це явище?
6. Вкажіть основні властивості генетичного коду, поясніть їх.

3. Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:

1. «Метилування ДНК»;
2. «Оперонна організація генетичного матеріалу у бактерій»;
3. «Організація генетичного матеріалу в еукаріот».

4. Розрахуйте задачі:

Задача № 1. Послідовність нуклеотидів з початку гена, що зберігає інформацію про білок інсулін починається так:

АААЦАЦЦТГЦТТГТАГАЦ

Напишіть послідовність амінокислот, з якої починається ланцюг інсуліну. Рішення даної задачі виконується на підставі вищевказаної таблиці

Генетичний код

Перша основа	Друга основа				Третя основа
	У (А)	Ц (Г)	А (Т)	Г (Ц)	
У (А)	Фен Фен Лей Лей	<i>Сер</i> <i>Сер</i> <i>Сер</i> <i>Сер</i>	Тир Тир - -	Цис Цис - Три	У (А) Ц (Г) А (Т) Г (Ц)
Ц (Г)	Лей Лей Лей Лей	Про Про Про Про	Гис Гис Гли Гли	Арг Арг Арг Арг	У (А) Ц (Г) А (Т) Г (Ц)
А (Т)	Иле Иле Иле Мет	Тре Тре Тре Тре	Асн Асн Лиз Лиз	Сер Сер Арг Арг	У (А) Ц (Г) А (Т) Г (Ц)
Г (Ц)	Вал Вал Вал Вал	Ала Ала Ала Ала	Асп Асп Глу Глу	Гли Гли Гли Гли	У (А) Ц (Г) А (Т) Г (Ц)

Двадцять амінокислот, що входять до складу білків

Скорочена назва	Амінокислота	Скорочена назва	Амінокислота
Ала	Аланин	Лей	Лейцин
Арг	Аргинин	Лиз	Лизин
Асн	Аспарагин	Мет	Метионин
Асп	Аспарагиновая к.	Про	Пролин
Вал	Валин	Сер	Серин
Гис	Гистидин	Тир	Тирозин
Гли	Глицин	Тре	Треонин
Гли	Глутамин	Три	Триптофан
Глу	Глутаминовая к.	Фен	Фенилаланин
Иле	Изолейцин	Цис	Цистеин

Задача № 2. Вірусом тютюнової мозаїки (РНК- вмісний вірус) синтезується ділянка білку з амінокислотою:

Ала – Тре – Сер – Глу – Мет-

Під дією азотистої кислоти (мутагенний фактор) цитозин в результаті дезамінування перетворюється на урацил. Яку будову буде мати ділянка білку віруса тютюнової мозаїки, якщо в усіх цитоділових нуклеотидах відбудеться вказане хімічне перетворення?

Задача № 3. Фрагмент гену ДНК має наступну послідовність нуклеотидів ТЦГГТЦААЦТТАГЦТ. Визначте послідовність нуклеотидів іРНК та амінокислот у поліпептидному ланцюгу білку.

Задача № 4. Ділянка молекули має наступну послідовність амінокислот: аланін-цистеїн-валін-серин-гліцин-треонін. Визначте одну із можливих послідовностей нуклеотидів у молекулі ДНК.

Задача № 5. Ділянка молекули має наступну послідовність амінокислот: серин-глутамін-аспаригін-триптофан. Визначте одну із можливих послідовностей нуклеотидів у молекулі іРНК.

Задача № 6. Фрагмент гену ДНК має наступну послідовність нуклеотидів ГТЦЦТААЦЦГГАТТТ. Визначте послідовність нуклеотидів іРНК та амінокислот у поліпептидному ланцюгу білку.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №15

МУТАЦІЇ

Існування біологічних видів, а отже, і феномена життя цілком залежить від точності передачі генетичної інформації як по вертикалі - від організмів-батьків нащадкам, так і по горизонталі - від однієї соматичної клітини до іншої в процесі онтогенетичного розвитку багатоклітинних організмів. Для правильної передачі генетичної інформації дуже важливі й молекулярні механізми, що забезпечують розбіжність хромосом, що подвоїлися, між дочірніми клітинами в про- і еукаріот, в останньому випадку за мітози й мейози. Однак, жодна з існуючих генетичних систем не працює безпомилково. Тому не менш важливу роль у життєдіяльності організму відіграє його *система репарації* (виправлення) помилок, що випадково виникають за реплікації ДНК і після її завершення.

Проблема точності передачі генетичної інформації в ряді поколінь клітин і організмів має й інший бік. Надмірне консервування генетичної інформації, що є в окремих генетичних локусах, може бути шкідливою для організму й виду в цілому. Зокрема, одним із механізмів, що лежать в основі виникнення різноманітності антитіл, є запрограмовані зміни генів імуноглобулінів, які закріплюються в геномі лімфоцитів у результаті їхнього відбору в онтогенезі. Іншим добре відомим прикладом такого роду є генетична мінливість вірусу грипу. Нарешті, абсолютний консерватизм у передачі генетичної інформації з вертикалі зробив би неможливим філогенетичний розвиток організмів, їхні еволюційні перетворення, що забезпечили, в остаточному підсумку, ту різноманітність біологічних видів, що сьогодні спостерігаються в природі. Еволюційно сформовані відносини між точністю функціонування вищезгаданих генетичних систем і частотою помилок, що виникають за відтворення генетичної інформації окремих генетичних локусів, чітко збалансовані між собою, і вже встановлено, що в ряді випадків є регульованими. Зміни генома, що запрограмовані або випадково успадковуються, названі мутаціями, можуть супроводжуватися колосальними кількісними і якісними змінами в експресії генів.

Мутації — це успадковані зміни структури генома. Оскільки основу будь-якого генома складають нуклеїнові кислоти - ДНК або РНК, то під дією мутацій відбувається, насамперед, зміна структури геномних нуклеїнових кислот. Процес виникнення мутацій, заснований на різних механізмах, називають мутагенезом. Залежно від факторів, що викликають мутації, останні прийнято поділяти на спонтанні й індуковані. Вважається, що спонтанні мутації виникають мимовільно протягом усього життя організму в нормальних для нього умовах навколишнього середовища. При цьому широке розповсюдження дістала думка про те, що спонтанні мутації в еукаріотичних клітинах виникають із частотою 10^{-9} ... 10^{-12} на нуклеотид за клітинну генерацію. Тепер, однак, стає ясно, що такі цифри не відображають реальності. Вони не враховують того факту, що частоти спонтанних мутацій

можуть істотно (на кілька порядків) змінюватися від локуса до локуса й, швидше за все, вказують на нижню межу частоти мутацій в окремих найбільш стабільних ділянках генома.

Індукованими мутаціями називають спадкові зміни генома, що виникають у результаті тих чи інших мутагенних впливів у штучних (експериментальних) умовах або за несприятливих впливів навколишнього середовища. Серед найважливіших мутагенних факторів насамперед слід назвати хімічні мутагени - органічні й неорганічні речовини, що викликають мутації, а також іонізуюче випромінювання. За детального розгляду спонтанних та індукованих мутацій стає зрозумілим, що між цими двома типами немає істотних різниць. Дійсно, більшість спонтанних мутацій виникає в результаті мутагенного впливу, що їх індукує, але не реєструється експериментатором. Більш достовірною можна вважати класифікацію мутацій, у якій ураховуються молекулярні процеси, що лежать в основі їхнього виникнення.

У класифікації, заснованій на розмірах сегментів генома, що піддаються перетворенням, мутації поділяють на *геномні*, *хромосомні* й *генні* (рис. 1). За геномних мутацій в організмі-мутанті відбувається раптова зміна числа хромосом, кратна цілому геному. Якщо через $2n$ позначити число хромосом у вихідному диплоїдному геномі, то в результаті геномної мутації, названої *поліплоїдизацією*, відбувається утворення поліплоїдних організмів, геном яких представлений $4n$, $6n$ і т.д. хромосомами. Залежно від походження хромосом у поліплоїдах розрізняють *алополіплоїдію*, у результаті якої відбувається об'єднання за гібридизації цілих неспоріднених геномів, і *аутополіплоїдію*, для якої характерно адекватне збільшення числа хромосом власного генома, що кратне $2n$. За геномних мутацій відбуваються також зміна числа окремих хромосом у геномі (*анеуплоїдія*), наприклад, трисомія ($2n + 1$), моносомія ($2n - 1$). Зменшення числа хромосом у каріотипі вдвічі має назву - *гаплоїдія*. В цьому разі соматичні клітини гаплоїдного організму містять одинарний (гаплоїдний) набір хромосом (n).

Великі перебудови структури окремих хромосом дістали назву **хромосомних аберацій**. Розрізняють міжхромосомні аберації. До міжхромосомних перебудов належать *транслокації* - обмін ділянками між різними хромосомами. До внутрішньохромосомних перебудов відносяться: *делеції* - випадання ділянки хромосоми в середній її частині (у разі випадання кінцевої ділянки виникає кінцева делеція - дефішенс); *дуплікації* - подвоєння певної ділянки хромосоми, інколи багаторазове поєднання - мультиплікація (або ампліфікація) ділянки; *інверсія* - виникнення в результаті розриву хромосоми одночасно в двох місцях із поворотом створеної ділянки на 180° ; *фрагментація* - відбувається внаслідок розриву хромосом у декількох місцях одночасно із утворенням окремих фрагментів хромосом з наступною втратою тих, що не містять центроміри.

Транспозиція - зміна локалізації невеликих ділянок генетичного матеріалу та інсерція (вставка) - внесення додаткових фрагментів хромосоми - можуть відбуватися як за міжхромосомними так і внутрішньохромосомними

перебудовами.

На генному рівні зміни первинної структури ДНК генів під дією мутацій менш значні, ніж за хромосомних мутацій, однак генні мутації трапляються частіше.

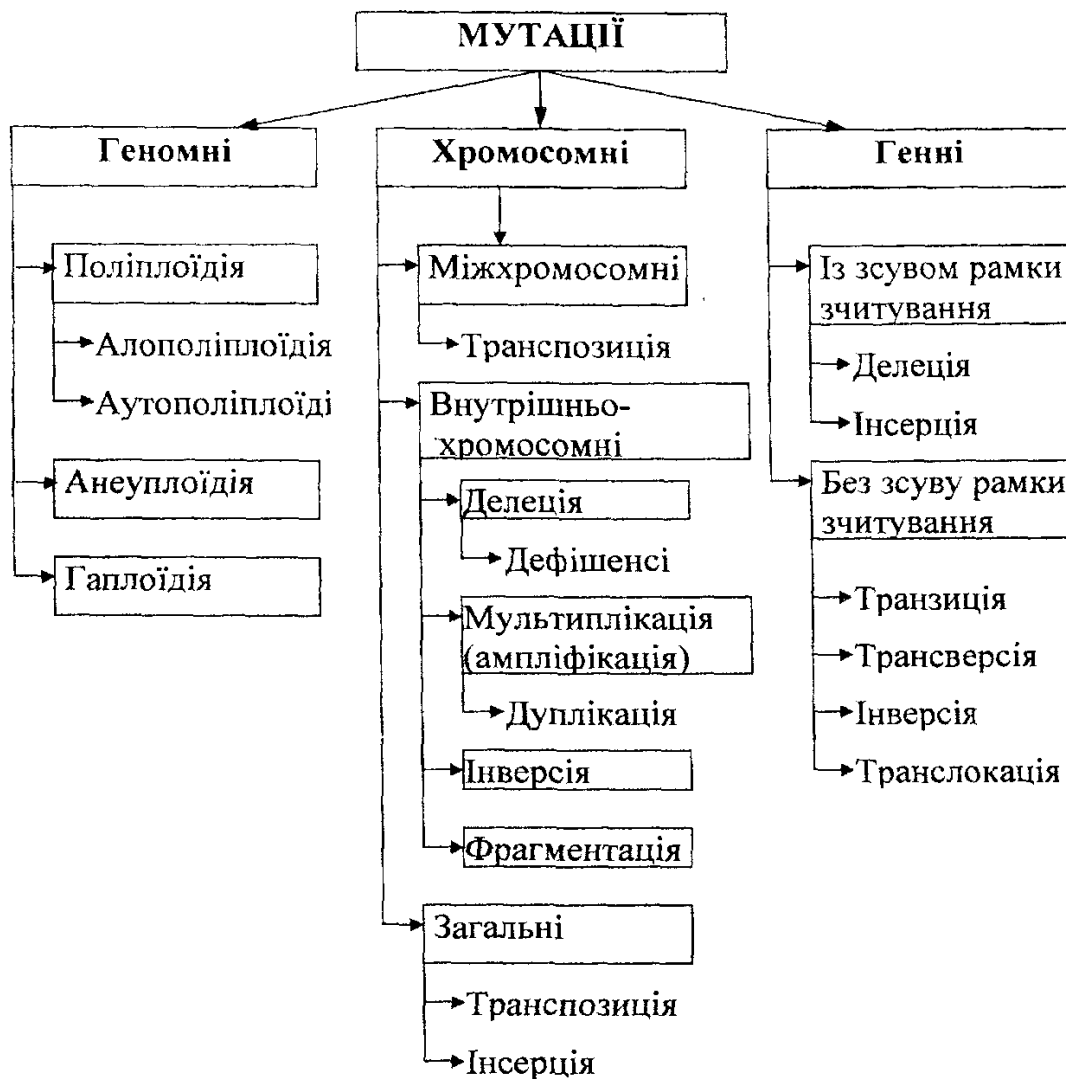


Рис. 1. Види мутацій

Внаслідок генних мутацій відбуваються заміни, делеції й вставки одного або декількох нуклеотидів, місенс-мутації, сіменс-мутації й нонсенс-мутації різних частин гена. У разі, коли під дією мутації змінюється лише один нуклеотид, говорять про *точкові мутації*. Оскільки до складу ДНК входять азотисті основи тільки двох типів — пурини й піримідини, всі точкові мутації із заміною основ поділяють на два класи: *транзиції* (заміна пурину на пурин або піримідину на піримідин) і *трансверсії* (заміна пурину на піримідин або навпаки). Завдяки виродженості генетичного коду є три генетичних наслідки точкових мутацій: збереження смислу кодона (синонімічна заміна нуклеотиду), зміна смислу кодона, що приводить до заміни амінокислоти у відповідному місці поліпептидного ланцюга (місенс-мутація) або утворення безглузлого кодона з передчасною термінацією (нонсенс-мутація). У

генетичному коді є три безглузких кодони: амбер - UAG, охр — UAA і опал - UGA. Відповідно до цього отримують назву й мутації, що приводять до утворення безглузких триплетів (наприклад амбер-мутація).

За впливом на експресію генів мутації розподіляють на дві категорії: мутації типу *замін* пар основ і типу *зсуву рамки зчитування*. Останні являють собою делеції або вставки нуклеотидів, число яких не кратне трьом, що пов'язане із триплетністю генетичного коду. Первинну мутацію іноді називають *прямою мутацією*, а мутацію, що відновлює вихідну структуру гена, - *зворотною мутацією, або реверсією*. Повернення до вихідного фенотипу мутантного організму внаслідок відновлення функції мутантного гена нерідко відбувається не за рахунок дійсної реверсії, а внаслідок мутації в іншій частині того ж гена або навіть іншого неалельного гена. У цьому разі зворотну мутацію називають *супресорною*. Генетичні механізми, завдяки яким відбувається супресія мутантного фенотипу, досить різноманітні.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. У словник молекулярної біології надайте визначення наступних (10) термінів: репресор, рестрикційна карта, сайт рестрикції, ТАТА-бокс, термінуючий кодон, транзиція, трансверсія, хромосома, химера, штучна бактеріальна хромосома .

2. За наступними питаннями вивчіть вищевказаний матеріал:

1. Що таке мутації, їх значення та види?
2. Що таке мутагенез та мутагени, їх види?
3. Класифікація мутацій.
4. Геномні мутації, їх види, приклади.
5. Хромосомні мутації, їх види, приклади.
6. Генні мутації, їх види, приклади.

3. **Самостійне опрацювання (записати в зошит та зробити презентації в режимі «Power point») на наступні теми:**

1. «Фолдінг білків та його фактори»;
2. «Програма «Геном людини»»;
3. «Онкогени і антионкогени».

4. Розрахуйте задачі:

Задача № 1. Кудуючий ланцюг ДНК має наступну послідовність нуклеотидів: ТАГЦГТТТЦТЦГГТА. Як зміниться структура молекули білку, якщо відбудеться подвоєння шостого нуклеотида у ланцюгу ДНК. Поясніть результати.

Задача № 2. Кудуючий ланцюг ДНК має наступну послідовність нуклеотидів: АГАТАГГТАЦГТТЦГ. Як зміниться структура молекули білку, якщо відбудеться випадіння десятого нуклеотида у ланцюгу ДНК. Поясніть результати.

Задача № 3. Під час реплікації молекули ДНК на кодує чому ланцюзі: ТТЦАГАЦТЦТААГАТ відбулося подвоєння четвертого триплету. Поясніть, як зміниться структура молекули білку.

Задача № 4. Під дією мутагенних факторів у фрагменті гену: ГАЦЦАГТТТЦАГТТГ відбулася заміна дев'ятого нуклеотида на цитозин. Поясніть, як зміниться структура молекули білку.

Задача № 5. Під дією мутагенних факторів у фрагменті гену: ГАЦЦАГТТТЦАГЦТА відбулася заміна останнього нуклеотида на гуаніловий. Поясніть, як зміниться структура молекули білку.

Задача № 6. Під дією мутагенних факторів у фрагменті гену: ЦАТТАГГТАЦГТТЦГ відбулася заміна другого триплету на триплет АТА. Поясніть, як зміниться структура молекули білку.

Задача № 7. Під дією мутагенних факторів у фрагменті гену: АГАТАГГТАЦГТТЦГ відбулася заміна четвертого триплету на триплет АЦЦ. Поясніть, як зміниться структура молекули білку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ТА РЕКОМЕНДОВАНОЇ 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. Боєчко Ф.Ф., Боєчко 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

МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладач: **КРАМАРЕНКО** Олександр Сергійович

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 7,75

Тираж 14 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

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