

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології**

**Кафедра біотехнології та
біоінженерії**

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

методичні рекомендації

для виконання лабораторно-практичних робіт та самостійного вивчення
дисципліни за модулем «Молекулярно-біологічні основи генетичної
інженерії» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП
«Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та
біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти



Миколаїв - 2025

УДК 602.6
Г34

Рекомендовано науково-методичною комісією факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету, протокол №4 від “23” грудня 2025 р.

Укладач:

Гиль М. І. – доктор с.-г. наук, професор, академік НАНВО України, професор кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету

Рецензенти:

Дуган О. М. - професор кафедри НТУУ «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського, доктор біологічних наук, професор;

Метлицька О. І. - головний судовий експерт відділу біологічних досліджень та обліку Полтавського НДЕКЦ МВС України, докторка с.-г. наук, ст.н.сп. Метлицька О.І.

ЗМІСТ

Вступ	4
1. Структура генетичного матеріалу	5
2. Реплікація генетичного матеріалу	14
3. Транскрипція та її регуляція	18
4. Експресія генів	34
5. Синтез генів	57
6. Репарація ДНК від пошкоджень	93
Список використаної літератури	122

ВСТУП

У 1972 році П.Берг (рис. 1) з колегами вперше сконструювали гібридну ДНК на основі досягнень молекулярної генетики, що й стало датою виникнення генетичної інженерії, а через 10 років було схвалено і отримано дозвіл на виробництво першого біотехнологічного продукту – інсуліну, який синтезували генно-інженерним шляхом.

Напрямки використання генетичної інженерії, зокрема в тваринництві, охоплюють широке коло питань. Це методи цілеспрямованої корекції спадковості та одержання на цій основі тварин зі зміненим генотипом, так званих «трансгенних тварин», які володіють кращими продуктивними якостями та більш стійкі до захворювань (інтеграція трансгенів з хромосомами соматичних і генеративних клітин; тканиноспецифічні регуляторні елементи; ін'єкція рекомбінантної ДНК до зиготи; ретровірусні вектори для введення генів у генеративні клітини; трансгеноз генів, що забезпечує прискорений ріст тварин тощо). Окрім того, наразі генетична інженерія володіє методами створення вакцин нового покоління задля профілактики інфекційних хвороб у тварин, а також синтезу генно-інженерних гормонів, за допомогою яких підвищують продуктивність тварин, тощо.

Метою курсу „Генетична інженерія...” є освоєння студентами основних прийомів під час роботи з рекомбінантними нуклеїновими кислотами, генно-інженерними продуктами та генетично модифікованими організмами, зокрема і в тваринництві. Студенти повинні вивчити й закріпити знання з молекулярно-біологічних основ генетичної інженерії, набути знань й вмінь роботи по протоколах з рекДНК, знатися методів створення генно-інженерних продуктів, мати навички одержання генетично-модифікованих організмів.



Рис. 1. Пол Берг

1. СТРУКТУРА ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Хроматин

В ядрі еукаріот ДНК пов'язана з білками і РНК. Третина нуклеопротеїдного комплексу, званого хроматином (рис. 2), складає ДНК.

Хроматин можна побачити в оптичний мікроскоп лише під час ділення клітин, коли він знаходиться в конденсованому вигляді у складі хромосом. Під час інтерфази велика частина хроматину неконденсована. Морфологічно розрізняють *еухроматин* і *гетерохроматин*, який більше конденсований, ніж еухроматин. Еухроматин відповідає ділянкам хромосом з активною транскрипцією.

Білки хроматину підрозділяються на *гістонові* і *негістонові*. Гістони – невеликі, сильно основні білки, що асоціюються безпосередньо з ДНК. Вони беруть участь в структурній організації хроматину, нейтралізуючи за рахунок позитивних зарядів амінокислотних залишків негативно заряджені фосфатні групи ДНК, що робить можливою щільну упаковку ДНК в ядрі. Завдяки цьому 46 молекул ДНК диплоїдного геному людини загальною довжиною близько 2 м, що містять в сумі 6-10⁹ пар основ [п.о.], можуть поміститися в клітинному ядрі діаметром всього 10 мкм.

По дві молекули кожного з гістонів H2A, H2B, H3 і H4 складають октамер, обвитий сегментом ДНК завдовжки 146 п.о. (або – н.п.), що утворює 1,8 витка спіралі поверх білкової структури. Ця частка діаметром 7 нм називається *нуклеосомою*. Ділянка ДНК (лінкерна ДНК), що безпосередньо не контактує з гістоновим октамером, взаємодіє з гістоном H1. Цей білок закриває близько 20 п.о. і забезпечує формування суперспіральної структури (соленоїда) діаметром 30 нм. Коли хроматин конденсується з утворенням метафазної хромосоми, соленоїдні структури утворюють петлі діаметром 200 нм ДНК, що містить, завдовжки 80000 п.о. Петлі пов'язані з остовом із білків (ядерний остов), причому близько 20 петель утворюють мінідиски. Велике число мінідисків укладається в стопку, складаючи хромосому. Внаслідок цього ДНК виявляється згорнута настільки щільно, що навіть найменша хромосома людини містить близько 50 млн. п.о.

Група негістонових білків високо гетерогенна і включає структурні ядерні білки, безліч ферментів і чинників транскрипції, пов'язаної з певними ділянками ДНК та здійснюють регуляцію генної експресії й інших процесів.

Гістони

Гістонові білки цікаві з багатьох точок зору. Завдяки високому вмісту лізину і аргініну (на рис. 2 синього кольору) вони, як уже згадувалося, проявляють сильно основні властивості. Крім того, послідовність амінокислот гістонів, тобто їх первинна структура, мало змінилася в процесі еволюції. Це добре помітно при порівнянні амінокислотної послідовності гістонів ссавців, рослин і дріжджів. Так, H4 людини і пшениці відрізняються лише декількома амінокислотами. До того ж, розмір молекули білку та її полярність досить постійні. З цього можна зробити висновок, що гістони були оптимізовані ще в епоху загального попередника тварин, рослин і грибів (більше 700 млн років тому). Хоча відтоді в гістонових генах відбувалися незліченні точкові мутації, усі вони, очевидно, призводили до вимирання організмів-мутантів.

Гістони в октамері мають рухливий N-кінцевий фрагмент ("хвіст") з 20 амінокислот, який виступає з нуклеосоми і важливий для підтримки структури хроматину і контролю за генною експресією. Так, наприклад, формування (конденсація) хромосом пов'язане з фосфорилуванням гістонів, а посилення транскрипції – з ацетилюванням в них залишків лізину. Деталі механізму регуляції до кінця не з'ясовані.

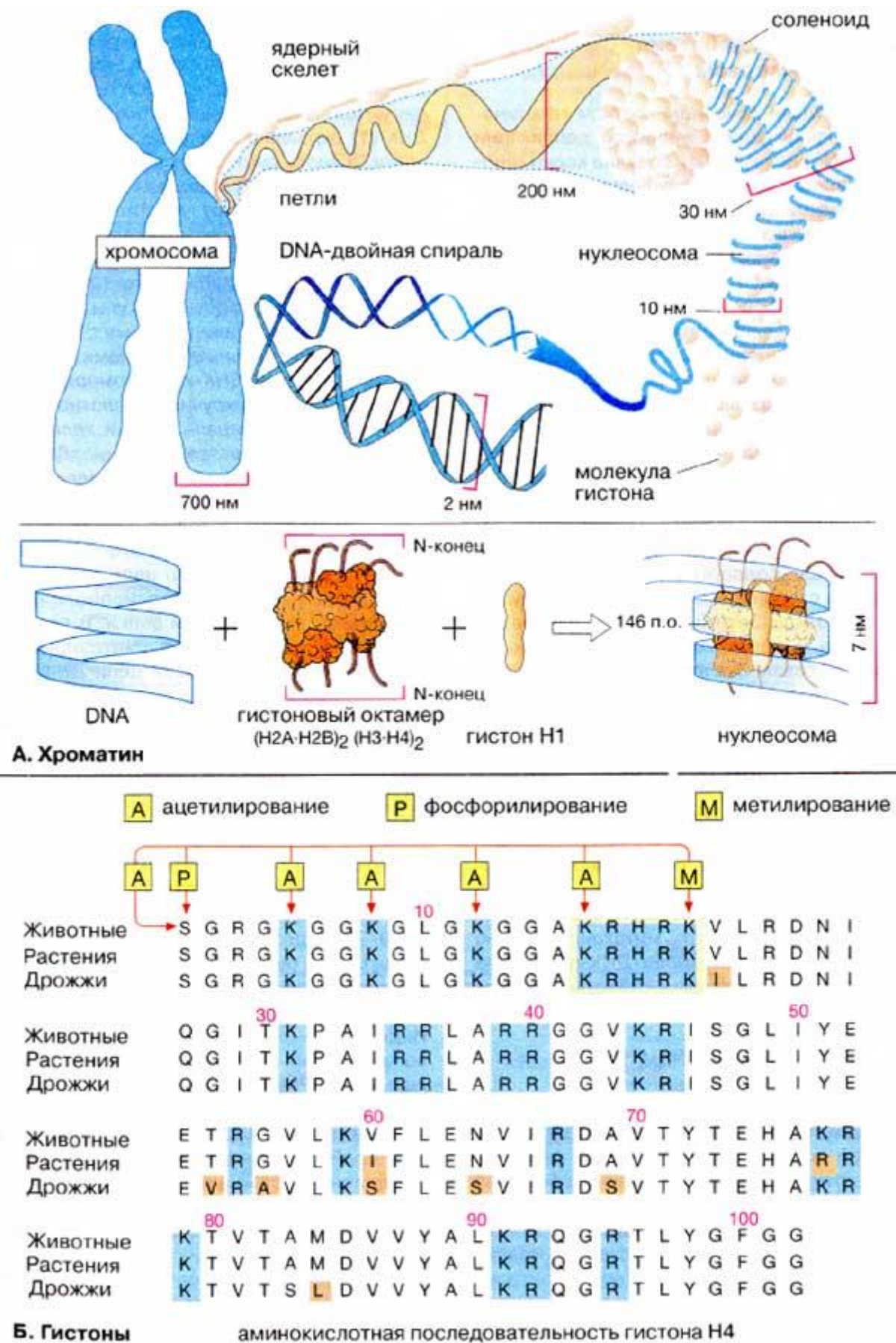


Рис. 2. Особливості будови хромосом та характеристика гістонів

Нуклеїнові кислоти - спадковий матеріал вірусів

Генетичні дослідження бактеріофагів почалися багато раніше, ніж бактерій (частково внаслідок прозорливості Меллера), і в 1952 р. вдалося довести, що спадковою речовиною фага T2 є ДНК. Це відкриття було зустрінуте з великим піднесенням і притягнуло увагу до робіт, виконаних на пневмококах за декілька років до цього. Бактеріофаг T2 – один з найретельніше досліджених фагів *E.coli*. Цей вірус містить ДНК, поміщену в білкову оболонку. У 1952 р. Альфред Херші і Марта Чейз з'ясували роль кожного з цих двох компонентів у формуванні потомства фага.

Лише білкова складова T2 містить сірку (у складі амінокислот метіоніну і цистеїну). Фаг T2 розмножували на бактеріях, що культивуються в середовищі з радіоактивним ізотопом ³⁵S, внаслідок чого білок фага був помічений цим ізотопом. Щонайменше 99% усього фосфору у фагові T2 припадає на ДНК, його помітили радіоактивним ізотопом ³²P. Ці радіоактивні мітки дозволяли простежити шляхи білку і ДНК фага T2 при інфекції.

Інфекційний процес починається з прикріплення фага до бактерійної клітини. Цей етап можна спостерігати в електронний мікроскоп; результати спостережень підтверджуються тим, що при центрифугуванні клітин на цій стадії інфекції фаги, що містять як ³⁵S, так і ³²P, осідають разом з бактеріями. А.Херши і М.Чейз виявили, що незабаром після інфікування велику частину міченого ³⁵S білка можна відокремити від бактеріальних клітин, активно перемішуючи і струшуючи культуру на мішалці; проте велика частина міченої ³²P ДНК не відділяється при цьому від бактеріальних клітин, оскільки, ймовірно, опиняється в при цьому вже усередині них. Усунення з культури порожніх білкових оболонок фага, так званих "тіней", не впливає на подальші події: бактерії лізуються, і з них виходить потомство фага саме так, як і у тому випадку, коли "тіні" залишаються прикріпленими до клітин. З цього досвіду А.Херши і М.Чейз зробили висновок, що для утворення копій фага в ураженій бактерійній клітині істотна лише ДНК батьківського фага, хоча самі копії містять як ДНК, так і білок. Таким чином, було висловлено припущення, що білковий компонент фага лише захищає ДНК від розщеплюючих ферментів і забезпечує потрапляння ДНК у бактерійну клітину, проте як ДНК і є власне речовиною спадковості.

Експеримент Херши-Чейз свідчив про важливу генетичну роль ДНК. Існують дві причини, через які саме цей експеримент був відразу визнаний як вирішальний доказ генетичної ролі ДНК, у той час як експерименти Евері, Мак-Леода і Мак-Карті з трансформації пневмококів не привернули до себе такої уваги. По-перше, експеримент був поставлений на бактеріофазі, відносно якого було добре відомо, що за характером успадкування ознак він аналогічний вищим організмам; на фазі T2 було продемонстроване існування мутацій і, саме так як і у вищих організмів, описана рекомбінація генів-мутантів. По-друге, хімічні дослідження складу ДНК багатьох різних організмів, що проводилися між 1944 і 1952 роками спростували широко поширене раніше уявлення про ДНК як про простий полімер, в якому один тетра nukлеотид багаторазово повторюється в усіх молекулах. Ці дослідження виявили, що ДНК має достатню хімічну складність, щоб слугувати речовиною спадковості.

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

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

Відома безліч різновидів ВТМ, що відрізняються за колом рослин-хазяїв і за вірулентністю на різних рослинах. Між ними існують помітні відмінності і в амінокислотному складі білків. Наприклад, у білковій оболонці ВТМ стандартного штаму відсутні гістидин і метіонін, проте як у вірусах штаму HR ці амінокислоти містяться. Були виконані експерименти по реконструкції гібридних вірусів з очищеного білку HR і очищеною РНК стандартного штаму. Такі віруси мали нормальну інфекційність. Коли ж цими вірусами уражували рослини, то склад білкової оболонки потомства гібридних вірусів співпадав із складом білків штаму, з якого була узята РНК. Склад білкової оболонки гібридного вірусу не успадковувався; потомство таких вірусів мало білкові оболонки, склад яких визначався виключно РНК. Виявилось, що лише РНК має функції, необхідні для спадкової передачі цієї ознаки.

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

Згодом було показано, що очищена ДНК деяких фагів, з яких найбільш відомі фХ174 і λ , може вражати бактерії і за відсутності білкової оболонки. Вільним молекулам ДНК нелегко проникнути через клітинну стінку (мембрану). Проте, обробляючи бактерії *E.coli* певним ферментом, а саме лізоцимом яєчного білку, можна зробити їх клітинну стінку проникною. Бактеріальні клітини, мембрани яких оброблені у такий спосіб, називаються *сферопластами* (через сферичну форму, яку набувають бактерії в результаті такої обробки). Сферопласти не здатні до нормального росту, проте вони можуть бути інфіковані молекулами ДНК, виділеної з фагов фХ174 і λ , і виробляти повноцінні фагові частки. Такі експерименти показують, що саме ДНК, а не білок є спадковим матеріалом бактеріофагів.

Таким чином, вже в результаті перших досліджень стало зрозуміло, що саме нуклеїнові кислоти є носієм спадковості в усіх організмах. Два типи нуклеїнових кислот – ДНК і РНК – виконують генетичні функції в усіх прокаріотичних і еукаріотичних клітинах. Проте віруси містять лише той або інший тип нуклеїнових кислот.

Хімічний склад і будова нуклеїнових кислот

Основна структурна одиниця нуклеїнових кислот – *нуклеотид*. Нуклеотид складається з трьох хімічно різних частин, сполучених ковалентними зв'язками. Перша частина – це цукор, що містить п'ять атомів вуглецю: дезоксирибоза (у ДНК) і рибоза (у РНК). Друга частина – пурінова або піримідинова азотиста основа, ковалентно сполучена з першим атомом вуглецю цукру, і все воно формує структуру, звану *нуклеозидом*. ДНК містить *пурінові основи*: аденін (А) і гуанін (G), а також *піримідинові основи* – цитозин (С) і тимін (Т); відповідні нуклеозиди називаються: дезоксиаденозин, дезоксигуанозин,

дезоксцитидин і дезокситимидин. РНК містить ті ж пурінові основи, що і ДНК, а також піримідин цитозин, але замість тиміну до її складу входить урацил (U); відповідні нуклеозиди називаються: аденозин, гуанозин, цитидин і уридин. Третю частину нуклеотиду складає фосфатна група; фосфатні групи з'єднують сусідні нуклеозиди в полімерний ланцюжок за допомогою фосфодієфірних зв'язків між 5'-атомом вуглецю одного цукру і 3'-атомом вуглецю іншого. Нуклеотидами називаються нуклеозиди з однією або декількома фосфатними групами, приєднаними ефірними зв'язками до 3'- або 5'-атомам вуглецю цукру. Синтез нуклеотидів передуює синтезу нуклеїнових кислот, і відповідно нуклеотиди є продуктами хімічного або ферментативного гідролізу нуклеїнових кислот.

Нуклеїнові кислоти – це дуже довгі полімерні ланцюжки, що складаються з мононуклеотидів, сполучених 5'-3'-фосфодієфірними зв'язками. Інтактна молекула РНК містить від 100 до 100000 і більше нуклеотидів. Інтактна молекула ДНК вміщує, залежно від виду організмів, від декількох тисяч до багатьох мільйонів нуклеотидів. У ті часи, коли Евері, Мак-Леод і Мак-Карті ставили свої експерименти на ДНК пневмококів, вважалося, що структура молекул ДНК відносно проста і є певною тетра нуклеотидною послідовністю, наприклад $rArCpGrTOn$, багаторазово повтореною, так що вона утворює полімер виду $(rArCpGrT)_n$. Таким чином, здавалося, що ДНК не має структурної складності, необхідної для того, щоб служити речовиною спадковості.

Наступні хімічні дослідження Ервіна Чаргаффа зі складу ДНК багатьох різних організмів переконали наукову громадськість у тому, що ДНК насправді має складність, необхідну для передачі спадкової інформації. Дослідження Чаргаффа показали, що склад основ в ДНК відмінний у різних видів організмів. Це спостереження унеможливило уяву про те, що усі молекули ДНК складаються з однакових тетра нуклеотидів. Дослідження Чаргаффа виявили, також, одну чудову особливість, властиву усім молекулам ДНК: молярний вміст аденіну дорівнює вмісту тиміну, а молярний вміст гуаніну – кількості цитозину. Ця закономірність має назву «правила Чаргаффа»: $[A] = [T]$, $[G] = [C]$; кількість пуринів дорівнює кількості піримідинів. Залежно від видової приналежності змінюється лише відношення $([A] + [T])/([G] + [C])$, яке ще називають *коефіцієнтом видоспецифічності*.

Спостереження Чаргаффа показали, що молекула ДНК може бути побудована набагато складніше, ніж припускали до того, оскільки відповідно до отриманих ним даних молекули ДНК мали різну структуру послідовностей азотистих основ. Незабаром, після робіт Чаргаффа, Уотсон і Крік фактично показали, що правила Чаргаффа не накладають ніяких обмежень на можливу кількість різних послідовностей основ, які можуть утворювати молекули ДНК.

Модель структури ДНК Уотсона-Кріка

У 1953 році Джеймс Уотсон і Френсіс Крік запропонували модель структури ДНК, яка відтоді багаторазово перевірялася і наразі визнана в цілому правильною, в багатьох деталях. Їх модель ґрунтувалася на чотирьох основних наукових постулатах:

1. ДНК є полімером, що складається з нуклеотидів, сполучених 3'-5'-фосфодієфірними зв'язками.
2. Склад нуклеотидів в ДНК підпорядковується правилу Чаргаффа.
3. Рентгенограми волокон ДНК, уперше отримані Морісом Уілкінсом і Розаліндою Франклін, вказують на те, що молекули мають спіральну структуру і містять більше за один полі нуклеотидний ланцюг.
4. Кислотно-лужне титрування нативної ДНК показує, що її структура стабілізується водневими зв'язками. Титрування і нагрівання нативної ДНК викликають помітні зміни її фізичних властивостей, зокрема в'язкість, переводячи її в "денатуровану" форму, причому ковалентні зв'язки не руйнуються.

Щоб пояснити ці спостереження, Дж.Уотсон і Ф.Крік припустили, що природна (нативна) молекула ДНК складається з двох полімерних ланцюгів попарно сполучених нуклеотидів, закручених у формі подвійної спіралі. Зчеплення між ланцюгами забезпечується особливими водневими зв'язками між аденіном і тиміном та між гуаніном і цитозином. Таке попарне зіставлення нуклеотидів, при якому А комплементарний Т, а G комплементарний С, було виведено за допомогою побудови молекулярних моделей, на яких точно витримувалися усі міжатомні відстані. Побудова молекулярної моделі гіпотетичної подвійної спіралі, також, зажадала антипаралельності нуклеотидних ланцюжків.

Припущена специфічність водневих зв'язків між аденіном і тиміном, і між гуаніном і цитозином пояснює постійність відношень, що спостерігалася Чаргаффом, А/Т і G/С і відбиває комплементарність ланцюгів подвійної спіралі. Більше того, для будь-якої послідовності основ можлива рівна їй за довжиною послідовність комплементу, що становить другий ланцюг подвійної спіралі. Конкретна послідовність пар А — Т і G — С може бути видоспецифічна і не впливає на структуру молекули ДНК, що утворює подвійну спіраль. Можливе число різних послідовностей пар основ в молекулі ДНК практично нескінченно і здатне кодувати колосальну кількість інформації. Цей факт робить дуже привабливою гіпотезу про те, що ДНК може служити речовиною спадковості для усіх організмів. Із моделі також виходить, що фізична структура нативної ДНК може сильно змінюватися при нагріванні або титруванні, що не порушують ковалентних зв'язків, але що розривають водневі зв'язки, так що два ланцюги відділяються один від одного.

Існуючі просторова і молекулярна модель запропоновані Дж.Уотсоном і Ф.Кріком для подвійної спіралі ДНК. Зверніть увагу на те, що для розподілу двох ланцюгів їм необхідно розплестися один відносно одного!

Модель Уотсона-Кріку дозволяє уявити собі, як може подвоюватися нативна молекула ДНК, утворюючи дві однакові дочірні молекули. Оскільки два ланцюги ДНК комплементарні, кожна з них при розплітанні подвійної спіралі може служити матрицею для синтезу нового ланцюга комплементу. Послідовність основ в ланцюзі, що знову синтезується, визначатиметься специфікою водневих зв'язків між основами ланцюга-шаблону і знову утворюваного ланцюга. Таким чином, генетична інформація, що містилася в послідовності пар основ батьківської молекули, буде повністю відтворена в двох дочірніх молекулах. Більше того, якщо в процесі подвоєння ДНК сталася помилка і якийсь нуклеотид в знову утворюваному ланцюзі випав або виявився некомплементом початковому, то це може змінити інформаційний зміст молекули, причому можна чекати, що ця помилка буде передана дочірнім молекулам ДНК у наступних поколіннях. Така заміна пари нуклеотидів може мати властивості генетичних мутацій. Таким чином, модель структури ДНК Дж.Уотсона і Ф.Кріку пояснює як здатність генів до самоподвоєння (*реплікації*), так і їх інформаційні властивості.

Перевірка моделі Уотсона-Кріка

Модель подвійної спіралі ДНК була запропонована в 1953 р. і знаменувала народження нової науки – молекулярної біології. Проте пройшло п'ять років, перш ніж було отримано перші переконливі експериментальні підтвердження моделі Уотсона-Кріка в роботах Метью Мезелсона і Франкліна Сталя. У цих експериментах було показано, що в точній відповідності до пророцтв щодо моделі, реплікація ДНК відбувається напівконсервативно: кожна дочірня молекула ДНК складається з одного інтактного (консервативною) ланцюга, отриманого від батьківської подвійної спіралі, і одного знову синтезованого ланцюга. З іншого боку, можна уявити собі гіпотетичні механізми реплікації ДНК, яка не передбачається моделлю подвійної спіралі, а саме:

1) консервативний спосіб реплікації, при якому батьківська ДНК повністю зберігається, а дочірні молекули ДНК повністю синтезуються наново;

2) дисперсний спосіб, при якому обидві дочірні молекули ДНК синтезуються наново, а батьківська молекула розпадається на нуклеотиди, які можуть входити або не входити до складу дочірніх молекул.

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

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

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

З цього було зроблено висновок, що ДНК проміжної щільності, що утворюється після першого ділення в легкому середовищі, є гібридною молекулою, що складається з одного батьківського ланцюга, що містить тільки важкий ізотоп азоту, і інший, знову синтезованому дочірньому ланцюгу, як це передбачає модель Уотсона-Кріку. Аналогічні експерименти проробляли з реплікаційною ДНК безліч разів у різних прокаріотичних і еукаріотичних організмів, і кожного разу виявлялося, що ДНК реплікується напівконсервативно. Експерименти Мезельсона-Сталя були першим доказом справедливості моделі Уотсона-Кріка. Нині можна з упевненістю сказати, що основні положення цієї моделі переконливо підтверджені і структура подвійної спіралі лягла в основу сучасної генетики.

Різні форми організації дволанцюжкової ДНК

Піонерська робота М.Уілкінса і Р.Франклін показала, що молекули ДНК можуть давати різну дифракційну картину в рентгенівських променях залежно від вмісту води і солей. Модель, запропонована Дж.Уотсоном і Ф.Кріком, відповідала значенням параметрів структури, отриманим на основі рентгенограми так званої В-форми ДНК. Модель В-форми ДНК характеризується плоскопаралельним розташуванням пар

нуклеотидних основ усередині подвійної спіралі. Площини основ майже перпендикулярні осі спіралі і знаходяться один від одного на 3,4 Å. Цій одиниці, що повторюються, відповідають яскраві меридіональні дуги у верхній і нижній частинах рентгенограми. Діаметр спіралі майже в точності рівний 20 Å, а сусідні пари нуклеотидних основ повернені один відносно одного на 36°. У результаті на один виток спіралі доводиться десять пар основ. Це спіраль з правим напрямом обертання. Рентгенограма ДНК, проте, не дає інформації, достатньої для того, щоб судити, є спіраль правою або лівою. При побудові своєї моделі Дж.Уотсон і Ф.Крік вибрали напрям обертання довільно.

Уся можлива різноманітність структур дволанцюжкових молекул ДНК стала ясною відносно нещодавно (у 80-х роках минулого століття) в результаті експериментів по кристалізації гомогенних дволанцюжкових олігомерів ДНК, що отримується за допомогою хімічного синтезу. Дифракційні рентгенівські картини, отримані на таких кристалах ДНК, більше чіткі, ніж отримувані на природній ДНК, і дозволяють визначити з великою точністю положення окремих атомів. Ці дослідження виявили, що як право-, так і лівозакручена дволанцюжкова спіраль ДНК може існувати в декількох модифікаціях, параметрів, що характеризуються різними значеннями. Тип спіралі визначається властивостями розчинника і послідовністю нуклеотидів.

Самокомплементарний тетрамер ДНК типу CGCG (5'-кінець завжди пишеться ліворуч) утворює при кристалізації лівозакручену дволанцюжкову структуру, що дістала назву Z-ДНК через зигзагоподібний характер фосфодієфірного каркасу. Навпаки, самокомплементарний додекамер CGCGAATTCGCG кристалізується у формі правозакрученної дволанцюжкової спіралі В-форми, хоча цей додекамер утримує на обох своїх кінцях послідовність CGCG, яка сама по собі кристалізується в Z-формі.

Дослідження структури полімеру (CG)_n в розчині показали, що ця молекула може існувати в одній з двох альтернативних форм, а саме в правій В-формі або лівій Z-формі. Ці дві форми переходять одна в іншу при зміні іонної сили розчину або катіонів, нейтралізуючих негативний заряд на фосфодієфірному каркасі. Природні молекули ДНК в основному існують у правій В-формі, якщо вони не містять послідовностей типу (GC)_n. Проте якщо такі послідовності входять до складу ДНК, то ці ділянки за відповідних умов можуть переходити в Z-форму. Можливість такого переходу вказує на те, що два ланцюги в подвійній спіралі ДНК знаходяться в динамічному стані і можуть розкручуватися один відносно одного, переходячи з правої форми в ліву і навпаки. Зрозуміло, що молекули ДНК для цього мають бути досить лабільні і допускати конформаційні перетворення. Біологічні наслідки такої лабільності структури ДНК доки не цілком з'ясовані. Специфічні до Z-ДНК антитіла реагують з певними ділянками гігантських хромосом клітин слизових залоз дрозоді, що свідчить про те, що ДНК в хромосомах існує в обох формах.

Організація ДНК у хромосомах

Молекули ДНК в еукаріотичних хромосомах дуже великі. Довжина молекул ДНК, виділеної з клітин дрозоді, сягає 1,2 см, і прийнято вважати, що кожна еукаріотична хромосома містить одну-єдину безперервну молекулу ДНК. Упаковка таких величезних молекул в ядрах клітин є основною функцією гістонів, білків, характерних саме для еукаріотичних клітин.

Основна структурна одиниця еукаріотичної клітини – це *нуклеосома*. Нуклеосома містить по дві молекули кожного з чотирьох гістонів, H2A, H2B, H3 і H4, сполучених у формі *октамеру*. Кожен октамер пов'язаний з послідовністю із приблизно 200 нуклеотидних пар завдовжки біля 700 Å. Точне взаємне розташування гістону і ДНК в нуклеосомі невідоме, але вважається, що ДНК якимось чином намотується на октамери гістону. Нуклеосома має діаметр близько 100 Å, і таким чином ДНК в нуклеосомі має бути складена приблизно усемеро. Інший гістон, H1, сполучений з ниткою ДНК (структура під назвою *лінкер*) забезпечує зв'язок між нуклеосомою, послідовність якої утворює подібність гвинта. Діаметр цього гвинта (званого *соленоїдом*) складає за одними

оцінками близько 300 Å, по інших – близько 500 Å. Ця відмінність, ймовірно, обумовлена тим, що для приготування електронно-мікроскопічних препаратів використовували різні методи. Якщо прийняти діаметр соленоїда рівним 300 Å, то упаковка послідовності нуклеосоми у формі соленоїда дає додаткове зменшення лінійних розмірів структури в цілому ще в 6 разів. У інтерфазних хромосомах сам соленоїд закручений гвинтом, утворюючи при цьому порожнисту трубку діаметром близько 2000 Å, що дає чергове скорочення лінійних розмірів ДНК структури, що містить, ще майже в 18 разів.

Перехід від інтерфазної хромосоми до метафазної хроматиди, ймовірно, пов'язаний з ще одним аналогічним закручуванням тепер уже трубки діаметром в 2000 Å в гвинтову структуру діаметром близько 6000 Å. Ця загальна схема організації ДНК в ядрах клітин ігнорує відмінності в ступені спіралізації, які майже напевно існують між тими ділянками хромосом, які беруть участь в синтезі РНК і реплікації ДНК, і тими, які в цих процесах не беруть участь. Крім того, гетерохроматинові ділянки хромосом компактніші, ніж еухроматинові. У будь-якому випадку ДНК в ядрах еукаріотичних клітин утворює ієрархічну систему спіралей, основною одиницею якої є нуклеосома.

Хромосоми прокаріотичних клітин є кільцевими молекулами ДНК; у *E.coli* довжина кільця складає 107 Å, тобто близько 1 мм. Ця величезної довжини кільцева нитка поміщається в клітині завдовжки лише $2 \cdot 10^4$ Å при діаметрі близько $8 \cdot 10^3$ Å. Отже, ДНК може існувати в клітині лише у високовпорядкованому (конденсованому) стані. Хоча в прокаріотичних клітинах немає білків гістонів, в них проте містяться деякі білки, що утворюють комплекси з ДНК. При електронній мікроскопії зруйнованих певним чином клітин *E.coli* можна бачити, що ДНК зібрана в "намистини", за величиною дуже близькі нуклеосоми еукаріот. Ці намистини дуже лабільні, що вказує на те, що взаємодія між ДНК і білками в клітинах *E.coli* багато слабкіше, ніж між ДНК і гістонами еукаріот. Характер ієрархічної конденсації хромосоми *E.coli* не цілком зрозумілий, але хромосома в цілому може бути виділена у вигляді компактної структури, званої *нуклеоїдом*.

Не уся ДНК еукаріотичних клітин знаходиться в ядрах клітин. *Мітохондрії* і недиференційовані хлоропласти рослин, так звані *пластиди*, є органелами із самостійною реплікацією і містять власні кільцеві молекули ДНК. Ці молекули дуже невеликі і кодують обмежену кількість інформації, необхідної для здійснення органелами їх функцій. Так само як і хромосоми прокаріот, вони не пов'язані з гістонами і утворюють усередині органел *нуклеоїди*.

Питання для самоперевірки знань:

1. Яке значення мав експеримент А.Херші і М.Чейз?
2. Вкажіть складові частини нуклеотиду.
3. У чому полягає різниця між нуклеозидом і нуклеотидом?
4. Які пуринові та піримідинові основи існують?
5. У чому полягає різниця між молекулами РНК і ДНК?
6. Про що свідчать правила Е.Чаргаффа?
7. Які варіанти конформації подвійних спіралей ДНК існують? Чим вони відрізняються?
8. За яких умов відбувається перехід молекули ДНК з однієї форми до іншої?
9. Властивості еукаріотичних та прокаріотичних клітин як генетичних систем.
10. Дозрівання мРНК еукаріот.
11. *Vir*-область та її особливості.
12. Антисмислова РНК.
13. Структура генів: інтрони та екзони, оперони.
14. Генетична різноманітність: гени антитіл.
15. Структура та організація функціонування геному

Матеріали самостійного опрацювання:

1. Центральна догма молекулярної генетики.

2. Таутомерія основ.
3. Розмір генома, проблема компактизації ДНК.

2. РЕПЛІКАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Загальні особливості реплікації ДНК

Ідентифікація місця початку реплікації: воно знаходиться поблизу регіонів, багатих А-Т (*ori*-сайти). Таких сайтів повинно бути не менше 100. У кожному сайті до ДНК приєднуються 4 молекули особливого білку – О-білка.

Розкручування ДНК: в місцях приєднання О-білків починається локальне розкручування ДНК, при цьому утворюються реплікативні пухирці. У цьому процесі беруть участь хеліказа і ДНК-з'єднуючий білок, що має назву SSB-білок (від англ. single-strand binding protein). SSB-білок стабілізує зв'язок хелікази з ДНК і підтримує ДНК в розкрученому стані.

Утворення реплікативної вилки: при розкручуванні відбувається розрив водневих зв'язків між азотистими основами полінуклеотидних ланцюгів, при цьому відбувається розбіжність ланцюгів і утворюється реплікативна вилка. 2 і 3 етапи прискорює АТФ-залежний комплекс ферментів, названий хеліказою (геліказою). На розподіл кожної пари основ потрібно 2 АТФ. Окрім цього в розкручуванні беруть участь ДНК-топоізомерази – АТФ-незалежні ферменти. Кожен з розділених ланцюгів ДНК з'єднується з ДНК-з'єднуючим білком (SSB-білок), який перешкоджає зворотньому відновленню ланцюгів.

Відбувається комплементарне підстроювання дНТФ до пурінових, що звільнилися, і піримідинових основ материнських ланцюгів ДНК. При цьому спостерігають відщеплення від дНТФ молекул пірофосфатів (PP), а енергія, що виділяється, спрямовується на утворення фосфорнодієфірних зв'язків між дезоксирибозою і залишками фосфорної кислоти. Цю стадію прискорюють ДНК-полімерази. У людини є 5 видів ДНК-полімераз:

- альфа (бере участь у заповненні пропуску і синтезі ретроградного (відстаючого ланцюга),
- бета (бере участь у репарації ДНК),
- епсілон (забезпечує правильність прочитування інформації і в репарації ДНК),
- гамма (бере участь у синтезі мітохондріальної ДНК),
- сигма (бере участь у синтезі провідного (лідуючого ланцюга)).

Синтез нових ланцюгів відбувається у напрямі від 5' до 3', тому на одному з ланцюгів материнської ДНК новий ланцюг нарощується безперервно. На іншому ланцюзі утворюються короткі фрагменти нового ланцюга – *фрагменти Оказаки*. У подальшому кінці цих фрагментів з'єднуються (зшиваються) між собою під дією ДНК-лігази.

Відбувається респіралізація полінуклеотидних ланцюгів і утворюється третинна і четвертинна структури ДНК. Таким чином, відбувається утворення дочірньої молекули ДНК. Надалі ділиться ядро, цитоплазма, інші клітинні структури. Закінчується процес утворення 2-х дочірніх клітин, ядра яких отримали абсолютно ідентичну ДНК. Тобто уся генетична інформація, що зберігається в ДНК материнських клітин, передається до ДНК дочірніх клітин. У цьому полягає передача і збереження спадкових ознак.

Інша роль ДНК полягає в кодуванні первинної структури білків, що синтезуються клітиною. При цьому в синтезі специфічних білків ДНК бере не пряму участь. Вона полягає в тому, що на ДНК відбувається синтез усіх РНК, які вже безпосередньо беруть участь у процесі утворення клітинних білків. Синтез молекул РНК називається *транскрипцією*.

Реплікація відбувається тільки в певний період життя клітини. Цей період являється S-фазою (*синтетична*) клітинного циклу. S-фаза відділяється від мітозу G1 (*пресинтетичною*) і G2-перевами (*постсинтетичною*). Під час G1 клітина готується до S-фази; у G2 клітина готується до мітозу. Усі еукаріотичні клітини мають особливі білки, які контролюють переходження однієї фази клітинного циклу в іншу. До таких білків-регуляторів відносяться цикліни. Ці білки активують циклін-залежні протеїн-кінази –

ферменти, які фосфорилують субстрати, необхідні для клітинного циклу. Розрізняють Д-цикліни, які сприяють переходу клітини з G1 в S-фазу; E- і A-цикліни, які ініціюють реплікацію в ранній S-фазі; B-цикліни сприяють переходженню G2 в мітоз. Багато онковірусів і онкогенів здатні порушувати перехід клітини з G1 в S-фазу. Це супроводжується неконтрольованим діленням клітини.

Нативні молекули ДНК дуже великі і при екстракції з клітин зазвичай розриваються в результаті фізичних або ферментативних дій. М.Мезельсон і Ф.Сталь у своїх експериментах по реплікації ДНК *E.coli* мали справу з порівняно невеликими фрагментами ДНК, і отримані ними результати чинні тільки до стану ДНК, що передував реплікації і після неї. Повна реплікація хромосоми *E.coli* уперше спостерігалася Джоном Кейрнсом. Він розробив метод дуже м'якого руйнування клітин *E.coli*. У результаті Дж.Кейрнсу вдалося виділити інтактні хромосоми *E.coli* і помітити їх радіоактивним ³H-тимідином. Мічені хромосоми обережно переносили з розчину на тверду поверхню, яка у подальшому покривалася в темряві фотографічною емульсією і протягом декількох тижнів експонувалася. В цей час електрони, що випускаються радіоактивною ДНК, викликали утворення зерен срібла у фотоемульсії уздовж молекул ДНК. Наступна обробка емульсії дає радіоавтограф хромосоми, на якому ланцюжок зерен срібла відстежує конформацію молекули ДНК. Застосування методу радіоавтографії привело передусім до встановлення того факту, що ДНК *E.coli* має кільцеву форму. Згодом було показано, що таку ж форму має ДНК усіх прокаріотичних організмів, а також вірусів і органел еукаріотичних організмів.

Нині для молекул ДНК відомі три основні конформації і відповідно три основні способи реплікації. Кільцеві молекули ДНК, наприклад реплікаційна форма ДНК фага лямбда, можуть реплікуватися способом, виявленим на радіоавтографах хромосом *E.coli*. Реплікація кільцевої молекули ДНК починається в певній точці кільця і призводить до утворення "здуття", що розширюється в двох напрямках уздовж хромосоми у міру реплікації. Цей спосіб реплікації ДНК веде до утворення проміжної структури, що нагадує грецьку літеру Θ. *Тета-тип реплікації* перетворює батьківську кільцеву хромосому на дві дочірні кільцеві хромосоми, в кожній з яких зберігається один з ланцюгів батьківської молекули ДНК, а другий ланцюг наново синтезується.

Як ми побачимо надалі, життєвий цикл деяких організмів вимагає перетворення кільцевої хромосоми на лінійну. Таке перетворення відбувається при іншому типі реплікації ДНК, відомому під назвою *сигма-типа* (від грецької літери σ) або "кільця, що котиться". *Сигма-реплікація* починається з розриву фосфодієфірного зв'язку в одному з ланцюгів батьківської кільцевої молекули, внаслідок чого по обидві сторони розриву утворюються "голі" 3'-ОН- і 5'-РО₄-кінці. Надалі кільцевий ланцюг комплементу слугує матрицею для синтезу нового ланцюга, ковалентно прикріпленого до 3'-ОН-кінця розірваного батьківського ланцюга. У міру того як новий ланцюг нарощується на 3'-ОН-кінець, 5'-РО₄-кінець того ж ланцюга зміщується, утворюючи "хвіст" кільця. Після того починається синтез ланцюга, комплементарного цьому хвосту. За такого способу реплікації проміжна структура має форму літери "сигма". У міру продовження реплікації кільцева батьківська молекула перетворюється на дві дочірні молекули, одна з яких кільцева, а інша – лінійна. Сигма-реплікація є необхідним етапом життєвого циклу деяких бактеріофагів, зокрема лямбда і фХ174. Цей тип реплікації має місце при статевій кон'югації бактерій і зустрічається в оогенезі деяких еукаріотичних організмів.

Хромосоми деяких вірусів і всіх еукаріотичних організмів містять лінійні молекули ДНК. Реплікація лінійних молекул починається в певних точках з утворення реплікаційного здуття. У невеликих молекулах ДНК вірусів реплікація може починатися з однієї точки. У великих молекулах ДНК, що утворює хромосоми еукаріот, іноді налічуються сотні точок ініціації реплікації. Після утворення здуття воно починає збільшуватися у міру поширення процесу реплікації ДНК в обох напрямках від точки ініціації. Під час процесу сусіднє здуття може зливатися, а коли здуття досягає кінця

молекули, утворюється характерна проміжна *Y-подібна конфігурація*. Коли реплікація закінчується, з однієї лінійної батьківської молекули утворюються дві лінійні дочірні, кожна з яких, так само як і батьківська, є подвійною спіраллю.

Процес реплікації ДНК грає ключову роль в передачі спадкової інформації, записаної в послідовності пар основ від батьківської молекули ДНК дочірнім молекулам ДНК, від батьківських соматичних клітин – дочірнім соматичним клітинам і, нарешті, від батьківського організму – нащадкам.

Механізм дії ДНК-полімерази

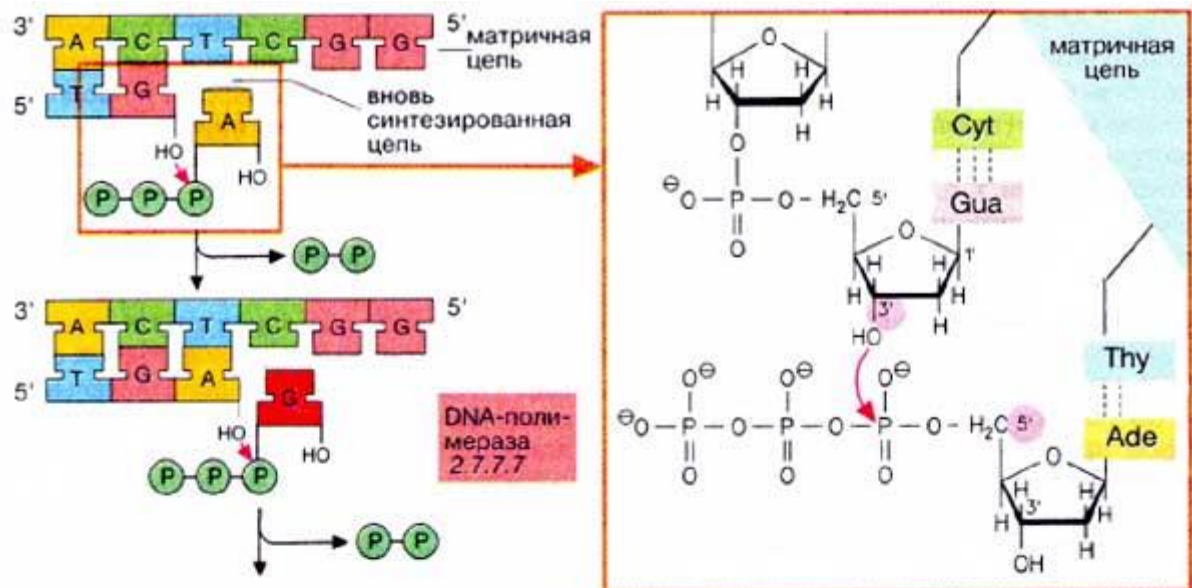
Для передачі дочірнім клітинам генетичної інформації в процесі реплікації ДНК має бути створена копія генома. Реплікація ДНК здійснюється ДНК-залежними ДНК-полімеразами. Ці ферменти використовують як шаблон один з ланцюгів подвійної спіралі ДНК, так звану матрицю. На матриці, починаючи з короткої стартової послідовності – *праймера*, ферменти синтезують ланцюг комплементу і відтворюють у результаті початкову двухтяжеву ДНК. Субстратами ДНК-полімераз є чотири дезоксирибонуклеотидтрифосфати: аденозин-, гуанозин-, тимідин- і цитозинтрифосфати. У кожному кроці синтезу ДНК відбувається спаровування нуклеотиду з відповідною азотистою основою матричного ланцюга. Надалі α -фосфатна група пов'язаного нуклеотиду піддається нуклеофільній атаці з боку 3'-ОН-групи попереднього нуклеотиду. За цим відбувається видалення дифосфату і утворення нового фосфодієфірного зв'язку. Ці етапи повторюються знову і знову у міру руху ДНК-полімерази від однієї основи до наступної уздовж матриці. Відповідно до цього механізму матричний ланцюг ДНК прочитується у напрямі 3'→5'.

У більшості клітин є декілька ДНК-полімераз. Разом із ферментами, що здійснюють власне реплікацію, існують полімерази, які включені до процесів репарації ДНК або реплікують мітохондріальну ДНК еукаріот. Більшість ДНК-полімераз побудовані з безлічі субодиниць, роль яких до кінця не з'ясована.

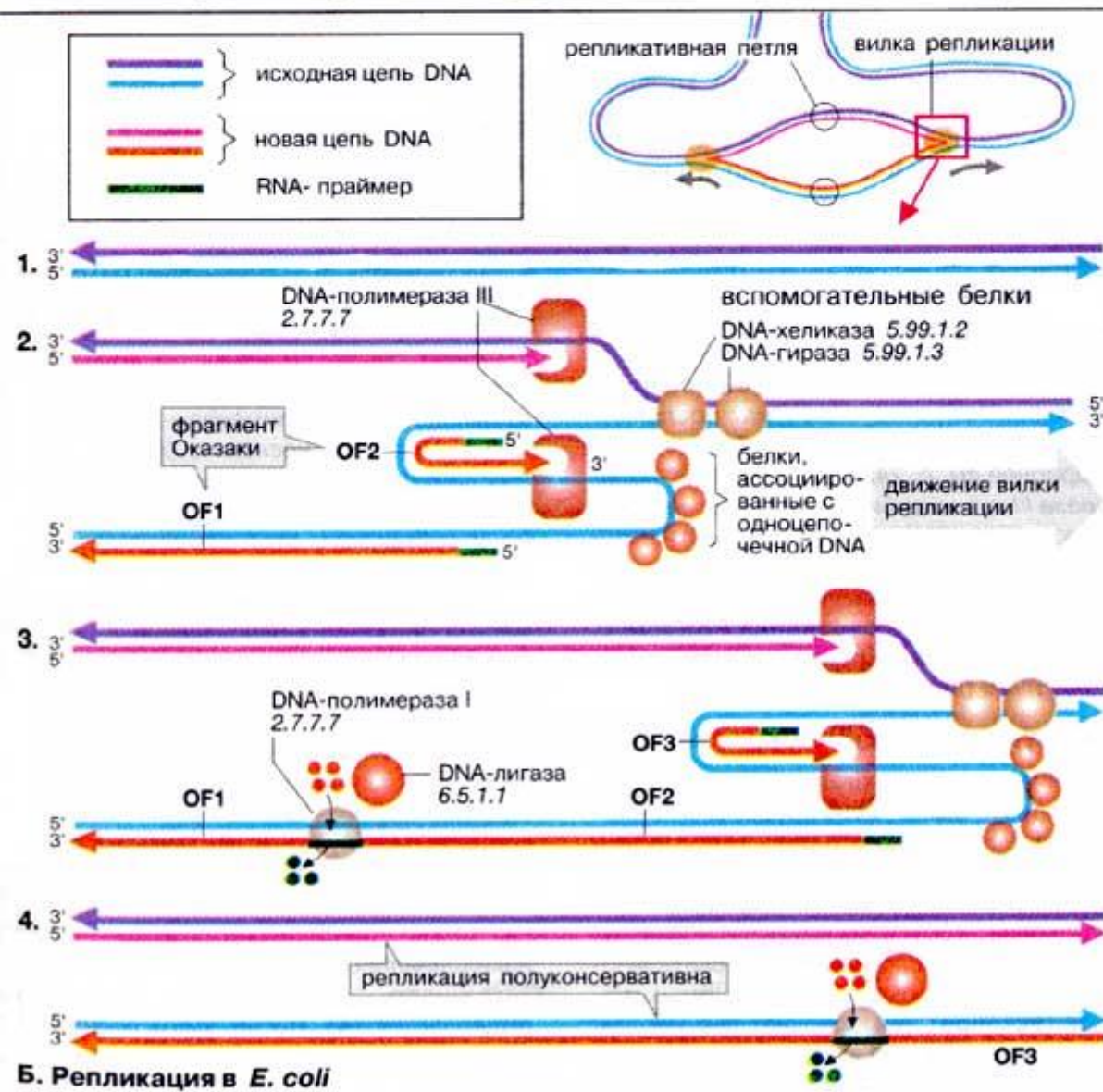
Реплікація в *E.coli*

Нині процес реплікації у прокаріот досить вивчений, проте як багато аспектів еукаріотичної реплікації залишаються невідомими. Хоча з великою часткою вірогідності можна стверджувати, що в більшості клітин цей процес здійснюється в основному однаково. На рисунку 3 показана проста схема реплікації у бактерії *Escherichia coli*. У бактеріях реплікація починається із специфічної точки в кільцевій ДНК (ділянка початку реплікації) і триває в обох напрямках. У результаті утворюються дві реплікативні вилки, які просуваються в протилежних напрямках, тобто обидва ланцюги реплікуються одночасно. На схемі початкова ДНК (1) забарвлена в блакитний і фіолетовий кольори, а що знову синтезується – в рожевий і помаранчевий. У функціонуванні кожної вилки беруть участь безліч різних білків, з яких тут вказані найбільш важливі.

Кожна реплікативна вилка (2) включає принаймні дві молекули ДНК-полімерази III, що асоціюються з декількома допоміжними білками. До останніх відносяться ДНК-топоізомерази (гірази), які розкручують щільно згорнуту подвійну спіраль ДНК, і хеліази, які розплітають двухтяжеву ДНК на два ланцюги. Оскільки матричний ланцюг завжди читається у напрямі 3'→5', тільки один з ланцюгів може прочитуватися безперервно (рожева/фіолетова; 2). Інший ланцюг (блакитного кольору) прочитується в напрямі, протилежному до руху реплікативної вилки. В результаті на матриці спочатку синтезуються короткі фрагменти нового ланцюга ДНК (зелений/помаранчевий), так звані фрагменти Оказаки (ОФ), названі так на ім'я їх першовідкривача. Кожен фрагмент починається з короткої РНК-приманки (праймера, зеленого кольору), необхідної для функціонування ДНК-полімерази. Праймер синтезується спеціальною РНК-полімеразою ("праймаза", на схемі не показана), ДНК-полімераза III добудовує цей праймер до



А. Механизм действия ДНК-полимеразы



Б. Репликация в *E. coli*

Рис. 3. Механізм реплікації ДНК (на прикладі *E.coli*)

фрагмента ДНК завдовжки 1000-2000 дезоксінуклеотидних ланок (помаранчевого кольору).

Синтез цього фрагмента далі уривається, і новий синтез починається з наступного РНК-праймера. Індивідуальні фрагменти Оказаки спочатку не пов'язані один з одним і все ще мають РНК на 5'-кінцях (3). На деякій відстані від реплікативної вилки ДНК-полімераза І починає заміщати РНК-праймер послідовністю ДНК. Однотяжові розриви репаруються ДНК-лігазою, що на завершення залишаються. В утвореній таким чином подвійній спіралі ДНК тільки один з ланцюгів синтезований наново. Тому вважається, що реплікація ДНК відбувається за напівконсервативним механізмом

Питання для самоперевірки знань:

1. У чому полягає процес реплікації ДНК?
2. Вкажіть білки, що беруть участь у процесах реплікації.
3. У чому суть напівконсервативного механізму реплікації ДНК?
4. Що таке «реплікон»?
5. З яких етапів складається процес реплікації?
6. Яку роль у процесі реплікації грає реплікативна вилка?
7. Які функції виконують праймери в процесі реплікації?
8. У чому полягає різниця між лідируючим і відстаючим ланцюгами?
9. З'ясуйте роль ДНК-полімерази III у процесі реплікації.
10. Вкажіть за яким механізмом та за допомогою яких ферментів відбувається формування відстаючого ланцюга ДНК з фрагментів Оказаки.
11. Вкажіть які ДНК-полімерази беруть участь у реплікації еукаріотичної ДНК.
12. У чому полягає роль ферменту теломераза?
13. У чому полягають особливості реплікації архей?
14. У чому полягають особливості σ -типу реплікації?
15. У чому полягають особливості θ -типу реплікації?
16. У чому полягають особливості реплікації за типом утворення D-петлі?
17. У чому полягають особливості реплікації за типом множинних вічок?

Матеріали самостійного опрацювання:

1. Точка початку реплікації (*ori*-сайт).
2. Реплікативна вилка.

3. ТРАСКРИПЦІЯ ТА ЇЇ РЕГУЛЯЦІЯ

При транскрипції триває синтез молекул РНК усіх типів, оскільки на молекулі ДНК є ділянки, що кодують первинну структуру кожного виду РНК. Ділянка ДНК, де записана інформація про будову РНК, називається *транскриптон*, або *оперон*. *Транскрипція* – це переписування генетичної інформації з певного оперону ДНК. Цей процес має як схожість, так і відмінності з реплікацією.

Схожість:

- 1) обидва процеси починаються з деспіралізації ДНК;
- 2) після деспіралізації розриваються водневі зв'язки між азотистими основами обох ланцюгів ДНК і утворюється реплікативна вилка;
- 3) за рахунок розриву макроергічних зв'язків при відщепленні пірофосфатів відбувається утворення фосфодієфірних зв'язків між азотистими основами.

Відмінності:

- 1) під час реплікації ДНК деспіралізується на усьому тяжі, а при транскрипції – тільки певна її ділянка, яка називається транскриптоном. У транскриптоні розрізняють *ген-оператор*, *ген-промотор*, *структурні гени* і *гени-термінатори*;
- 2) під час транскрипції використовуються НТФ (на відміну від дНТФ в них рибоза замість дезоксирибози; урацил замість тиміну);

3) під час транскрипції списування інформації триває тільки з певного транскриптона;

4) полімеразна реакція при транскрипції каталізується РНК-полімеразою. Розрізняють три види РНК-полімераз, що позначаються римськими цифрами. Кожен вид ферменту каталізує синтез одного з трьох видів РНК. РНК-полімераза приєднується до гена-промотора. Для активності цього ферменту необхідний додатковий білковий чинник (сигма-чинник), який сприяє міцнішому зв'язуванню РНК-полімерази з промотором. Синтез РНК відбувається у напрямі 5' до 3'. У міру звільнення промотора до нього можуть приєднуватися нові молекули РНК-полімерази, так що ген може транскрибуватися одночасно великою кількістю молекул ферменту. При досягненні ферментом кодону, що термінує, синтезована пре-РНК відділяється від ДНК. У цьому процесі бере участь особливий білковий чинник – *ро*-фактор;

5) посттранскрипційна модифікація молекул пре-РНК (процесинг РНК).

Для нормального функціонування будь-якої РНК необхідно, щоб її первинна структура складалася тільки з ділянок, списаних із екзонів ДНК. Спочатку утворені РНК ще незрілі і називаються пре-мРНК, пре-тРНК, пре-рРНК. Ці пре-РНК піддаються процесингу. Спочатку за участю спеціальних ферментів вирізуються ділянки, що "мовчать", а потім інформативні ділянки "зшиваються", утворюючи цілий полінуклеотидний ланцюг. "Зшивання" називається *сплайсингом*. Наступні перетворення специфічні для кожного виду РНК.

Для мРНК – це *кепування* або "надягання шапочки", тобто приєднання до початкового кінця (до 5'-кінця) 7-метилгуанозина через три залишки фосфорної кислоти; це "голова" мРНК. До кінцевої ділянки (до 3') в ядрі або в цитоплазмі приєднується поліаденілат (складається з 100-200 залишків АМФ), утворюється "хвіст" мРНК – це є процес *поліаденілювання*. Така маркіровка необхідна для позначення на пряму прочитування інформації в процесі біосинтезу білку.

Для тРНК молекули тРНК спочатку утворюються у вигляді великих попередників, що часто містять більше за одну молекулу тРНК, піддаються нуклеолітичному процесингу. Після звільнення від неінформативних ділянок у тРНК відбувається модифікація основ – з'являються мінорні основи (у результаті метилування та ін. реакцій). До 3' кінця тРНК у цитоплазмі приєднується ЦЦА-триплет. Він слугує місцем прикріплення відповідної амінокислоти.

Для рРНК процесинг цього виду РНК відбувається в ядерці (або «нуклеосомі»). Пре-рРНК в ядерці піддається метилуванню.

Усі типи зрілих РНК потім з'єднуються з білком, який захищає їх від руйнування, покращує транспортування до цитоплазми.

Помилки процесингу можуть викликати деякі захворювання, наприклад, певні види таласемії.

Для того, щоб інформація, що зберігається в ДНК, могла бути використана, її необхідно транскрибувати у послідовність РНК. При цьому ДНК слугує тільки матрицею, тобто вона не міняється в процесі транскрипції. Послідовності ДНК, що транскрибуються – ділянки ДНК, що кодують певні білки, називається *генами*. Встановлено, що геном ссавців містить принаймні 50000 індивідуальних генів, які разом складають менше 20 % сумарної ДНК генома. Функція "надмірних" послідовностей ДНК до кінця не встановлена.

Транскрипція – процес перенесення генетичної інформації від ДНК до РНК. Усі види РНК – мРНК, рРНК і тРНК – синтезуються відповідно до послідовності основ у ДНК, що слугує матрицею. Відразу ж слід вказати на те, що матрицею для синтезу РНК слугує та нитка ДНК, яку іноді називають "захисною", – несправний ланцюг (3'→5'). Ми збережемо назву тієї, що "кодує" або "смилова" (5'→3') для тієї нитки ДНК, яка не слугує матрицею для синтезу РНК. Адже саме її послідовність нуклеотидів в точності відтворюватиме РНК, що синтезована по матриці іншої, комплементарної нитки ДНК.

У деяких випадках (бактеріофаг фХ174) усі мРНК транскрибуються з одного і того ж ланцюга. Дуже рідко транскрипція відбувається на обох ланцюгах в одному і тому ж місці, так що ланцюги РНК, що утворюються, виявляються комплементарні один одному; можливо, подібний спосіб транскрипції має особливе регуляторне значення.

В основу концепції взаємозв'язку генотипу і фенотипа була покладена теорія "один ген – один фермент". Проте ця теорія не враховувала молекулярну природу носіїв генетичної інформації і спосіб передачі цієї інформації від генів до білків. Не містила вона і ніяких припущень про механізм регуляції експресії генів. *Експресія генів* – це процес реалізації інформації закодованою в структурі ДНК, на рівні РНК і білків.

Прогрес в цих областях намітився відразу після того, як були встановлені наступні ключові положення:

- показано, що гени – це ділянки ДНК;
- розшифрована молекулярна структура ДНК;
- встановлено, що структура і функції білків визначаються їх унікальною амінокислотною послідовністю;
- виявлено, що передача інформації від ДНК до білків здійснюється за допомогою РНК;
- розроблені відносно прості бактерійні генетичні системи, що дозволяють зв'язати мутаційні зміни в генах із структурними змінами у відповідних білках;
- розроблені системи для вивчення синтезу РНК і складу білків *in vitro*.

Природу інформаційного зв'язку між ДНК і білками вдалося зрозуміти, проводячи генетичні і біохімічні дослідження мутацій в цьому гені і зіставляючи їх із специфічними змінами в амінокислотній послідовності відповідного білку; завдяки цим дослідженням було виявлено також колінеарність послідовностей нуклеотидів у ДНК і амінокислот у білках. Наявність такої кореляції мала на увазі існування генетичного коду, зв'язуючого нуклеотидні і амінокислотні послідовності обох полімерів (генетичний код), які хімічні процеси управляють трансляцією генетичного коду і як вони регулюються при формуванні та властиві різним клітинам і організмам фенотипів.

Зараз природа генетичного коду відома, складений словник, що переводить нуклеотидну послідовність в амінокислотну. Встановлені і особливості різних етапів експресії генів і їх регуляція, хоча багато молекулярних деталей ще чекають свого роз'яснення.

Транскрипція і дозрівання РНК: загальні відомості

Транскрипція здійснюється ДНК-залежними РНК-полімеразами. Вони діють подібно до ДНК-полімераз, за винятком того, що включаються до ланцюгу, що знову синтезує РНК рибонуклеотиди замість дезоксірибонуклеотидів і не потребують праймерів. Еукаріотичні клітини зазвичай містять принаймні три різні типи РНК-полімераз, РНК-полімераза I каталізує синтез РНК з коефіцієнтом седиментації 45S, яка служить попередником трьох різних рибосомних РНК. РНК-полімерази II синтезують гРНК, що є попередниками мРНК і мяРНК. Нарешті, РНК-полімераза III транскрибує гени, які кодують тРНК, 5S-рРНК і деякі мяРНК. Ці РНК є попередниками функціональних РНК, що утворюються в процесі дозрівання РНК. РНК-полімераза II інгібується α -аманітіном (отрутою блідої поганки).

Структура β -глобінового гена

Як приклад організації невеликого еукаріотичного гена представлена схема гена (рис. 4), кодуючого β -ланцюг гемоглобіну (146 амінокислот). Цей ген сформований із понад 2000 п.о. (2 тис. п.о.). Проте з них тільки близько 450 п.о. несуть інформацію про амінокислотну послідовність β -глобіну. Окрім трьох кодуючих ділянок (*екзонів*), ген включає два що не кодують (*інтрони*, I1 і I2). На 5'- кінці гена розташовується промоторна ділянка (рожевий колір) завдовжки приблизно 200 п.о., який має регуляторну функцію. Транскрипція починається з 3'- кінця промоторної ділянки і триває, поки не досягне сайту

поліаденилювання. Первинний транскрипт (гяРНК) β -глобінового гену, що утворюється, складається з ~1600 п.о. Під час дозрівання РНК некодуючі послідовності, відповідні

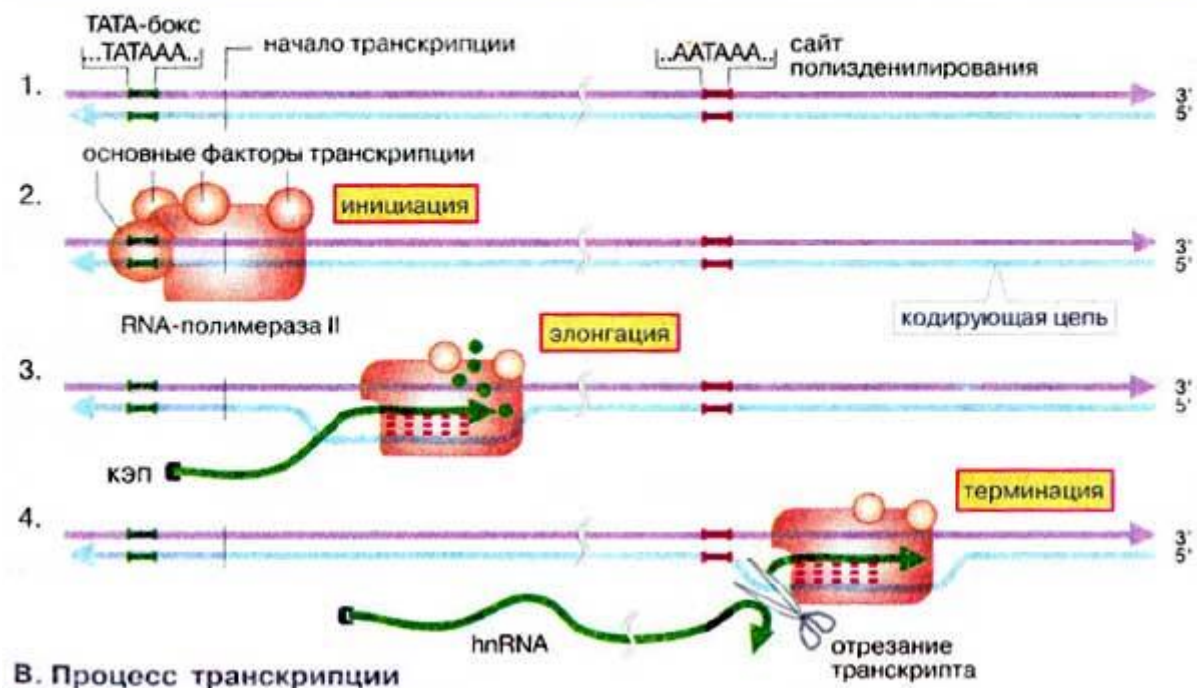
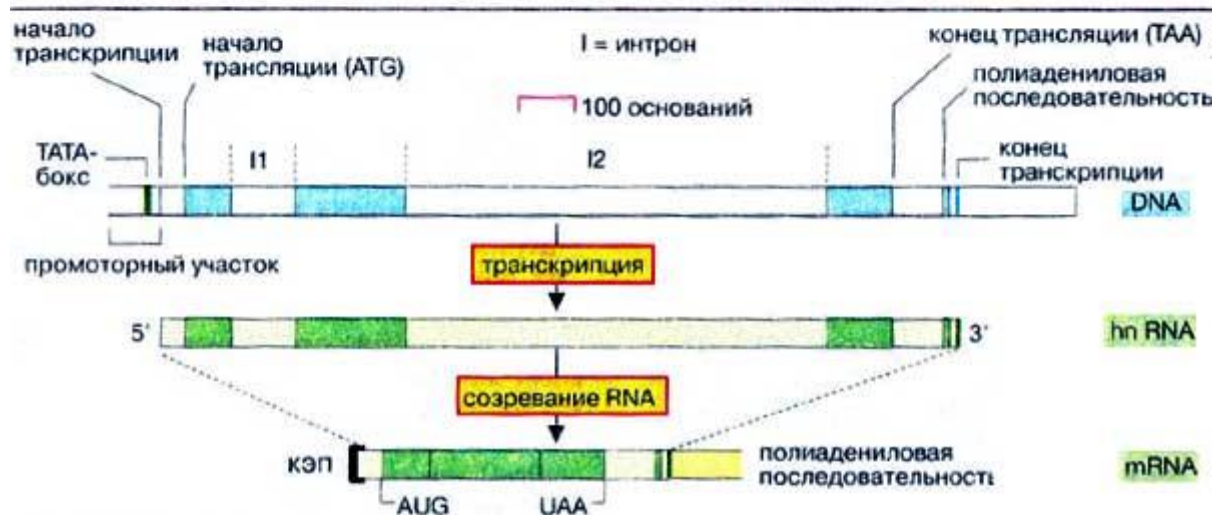
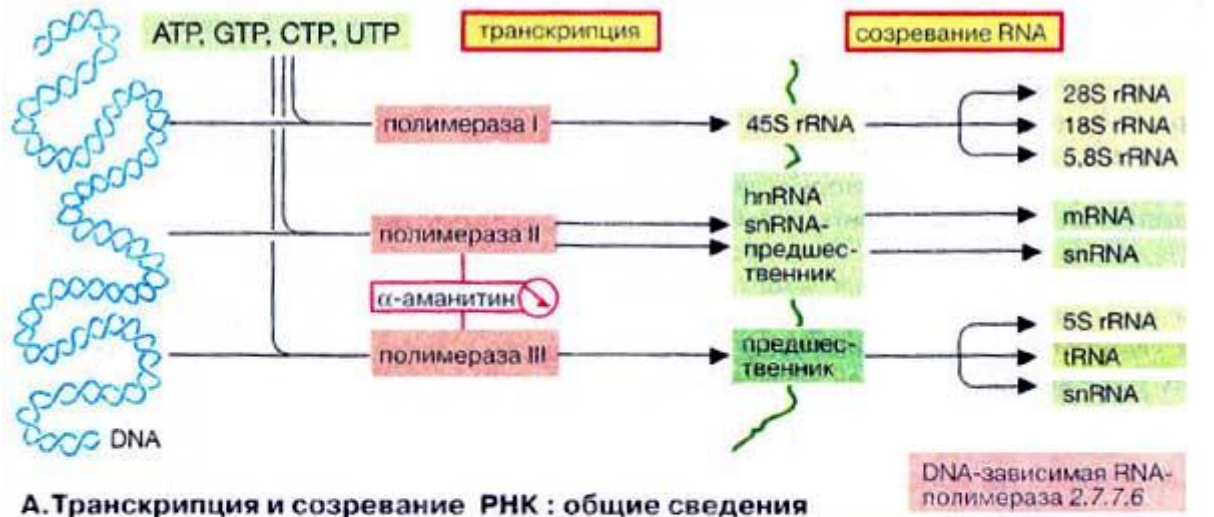


Рис. 4. Процес транскрипції

інтронам, віддаляються і, крім того, обидва кінці гяРНК модифікуються. Зріла β -глобінова мРНК включає в собі ~40% гяРНК і додатково 3'-кінцеву послідовність з 100-200 АМФ ("полі-А-сегмент"; фрагмент).

У багатьох генів розподіл на екзони і інтрони ще більше виражений. Так, загальна довжина гена дигідрофолатредуктази складає вище 30 тис.п.о. Інформація про амінокислотну послідовність розподілена по 6 екзонах, які в сумі складають тільки ~6 тис.п.о.

Процес транскрипції

Як уже згадувалося, РНК-полімераза II зв'язується з 3'-кінцем промоторної ділянки. Послідовність, що забезпечує це зв'язування, так званий ТАТА-бокс, коротку А- і Т-збагачену ділянку, послідовність якої злегка варіює у різних генів. Типова послідовність (канонічна) – ..ТАТААА.. . Для взаємодії полімерази з цією ділянкою необхідні декілька білків, основних чинників транскрипції. Додаткові чинники можуть або стимулювати, або інгібувати цей процес (контроль транскрипції).

Після ініціації синтезу (2), РНК-полімераза рухається у напрямі 3'→5' матричного ланцюга. В процесі ініціації фермент розділяє коротку ділянку подвійної спіралі ДНК на два окремі ланцюжки. Нуклеозидтрифосфати зв'язуються комплементарно на кодуючому ланцюжку ДНК водневими зв'язками і крок за кроком приєднуються до зростаючої молекули РНК (3). Незабаром, після початку елонгації 5'-кінець транскрипту захищається "кепом" (від англ. *cap*). Як тільки транскрипція доходить до сайту поліаденілювання (звичайно це послідовність ..ААТААА..), транскрипт відщеплюється (4). Після цього полімераза припиняє транскрипцію і диссоціює від ДНК.

Процес транскрипції у про- і еукаріот істотно відрізняється...

Транскрипція у прокариот

Фермент, що веде матричний синтез РНК називається *РНК-полімераза* (не синтезують РНК-праймери для реплікації, РНК-праймери синтезують спеціальні РНК-полімерази – *праймази*). Він копіює інформацію, "записану" в гені. Так ми називатимемо ділянку ДНК, що направляє синтез комплементу молекул РНК. Одні з цих молекул кодують далі синтез білків, а також елементів, що беруть участь в регулюванні цього синтезу. Такі РНК умовимося називати *інформаційними* (іРНК). Інші гени направляють (безпосередньо) синтез стабільних молекул клітинних РНК. Втім, іноді гени декількох функціонально пов'язаних білків розташовуються на ДНК поруч, у вигляді "кластера" генів і "прочитуються" РНК-полімеразою за один прохід. Таку групу генів іменують *опероном*. Відповідна йому іРНК направляє рибосомальний синтез усіх цих білків.

У клітині *E.coli* одна і та ж РНК-полімераза (ДНК-залежна РНК-полімераза) веде синтез усіх типів РНК (інформаційних – іРНК, рибосомальних – рРНК і транспортних – тРНК). Для холоферменту РНК-полімерази характерні: молекулярна вага $M \sim 487$ тис. дальтон і 5 субодиниць. Альтернативна, форма ферменту, звана *кор*-ферментом або кором, позбавлена окремих субодиниць (тобто *кор*-фермент + ...-субодиниця = холофермент), що беруть участь в зв'язуванні рибонуклеозидтрифосфатів в реакціях ініціації і елонгації. Комплекс і відповідні субодиниці беруть участь в неспецифічному міцному зв'язуванні з ДНК і в специфічній взаємодії ферменту з промоторами – сайтами, що детермінують ініціацію транскрипції. Певні субодиниці забезпечують ефективне зв'язування холофермента з промотором, а при їх від'єднанні *кор*-фермент, що залишився, перемикається на елонгацію.

У вищих організмів відомі три різні ферменти: РНК-полімераза I, РНК-полімераза II, РНК-полімераза III.

Місце посадки РНК-полімерази чітко фіксоване промотором – ділянкою ДНК, як правило, збагаченою такими, що стоять підряд основами А і Т. Промотори різних генів схожі за своєю будовою, але не тотожні.

РНК-полімераза знімається з ДНК після досягнення нею термінатора – певної послідовності нуклеотидів ДНК, що нерідко утворює невеликі петлі – комплементарно спарені ділянки однієї нитки. Термінатор завжди розташовується далі *стоп-кодону* – трійки нуклеотидів, що визначають закінчення синтезу білку по матриці іРНК.

Синтез РНК на ДНК-матриці

Дволанцюжкова молекула ДНК – це фізіологічна матриця для синтезу усіх клітинних РНК. Навіть якщо геном, як у деяких вірусів, представлений одноланцюговою ДНК, остання перед транскрипцією обов'язково переходить у дволанцюгову реплікативну форму. Транскрибована може бути будь-якою з двох ланцюгів ДНК генома. Проте матрицею при транскрипції окремого гена зазвичай служить тільки якась одна з них.

Нуклеотидними попередниками для синтезу РНК являються чотири рибонуклеозид-5' трифосфати: АТФ, ГТФ, УТФ і ЦТФ. Багато РНК містять модифіковані нуклеотиди, але зміни в азотистих основах і рибозних залишках відбуваються після полімеризації, тобто посттранскрипційно. Проте РНК-полімерази можуть використовувати рибонуклеозид-5' трифосфати, відмінні від вказаних чотирьох за умови, що модифіковані основи мають здатність до спаровування, порівнянну з такою для А, Г, Ц і У.

РНК-полімерази каталізують реакцію приєднання 3'-ОН-групи нуклеотиду, що знаходиться на зростаючому кінці ланцюга, до певного фосфату наступного рибонуклеозид-5'трифосфата. Багатократне повторення цієї реакції призводить до поступового подовження ланцюга РНК. Утворення кожного нового фосфодієфірного зв'язку супроводжується вивільненням неорганічного пірофосфату; швидкий гідроліз пірофосфату до неорганічного фосфату *in vivo* робить реакцію утворення фосфодієфірного зв'язку енергетично вигідно.

Транскрипція аналогічна реплікації в тому сенсі, що для її здійснення також необхідна ДНК-матриця. Порядок приєднання нуклеотидів визначається спаровуванням комплементарних основ. Щоб могло відбуватися комплементарне спаровування кожного наступного нуклеозидтрифосфата з матричною основою, що транскрибувалася, спіраль ДНК під час транскрипції повинна розкручуватися за допомогою РНК-полімерази. Зростаючий ланцюг РНК залишається пов'язаним з ферментом і спареним своїм зростаючим кінцем з ділянкою матричного ланцюга завдовжки 20-30 нуклеотидів; інша частина ланцюгу, що утворився, не пов'язана ні з ферментом, ні з ДНК. У міру продовження транскрипції ланцюги ДНК, що тимчасово розійшлися, возз'єднуються і відновлюється початкова дуплексна структура.

Звідси відмінності транскрипції і реплікації:

- транскрипція – консервативна (подвійна спіраль ДНК зберігається, а синтезована РНК відділяється), а реплікація – напівконсервативна (обидва ланцюги початкового дуплексу розподіляються по двох дочірніх спіралях);
- реплікація починається тільки з приманки, а ініціація синтезу РНК за допомогою РНК-полімерази йде *de novo*, починаючись з рибонуклеозидтрифосфату, відповідного першому нуклеотиду в ланцюзі РНК.

Нарощування РНК йде у напрямі 5'- до 3'-кінця уздовж матричного ланцюга, орієнтованого у напрямі 3'→5', тобто антипаралельно. Незважаючи на процесний характер елонгації (фермент не відділяється від матриці упродовж усього раунду транскрипції), її швидкість уздовж матриці непостійна – в деяких місцях фермент робить зупинки; можливо, це відбувається там, де в одноланцюговій ДНК або в самій РНК утворюються внутрішньоланцюгові дуплекси, що заважають просуванню полімерази. Такі паузи можуть при певних обставинах призводити до передчасної термінації транскрипції.

Сигналами для нормальної термінації і відділення синтезованої РНК і полімерази від матриці є особливі структури РНК-шпильки.

Який механізм односпрямованого руху РНК-полімерази уздовж матричної ДНК залишається поки що таємничим. Невідомо доки і як розплітається і заплітається знову під час транскрипції дуплекс ДНК і чому відновлення цього дуплексу вигідніше, ніж утворення дуплексу ДНК-РНК. Можна лише відмітити, що оскільки РНК-полімераза одна виконує ці функції *in vitro*, навіть у разі ковалентно замкненої кільцевої матричної ДНК, усі секрети, мабуть, криються в самому цьому ферменті. Для порівняння згадаємо, що ДНК-полімерази не здатні до ініціації синтезу нових ланцюгів *de novo* і що в процесах розплітання і відновлення дуплексів при реплікації дволанцюгової ДНК беруть участь хелікази і топоізомерази.

Ініціація транскрипції

Транскрипція ініціюється при утворенні стабільного комплексу між холоферментом і специфічною послідовністю, званою промотором і розташованою на початку усіх одиниць транскрипцій. Вивчення нуклеотидної послідовності більш ніж 50 різних промоторних сайтів прокариот і мутаційний аналіз виявили тільки дві консервативні ділянки, мабуть тих що грають ключову роль у пізнаванні ним функціонуванні промотора. Одна з цих послідовностей складається з 6-7 пар основ і розташована приблизно на відстані біля 10 основ до того нуклеотиду, з якого починається транскрипція (+1); цей сигнал зазвичай означають як – 10-послідовність, або *Прібнов-бокс* – на честь її відкривача. Порівняльний аналіз – 10-послідовностей майже п'ятидесяти промоторів прокариот показав, що усі вони трохи відрізняються від консенсус-послідовності ТАТААТ. Підкреслена Т є присутньою майже в усіх промоторах, проте як по інших позиціях в кожному промоторі може спостерігатися від одного до декількох варіантів.

Друга послідовність, довжина якої зазвичай дорівнює дев'яти нуклеотидам розташована на відстані біля 35 основ до сайту ініціації (*35-послідовність*) і також зустрічається в більшості промоторів прокариот. Нуклеотидна послідовність сегменту між – 35- і – 10-ділянками не є критичною, важлива лише відстань між цими ділянками. – 35-послідовність бере участь в зв'язуванні РНК-полімерази, що передуює переміщенню ферменту в *Прібнов-бокс*. Можливо, РНК-полімераза викликає локальне розкручування спіралі, починаючи цей процес з *Прібнов-боксу*, і створює умови для ініціації синтезу РНК.

Залишається відкритим питання, чи досить простого зв'язування РНК-полімерази з промотором для локальної розбіжності ланцюгів біля сайту ініціації синтезу РНК, або РНК-полімераза розплітає спіраль в стартовому сайті? Незалежно від механізму утворення "відкритого" промоторного комплексу... дозволяє РНК-полімеразі здійснити спаровування першого і другого рибонуклеозидтрифосфатів із матричним ланцюгом і каталізувати утворення першого фосфодіефірного зв'язку.

Відмінності в ефективності транскрипції індивідуальних генів частково залежать від структури їх промоторів:

- конкретна нуклеотидна послідовність – 35-ділянку визначає міцність взаємодії РНК-полімерази з промоторною послідовністю;
- конкретна нуклеотидна послідовність – 10-ділянка визначає ефективність утворення "відкритого" промоторного комплексу;
- мутації в цих ділянках призводять до значних змін здатності багатьох промоторів забезпечувати ініціацію транскрипції;
- якщо промотор малоефективний, то ініціація транскрипції полегшується включенням білків зблизька з – 35-ділянкою, саме вони збільшують вірогідність того, що вона буде виявлена РНК-полімеразою і зв'яжеться з нею; крім того, зв'язування білків-активаторів

може привести, також, до зміни структури ДНК і тим самим сприяти ініціації транскрипції;
- підвищенню або зниженню ефективності деяких промоторів може сприяти зміна топологічної структури ДНК (наприклад, збільшення числа негативних надвитків).

Термінація транскрипції і відокремлення ланцюгів РНК

Послідовності ДНК, що є сигналами зупинки транскрипції, називаються *термінаторами*. Виявлено два типи сигналів термінації – *залежний* і *незалежний* *термінатори*. Обидва вони мають деякі загальні ознаки. І той і інший містить інвертовані повтори, завдяки чому 3'-кінці РНК-транскриптів складаються з утворенням шпильок різної довжини. Стебла шпильок незалежних термінаторів зазвичай містять ГЦ-богаті ділянки; один з них знаходиться поблизу основи стебла, і до нього примикає ділянка, що складається з 4-6-У- і 1-2-А-залишків. У стеблі залежних термінаторів, навпаки, міститься лише декілька ГЦ-пар (а іноді і не міститься взагалі), а У-3'-кінці можуть бути відсутніми. Точний механізм незалежної і залежної термінації транскрипції є доки предметом дискусій. Найбільш ймовірно наступне пояснення незалежної термінації:

- РНК-полімераза зупиняється після транскрипції інвертованого повторення тому, що шпилькова структура виявляється перешкодою. В результаті відразу після зупинки процесу РНК відділяється від матричного ланцюга зблизка У-богатої ділянки, яка відносно слабо пов'язана з А-богатою ділянкою матриці. Цим, мабуть, пояснюється та обставина, що найчастіше на кінці ланцюга РНК знаходяться У- або А-залишки;

- олігомерний білок, що міцно зв'язується з РНК і в цьому стані гідролізуючий АТФ до АДФ і неорганічного фосфату. В одній їх моделей дія білка пояснюється тим, що він зв'язується з ланцюгом, що синтезується РНК і переміщається уздовж неї у напрямі 5'→3' до місця синтезу РНК; необхідна для його переміщення енергія виділяється під час гідролізу АТФ. Якщо білок натрапляє на шпильку, що утворюється в РНК, він зупиняє полімеразу, яка могла б продовжувати транскрипцію. Можливо, для від'єднання РНК від матриці досить цієї білок-індукованої зупинки, але не виключено, що дисоціації і відділенню сприяє сам білок;

- термінація транскрипції рідко є абсолютно залежною або абсолютно незалежною від білка. Деякі білок-незалежні термінатори працюють у присутності білка ефективніше. А в деяких умовах так звані білок-залежні термінатори викликають термінацію і за відсутності цього білка, хоча і не так успішно.

Термінація, як і ініціація синтезу РНК є регульованим процесом. Існують білки, що функціонують як антитермінатори і запобігають термінацію в ?-незалежних термінаторах; відомі також інші білки, інгібірувальні ? і тим самим ланцюги, що забезпечують подовження, після сигналів термінації. При певних обставинах молекули РНК можуть утворювати альтернативні шпилькові структури на особливих послідовностях певних ділянок ДНК. Одні з таких структур можуть призводити до абортів термінації, а інші – до продовження транскрипції.

Посттранскрипційний процесинг РНК у прокариот

Це процес дозрівання, при якому первинний РНК-транскрипт модифікується і перетворюється на зрілу РНК. Характер і міра модифікації РНК залежать від типу РНК.

Молекула мРНК у прокариот не піддається процесингу. У деяких бактерій транскрипція і трансляція зв'язані, тобто відбуваються одночасно. 5'-кінець мРНК може транслюватися на рибосомі і потім піддаватися деградації ще до завершення синтезу її 3'-кінця.

Молекули тРНК спочатку синтезуються у вигляді про-тРНК, яка приблизно на 20% довше, ніж відповідна тРНК. Зайві послідовності, розташовані у 5'- і 3'-кінцях, відділяються за допомогою таких ферментів, як рибонуклеаза Q і Р. Іноді молекула про-тРНК складається з двох або більше за молекули тРНК, сполучених між собою. Їх

розподіл також здійснюється за допомогою рибонуклеаз. Якщо 3'-кінець тРНК не несе кінцевої послідовності ЦЦА, то ці основи приєднуються при постсинтетичній модифікації. Усі тРНК містять мінорні основи. Ця модифікація відбувається після завершення транскрипції.

Гени рРНК прокариот розташовані в блоках транскрипцій. Три гени рРНК *E.coli* (16S, 23S, 5S) розташовуються разом із генами декількох тРНК в одному такому блоці і транскрибуються у вигляді однієї молекули РНК. Ці молекули рРНК і тРНК відокремлені один від одного спейсорою РНК. Розщеплювання первинного транскрипту на окремі складові каталізує рибонуклеаза Q; оскільки цей фермент специфічний до дволанцюгової РНК, припускають, що в ділянці спейсерів утворюються дволанцюжкові шпильки, які фермент дізнається і вирізає.

Транскрипція в еукаріот

РНК-полімераза I (М ~ 473 тис., 6 субодиниць) веде синтез великих молекул рРНК і малих молекул, так званою, 5,8S рРНК по ДНК ядерця. Вона – "найпрацьовитіша". На долю рРНК доводиться близько 80% усієї РНК клітини за масою. В ядрі ж відбувається і "самосборка" (але не об'єднання) двох субодиниць рибосоми (великої і малої) за участю рибосомальних білків, що поступають з цитоплазми. В клітинах більшості еукаріотів є сотні ідентичних копій генів рРНК розташованих поруч один з одним.

РНК-полімераза II. Вона більше (М – 882 тис., 10-12 субодиниць) і виконує найвідповідальнішу роботу – синтезує безліч різних іРНК, що направляють, у свою чергу, синтез білків у рибосомах. Хоча на долю іРНК у клітині доводиться не більше 2% від сумарної РНК, РНК-полімераза II не слід вважати малопродуктивним ферментом. Адже іРНК нестабільна, легко руйнується. Вважається, що час руйнування існуючих молекул іРНК у бактерій складає декілька хвилин, а у тварин – декілька годин. Але необхідно мати на увазі, що, принаймні, частина іРНК еукаріотів виходить до цитоплазми клітини в комплексі з білком (*інформосоми*). У ряді випадків показано, що вони зберігаються довше. За час життя клітини синтезується безліч її молекул, що змінюють один одного, відповідно до змін потреб білкового синтезу. Молекулярна маса іРНК коливається, – залежно від розмірів білків, що синтезуються, – в межах від 50 тисяч до 4 мільйонів дальтон. На початку транскрибованої ділянки іРНК знаходиться спеціально закодоване посадочне місце для рибосом (при напрацюванні декількох копій білку рибосоми "сідають" на це місце одна за одною). РНК-полімераза II знаходиться в нуклеоплазмі.

РНК-полімераза III в еукаріотів (М – 653 тис., 9 субодиниць) веде синтез стабільних малих молекул тРНК і, так званої, 5S рРНК. Остання так само, як і 5,8S рРНК, входить до складу великої субодиниці рибосоми еукаріотів. У рибосомах бактерій 5,85S рРНК немає. Знаходиться в нуклеоплазмі.

Будова і організація одиниць транскрипції в еукаріот значно складніші, ніж у прокариот. Частково це зумовлено використанням трьох різних систем транскрипції (якщо не брати до уваги системи транскрипції генів мітохондрій і хлоропластів).

Гени класу I, кодуючі 5,8S-, 18S- і 28S рРНК, транскрибуються РНК-полімеразою I.

Гени класу II, що кодують усі мРНК і ряд малих ядерних РНК (мяРНК) утворюються РНК-полімеразою II.

Гени класу III, кодуючі тРНК, 5S рРНК і деякі малі цитоплазматичні РНК (мцРНК) транскрибуються РНК-полімеразою III.

На відміну від прокариотичних генів, майже завжди колінеарних своїм РНК, багато генів еукаріот мають мозаїчну будову: чергування кодуючих (екзони) і некодуючих (вставні послідовності або інтрони) послідовностей в межах одиниці транскрипції. Інтрони найчастіше зустрічаються в генах, що кодують білки і тРНК, і рідше – у рРНК-генах. Інtronів немає тільки в еукаріотичних генах, що кодують п'ять гістонів, деякі інтерферони і білки деяких вірусів ссавців. Розміри, число і місце розташування інtronів у

різних генів різні. Звичайне число інтронів на ген зростає пропорційно довжині послідовності, що кодує білок, а розміри екзонів в середньому складають близько 300 п.н. У цілому загальна довжина інтронів перевищує сумарну довжину екзонів у 2-10 разів. Інтрони розташовуються в одиницях транскрипції не випадковим чином. У генах тРНК вони примикають до петель антикодонів, а в білок-кодуючих генах часто знаходяться між сегментами, що кодують окремі структурні або функціональні домени білку.

Гени прокаріот організовані в оперони і їх експресія опосередкована поліцистронною мРНК. На відміну від прокаріот в еукаріот утворюються мРНК, що кодують тільки один білок. Навіть якщо ген кодує не один вид мРНК, кожна зріла мРНК має тільки одну трансльовану кодуючу послідовність.

Ми визначаємо ген як сукупність сегментів ДНК, яка разом складає одиницю експресії, що зумовлює утворення специфічного функціонального продукту, – або молекули РНК, або поліпептиду. До сегментів ДНК, що становить ген, відносяться:

1. Одиниця транскрипції, яка є протяжною ділянкою ДНК, що кодує послідовність первинного транскрипту; у неї входять:

а) послідовність, що кодує або зрілу РНК, або білковий продукт;

б) інтрони;

в) 5'-лідерна і 3'-трейлерна послідовності, які є присутніми в зрілих мРНК, а також проміжні послідовності (*спейсери*), які віддаляються в ході процесингу первинних транскриптів генів, що кодують РНК.

2. Мінімальні послідовності, необхідні для початку правильної транскрипції (промотор) і для утворення правильного 3'-кінця зрілої РНК.

3. Послідовності, що регулюють частоту ініціації транскрипції; до них відносяться послідовності, відповідальні за індукцйбельність і репресію транскрипції, а також клітинну, тканинну і тимчасову специфічність транскрипції. До їх числа відносяться *енхансери* і *сайленсери* – послідовності, які чинять дистанційний вплив на ініціацію транскрипції незалежно від своєї орієнтації відносно точки початку транскрипції.

Для ініціації транскрипції за участю трьох різних РНК-полімераз використовуються різні регуляторні послідовності, при цьому останні розташовуються кожна на певній відстані від точки початку транскрипції. Крім того, для РНК-полімерази кожного типу необхідні свої допоміжні білки (чинники транскрипції), які зв'язуються з цими регуляторними послідовностями.

Для включення і виключення транскрипції еукаріотичних структурних генів використовується безліч різноманітних високоспецифічних процесів. Багато хто з чинників транскрипції зв'язується безпосередньо з нуклеотидною послідовністю завдовжки менше 10 п.н., звані по-різному: боксом/модулем/елементом ініціації/регуляторним елементом. На відміну від прокаріот у еукаріот оперони в більшості випадків відсутні, тобто кожен еукаріотичний структурний ген має свій власний набір регуляторних елементів. Істотну роль в регуляції транскрипції в еукаріот грає також білок-білкова взаємодія.

Незважаючи на індивідуальність набору регуляторних елементів у структурних генів еукаріот, кожен з них має промоторну ділянку (ТАТА-бокс або *бокс Хогнеса*) з восьми нуклеотидів, що включає послідовність ТАТА; послідовність ЦЦААТ (*ЦАТ-бокс*); ділянка з динуклеотидів ГЦ (*ГЦ-бокс*), що повторюються. Ці елементи знаходяться на відстані 25, 75 і 90 п.н. від сайту ініціації відповідно. Транскрипція структурного гена еукаріот починається із зв'язування з ТАТА-боксом чинника транскрипції IID (TFIID), який є комплексом з приблизно 14 білків. Потім з TFIID і ділянками ДНК, що примикають до ТАТА-боксу зв'язуються інші чинники транскрипції і, нарешті, з усім цим комплексом транскрипції зв'язується РНК-полімераза II. Потім за участю додаткових чинників відбувається ініціація транскрипції в точці +1. Зрозуміло, що якщо послідовність ТАТА відсутня, або суттєво змінена, то транскрипція структурного гена стає неможливою. Ідентифіковані також чинники транскрипції специфічні для регуляторних елементів

ЦЦААТ і ГЦ, але доки не відомо, як ДНК-білкові взаємодії можуть впливати в цьому випадку на ефективність транскрипції, якщо елементи розташовані на відстані більше 75 п.н. від сайту ініціації. Крім того, на відстані сотень і навіть тисяч пар основ від сайту ініціації знаходиться так звана *енхансерна послідовність*, яка багаторазово підвищує швидкість транскрипції структурних генів. Мабуть, зближення видалених регуляторних елементів і відповідного структурного гена відбуваються при укладанні хромосомної ДНК. Крім того, чинники транскрипції, які зв'язуються з певними енхансерами і регуляторними елементами, можуть утворювати ланцюжок, що сполучає віддалені один від одного сайти.

Деякі репресовані (не експресуючі) гени активуються каскадом подій, який запускається яким-небудь специфічним позаклітинним сигналом, наприклад, підвищенням температури, або синтезом гормону. Гормон, поступивши до кровотоку, зв'язується з рецепторами специфічних клітин, що полегшують його проникнення в клітину. Опинившись в клітині, гормон вступає у взаємодію з одним з клітинних білків і змінює його конформацію. У такому зміненому стані білок проникає в ядро і зв'язується із специфічним регуляторним елементом, який ініціює транскрипцію відповідного гена.

Існують також білки, що, за взаємодії з регуляторними елементами блокують транскрипцію. Наприклад, відомий клас генів хребетних, що активно транскрибуються тільки в нервових клітинах. Кожен із цих генів має регуляторний елемент з 24 п.н., що знаходиться "лівише" за сайт +1; він позначається NRSE (від англ. Нейрон рестректив. силенцер. елемент). В усіх клітинах, окрім нейронів, синтезується NRSF-фактор, який зв'язується з NRSE і блокує транскрипцію відповідних генів. У нейронах NRSF не синтезується, і згадані гени активно транскрибуються.

Таким чином, структурний ген може мати безліч регуляторних елементів, які активуються специфічними сигналами в клітинах різного типу в різний час клітинного циклу. У синтезі РНК також виділяють стадії ініціації, елонгации і термінації, але в цих процесах часто беруть участь інші ферменти і послідовності основ, ніж у прокариот, проте першими основами, що включаються в РНК при ініціації, є, як і у прокариот, А або Г.

Регуляція біосинтезу білків на етапі транскрипції

Проблеми, пов'язані з регуляцією метаболічних процесів, – найважливіші в системі біохімічних і генетичних знань, і діляться на два великі класи:

1. Уявлення про молекулярні механізми процесів регуляції, які являються, швидше, предметом молекулярної біології і, частково, молекулярної генетики.
2. Феноменологічне вираження наслідків регуляторних подій, визначальний напрям протікання біохімічних процесів, що, власне, і є предметом біохімії, частково – молекулярної генетики.

Регуляцією метаболізму називається управління швидкістю біохімічних процесів шляхом оборотної зміни кількості білкових посередників, що беруть участь у цих процесах, або їх активності.

Білковий посередник – загальніший і точніший термін, ніж термін фермент. Хоча в багатьох біохімічних процесах білкові посередники є саме ферментами – каталізатори хімічних перетворень субстратів, але, наприклад, у транспорті субстратів через біологічні мембрани перенесення опосередковується білками, що не являються ферментами, оскільки вони не каталізують яких-небудь хімічних реакцій, а забезпечують пізнавання і транслокацію субстратів.

В окремих випадках роль посередника виконують не білки, а рибонуклеопротейди або сама РНК, але це, швидше, виключення. Відповідно до приведеного визначення слід виділяти два основні рівні регуляції:

- ☞ біосинтезу білкових посередників;
- ☞ їх активності.

Обидва рівні життєво потрібно для організму, і мутанти з порушенням хоч би одного, як правило, витісняються з популяції.

Біосинтез білків складається з процесів безпосередньої побудови і модифікації білкової молекули, а також з "підготовчих" процесів: реплікації генетичного матеріалу і його транскрипції. Зупинимось лише на деяких принципових питаннях, що мають значення для регуляції біосинтезу білку.

Необхідно відмітити, що термін *хромосома* як місце локалізації ДНК застосовується тільки до клітин еукаріот, проте як термін *бактеріальна хромосома* неточний і краще говорити про *генофор* або *нуклеоїд*, маючи на увазі під цими термінами ДНК-РНК-білковий комплекс. Ще точніший термін – *геномний еквівалент*, оскільки частина ДНК в бактеріальній клітині є присутньою в декількох копіях. Якщо в клітину бактерії поступає додатковий фрагмент ДНК, що несе нові алелі тих же локусів, то виникає так званий *міродиплоїд*.

Як і у разі біосинтезу інших біополімерів, процес реплікації ДНК включає три етапи: ініціацію, елонгацію і термінацію. Для реплікації характерні наступні особливості:

1. Вона здійснюється за напівконсервативним механізмом, причому ланцюги ДНК антипаралельні (3'-кінець містить залишок ортофосфату – Р, а 5'-кінець – ОН) і наступній транскрипції піддається тільки один ланцюг: синтез, мабуть, протікає переривчасто і у напрямі 5'→3'. Кожен ланцюг починається з РНК-приманки, фрагменти об'єднуються ДНК-лігазою з відчепленням РНК.

2. Система реплікації є мультиферментною, в неї входять 2-3 ДНК-полімерази, ДНК-лігаза, топоізомераза, необхідна для розплітання ланцюгів ДНК і наступної їх надспіралізації. Усього порядку 15 генетичних локусів кодують той або інший поліпептид, необхідний для реплікації.

Існують чотири основні типи:

- синтез фрагментів,
- реплікація плазмід,
- рекомбінаційний синтез ДНК,
- репараційний синтез ДНК.

У кожному з них беруть участь як загальні, так і специфічні компоненти.

Нативна система реплікації ДНК є мембранною і інактивується при руйнуванні мембран. Тому для моделювання процесу реплікації використовуються, як правило, спрощені системи, отримані з бактерійних "умовних" мутантів або з "маленьких" фагів.

Регуляція процесу реплікації ДНК найсуворіше здійснюється на етапі ініціації. Реплікація знаходиться під позитивним і негативним контролем, причому обидва вони зкоординовані з клітинним діленням.

У загальних рисах принцип такої регуляції можна сформулювати таким чином:

☒ При позитивному контролі відбувається накопичення активатора реплікації до порогового, достатнього для ініціації нового циклу реплікації рівня. Пороговий рівень досягається при подвоєнні клітинної маси так, щоб в клітинах, що знову утворилися, процес реплікації був би вже запущений і встиг завершитися до моменту нового ділення.

☒ При негативному контролі відбувається накопичення інгібітору ініціації реплікації, який повинен синтезуватися лише в обмеженій кількості незабаром після початку попереднього циклу реплікації. Такий інгібітор може бути продуктом гена, локалізованого поблизу від точки початку реплікації, транскрипція якого здійснюється тільки в період реплікації цієї ділянки ДНК. У процесі зростання клітини інгібітор "розбавляється", а до моменту подвоєння маси клітини рівень його падає нижче за критичний, що дозволяє клітині ініціювати новий цикл реплікації. Взаємодія цих двох механізмів і повинна координувати процеси реплікації ДНК і ділення клітини.

Реальні механізми регуляції реплікації ще не розшифровані. В еукаріот певну роль в регуляції реплікації, мабуть, грають гістони.

Особливості транскрипції генетичної інформації

Цей етап біосинтезу білків полягає в "переписуванні" інформації, закодованої в ДНК, на олігонуклеотидну послідовність інформаційної РНК і здійснюється РНК-полімеразою. Будова цього ферменту краще за все вивчена у бактерій *Escherichia*. Це складний білок з молекулярною масою 450 кДа. Його серцевина включає дві ідентичні α -субодиниці і дві різні ρ -субодиниці. До складу "повного" ферменту входить також α -субодиниця, відповідальна за процес пізнання промотора і ініціацію транскрипції. Нарешті, існує ще один білковий компонент, що означають ρ -фактор, який відповідальний за правильну термінацію транскрипції. Таким чином, РНКП *Escherichia coli* (це бактеріальна РНК-полімераза, яка відіграє ключову роль у транскрипції, тобто в процесі синтезу РНК на основі матриці ДНК) і ряду інших грамнегативних бактерій виглядає таким чином:

☑ У грампозитивних бактерій РНКП влаштована ще складніше. Наприклад, у разі *Bacillus subtilis* вона може містити декілька α -факторів, а у ряду архебактерій РНКП складається з 9-10 компонентів, наближаючись по складності будови до РНКП еукаріот.

☑ В клітинах еукаріот виявлено принаймні три типи РНКП. Полімераза I знаходиться в ядерці і транскрибує гени більшості рибосомних РНК; полімераза II – в нуклеоплазмі і транскрибує велику частину інших генів; полімераза III – гени транспортних РНК і одну з рРНК. Крім того, в мітохондріях і хлоропластах еукаріот є присутніми власні РНКП.

Між тим власне полімеразна реакція може здійснюватися набагато простішими ферментами. Так, РНКП "непарних" T3 і T7 фагов *Escherichia coli* складається з єдиного поліпептиду з молекулярною масою 110 кДа, а мітохондріальна РНКП є поліпептидом з молекулярною масою 64 кДа.

Мабуть, складна організація бактерійної і, особливо, еукаріотичних РНКП, з одного боку, зумовлює необхідністю "пізнавати" велике число промоторів, а з іншої – дозволяє здійснювати різноманітну регуляцію транскрипції в процесі функціонування цього ферменту.

Регуляція процесу транскрипції

Виходячи з можливості управління синтезом білкових посередників на етапі транскрипції, їх можна розділити на три основні групи:

- ☞ конститутивні білки, синтез яких не залежить від наявності субстратів і продуктів;
- ☞ індукцйбельні білки – їх синтез прискорюється у присутності субстратів;
- ☞ репресйбельні білки, синтез яких пригнічується надлишком кінцевого продукту цього метаболічного шляху.

У 1960-і роки Ф. Жакоб і Ж. Моно встановили, що в явищах індукції і репресії беруть участь білкові чинники – *репресори*, продукти спеціальних генетичних елементів – *генів-регулювальників*, здатні в певних умовах гальмувати процес транскрипції на етапі ініціації, тому обидва ці типи регуляції відносять до негативних.

В індукованому опероні ген-регулювальник кодує активний репресор, який блокує транскрипцію, взаємодіючи з операторною ділянкою ДНК і перешкоджаючи просуванню РНКП. Індуктор, що є початковим субстратом цього метаболічного шляху або близьким до нього з'єднанням, здатний взаємодіяти з репресором і інактивувати його, звільняючи таким чином операторну ділянку ДНК. У результаті РНКП починає транскрипцію цього оперону.

В опероні, що репресується, ген-регулювальник кодує неактивний репресор, який може переходити в активний стан і блокувати транскрипцію, з'єднуючись з оператором, тільки після взаємодії з надлишком кінцевого продукту цього метаболічного шляху.

Велику роль в регуляції транскрипції грає так звана катаболітна репресія, яка проявляється в *діауксії* в процесі зростання бактерій. Феномен діауксії виявляється, коли в середовищі є присутніми два субстрати, причому ферменти, що здійснюють катаболізм

одного з них, індукцйбельні, а ферменти, що здійснюють катаболізм іншого, конститутивні. У цьому випадку спочатку споживається тільки глюкоза, проте як індукція лактозних ферментів не відбувається до тих пір, поки не буде спожита основна частина глюкози. Це відбувається в тимчасовому уповільненні зростання культури на той період, який потрібний для індукції і синтезу *p*-галактозидаз. Таким чином, незважаючи на присутність в середовищі індуктора, альтернативний субстрат перешкоджає індукції.

Механізм явища катаболічної репресії полягає в наступному. Для індукції деяких "слабких" оперонів, у тому числі *D*зс-оперону, недостатньо інактивації негативного регулятора-репресора. Потрібна і участь позитивного регулювальника, що є комплексом спеціального активуючого білку з циклічною АМР. Цей білок, що активує транскрипцію, дістав назву *БАК-білка* або "білку, що активує катаболічні гени". БАК-білок є димером з молекулярною масою 45 кДа. Під дією сАМР він піддається конформаційним змінам і набуває підвищену здатність зв'язуватися з промотором. Вважають, що приєднання комплексу сАМР-БАК до ДНК послабляє спаровування Г-Ц-основ, сприяє частковому розподілу спіралей ДНК і полегшує формування комплексу РНКП, що ініціює транскрипцію з ДНК. Рівень сАМР у клітині зворотно пропорційний рівню АТР, і в присутності легко метаболічних субстратів, сприяючих підвищенню рівня АТР, сАМР "не вистачає" для утворення комплексу з БАК.

Тонкі механізми регуляції рівня сАМР пов'язані з функціонуванням фосфотрансферазної системи транспорту цукрів і тут не розглядаються.

Необхідно відмітити, що у ряду бактерій роль глюкози в катаболічній репресії можуть виконувати інші джерела енергії, які в цьому випадку гальмують катаболізм глюкози.

В індукцйбельних оперонах можливі й інші типи позитивної регуляції, незалежної від сАМР. Наприклад, в арабінозному опероні *Escherichia coli* арабіноза не просто інактивує репресор, але перетворює його на позитивного регулювальника. Аналогічне явище виявлене у разі оперонів галактози і рамнози.

У дивергентних регулонах транскрипція протікає у різних напрямках і може бути некоординованою, тобто здійснюватися з різною швидкістю. При цьому можливе прочитування з різних ланцюгів ДНК. Прикладом служить аргініновий оперон: в його частині, що включає 4 гени з 9, транскрипція трьох генів здійснюється в одному напрямі, а транскрипція іншого гена – в протилежному.

Ще одним прикладом позитивної регуляції процесу транскрипції є регуляція за участю генів – *енхансерів*. Раніше вважали, що цей тип регуляції характерний тільки для еукаріот. Але останнім часом формально схожі механізми виявлені і у прокариот. Особливість генів-енхансерів у тому, що вони проявляють свою стимулюючу активність незалежно від орієнтації і розташування відносно гена, що активується: можуть знаходитися перед геном, за ним і навіть усередині нього. Продуктами генів-енхансерів є білки з молекулярною масою 25-30 кДа, здатні зв'язуватися з промоторною ділянкою. Як правило, така система двохкомпонентна і включає "сигнальний" білок, здатний "відчувати" зміну умов довкілля і стимулювати синтез іншого білку – "активатор", який і запускає транскрипцію шуканого білкового посередника.

Перераховані механізми регуляції транскрипції на стадії ініціації досить швидко реагують на зміну зовнішніх умов, проте управляють роботою одного або невеликого числа оперонів в кожен момент часу. Разом із ними існують механізми системної регуляції, пов'язані із зміною функціонування одночасно великого числа оперонів.

У клітинах еукаріот це досягається шляхом конформаційних перебудов хроматину, процесингу іРНК, а також за рахунок управління трансляцією шляхом формування так званих *інформосом*.

У клітинах прокариот системна регуляція здійснюється шляхом модифікації специфічності роботи РНКП за допомогою зміни її компонентного складу. Ці механізми вступають в дію, коли треба активувати одночасно велике число нових промоторів або

змінити матрицю. Останній випадок вивчений найдетальніше на прикладі фагів *Escherichia coli* і *Bacillus subtilis*.

У геномі бактеріофагів є присутніми три типи генів: ранні, середні і пізні, такі, що класифікуються на підставі порядку їх транскрипції під час розвитку фага. Ранні гени завжди транскрибуються РНКП клітини-власника, а у разі транскрипції середніх і пізніх генів можливі декілька варіантів:

☑ серед продуктів ранніх генів є наявною власна фагова РНКП, а також білки-інгібітори РНКП хазяїна. Таким чином, відбувається зміна РНКП;

☑ серед продуктів ранніх генів є наявними нові α -фактори, що взаємодіють з "серцевиною" РНКП хазяїна і забезпечують транскрипцію середніх генів. Серед продуктів середніх генів, у свою чергу, є присутніми білки з функціями α -факторів, які забезпечують транскрипцію пізніх генів. Таким чином, відбувається зміна α -факторів;

☑ серед продуктів "ранніх" генів є білки, що модифікують "серцевину" РНКП хазяїна, в той часі як α -фактор хазяїна зберігається.

Регуляція транскрипції шляхом утворення специфічних α -факторів широко поширена і в бактерійних системах.

Особливий α -фактор контролює транскрипцію ряду генів азотного метаболізму. Нарешті, існують промотори, що активуються тільки при 50°, в їх транскрипції бере участь чинник *aE*.

Прикладом системної регуляції є і регуляція процесу спороутворення у бацил. До цього процесу залучаються сотні локусів, організовані в спеціальні структури і розкидані по усій молекулі ДНК. Одним із способів перемикання зростання на спороутворення служить зміна РНКП і, в першу чергу, її α -фактора. Така РНКП переважно транскрибує "ранні" гени спороутворення, важливу роль в якому грає також регуляція на рівні трансляції.

Інший приклад системної регуляції у прокариот: при дії на мікроорганізми нагрівання до супраоптимальної температури настає тепловий шок, що викликає координовану індукцію "білків теплового шоку". Транскрипція їх локусів і утворення головного чинника σ здійснюється під контролем мінорного чинника *c32*. Цей механізм забезпечує координацію процесів транскрипції і трансляції.

Регуляція на етапі термінації транскрипції

РНКП може "дізнаватися" про специфічні послідовності ДНК, що сигналізують про закінчення транскрипції. Ця її здатність посилюється або модифікується під впливом особливого поліпептиду – ρ -фактора, що забезпечує нормальну термінацію.

Разом із цим у складі ряду регулонів виявлені так звані *атенюатори*, тобто ділянки ДНК, що викликають передчасну термінацію, також ρ -залежну. Ці генетичні елементи розташовуються між оператором і першим структурним геном в регулонах, що контролюють біосинтез ряду амінокислот. Усі амінокислотні регулони, керовані за допомогою атенюації, характеризуються збагаченням ділянки іРНК, відповідного відстані до атенюатора кодонами тієї амінокислоти, яка служить негативним ефектором.

Регуляція шляхом атенюації заснована на тісному сполученні у прокариот транскрипції і трансляції які, як правило, протікають одночасно. В процесі трансляції іРНК рибосома, що синтезується екранує близько 10 нуклеотидів, може істотно впливати на конформацію трансльованої іРНК, а та, у свою чергу, на просування РНКП по матриці ДНК. При формуванні "критичної" конформації іРНК настає дисоціація РНКП від ДНК.

Триптофановий оперон у *Escherichia coli* регулюється одночасно двома негативними механізмами: репресією і атенюацією. Під час надлишку триптофану вони діють адитивно, практично повністю пригнічуючи транскрипцію. Але навіть за відсутності репресії атенюація знижує швидкість транскрипції на 90%.

Гістидиновий оперон регулюється тільки за допомогою атенюації. Аналогічна регуляція характерна для синтезу деяких аміноацил-тРНК-синтетаз і, можливо, ряду

екзоферментів. Атенюатор є присутнім, також, в геномі фага Х. В цьому випадку ефект атенюатора може бути нейтралізований спеціальним регуляторним білком *антитермінатором*. Отримано дані про те, що комплекс білку БАК із сАМР також може виконувати функцію антитермінатора, наприклад в опероні, і, таким чином, не лише стимулювати ініціацію транскрипції, але і запобігати передчасній термінації.

РНКП може слугувати негативним регулювальником свого власного біосинтезу, і при відносному надлишку в клітині її подальше утворення гальмується. Координування регулюється утворенням з переходженням її в латентний стан. У певних умовах латентна РНКП активується, викликаючи підвищення швидкості транскрипції. За деякими даними, така латентна РНКП може складати до 50% усієї РНКП клітини.

Регуляція транскрипції шляхом зміни конформації або структури ДНК

Одним із способів системної регуляції транскрипції служить зміна ступеня надспіралізації ДНК. У цьому процесі бере участь особливий клас ферментів – *топоізомерази*.

Релаксуючі топоізомерази знижують ступінь надспіралізації без витрати енергії і беруть участь в ініціації реплікації. По сучасній класифікації їх називають топоізомерази I.

Білки, що підвищують ступінь надспіралізації ДНК, залежать від АТР і беруть участь в реплікації ДНК, а також необхідні для здійснення рекомбінацій і кон'югативної передачі генетичного матеріалу. Їх називають топоізомерази II.

Непрямим доказом можливості зміни специфічності транскрипції під час зміни ступеня надспіралізації ДНК служить той факт, що у присутності інгібіторів ДНК-гірази змінюється спектр білків, що синтезуються, хоча самі по собі ці інгібітори не впливають на процеси транскрипції або трансляції. Наприклад, у *Escherichia coli* знижується синтез близько 20 білків, але одночасно стимулюється синтез інших, а утворення деяких білків залишається на колишньому рівні.

Перебудова транскрипції при зміні ступеня надспіралізації ДНК пояснюється принаймні двома причинами:

☞ По-перше, може змінюватися специфічність ідентифікації промоторів РНК-полімеразою;

☞ По-друге, зміна надспіралізації повинна призводити до зміни сили взаємодії з ДНК регуляторних білків.

Оскільки АТР є необхідним компонентом для роботи ДНК-гірази, повинен існувати зв'язок ступеня надспіралізації ДНК з енергетичним зарядом клітини, що відкриває ще одну можливість для регуляції транскрипції.

Принципово інший спосіб регуляції може бути здійснений шляхом зворотної зміни структури ДНК за рахунок видалення рухливих генетичних елементів, а потім вбудовування їх в інші місця геному. При цьому може мінятися характер регуляції транскрипції як генетичних локусів, що входять до складу перемішуваних ділянок, так і сусідніх з ними локусів. Можливо, також, вбудовування генетичного елементу в ту ж ділянку ДНК, звідки він був вищеплений, але в інвертованому виді. Така інверсія використовується іноді як спосіб регуляції розвитку фагів, а також утворення жгутикових антигенів у сальмонел.

Питання для самоперевірки знань:

1. У чому полягає подібність процесів транскрипції і реплікації?
2. У чому полягає відмінність процесів транскрипції і реплікації?
3. З яких стадій складається процес транскрипції?
4. Які функції виконують субодиниці РНК-полімерази бактерій?
5. Які форми РНК-полімераз виявлено в ядрах еукаріот і які функції вони виконують?
6. У чому полягає особливість РНК-полімерази архей?
7. Які фактори транскрипції існують?

8. З яких елементів складаються промотори?
9. У чому полягає особливість структури еукаріотичних промоторів?
10. Які існують фактори ініціації транскрипції еукаріот та яка їх роль?
11. Які процеси відбуваються при переході від ініціації транскрипції до елонгації?
12. Які функції виконують основні регуляторні фактори елонгації транскрипції еукаріот?
13. Яка різниця між ρ -залежною і ρ -незалежною термінацією?
14. Які існують способи індукованого руйнування нуклеосом?
15. Які існують типи вторинної структури РНК?
16. Вкажіть основні типи РНК.
17. Охарактеризуйте будову тРНК.
18. У чому полягає адаптерна функція молекул тРНК?
19. У чому полягає основна функція рРНК?
20. Що таке рибозими і в чому їх особливість?
21. Які основні функції виконує РНК?
22. Опишіть особливості процесингу тРНК.
23. У чому полягає особливість процесу кепування під час транскрипції про- і еукаріот?
24. Що таке поліаденілювання і для чого цей процес необхідний?
25. Вкажіть етапи сплайсингу.
26. У чому полягає особливість альтернативного сплайсингу?
27. Які ферментні системи здатні змінювати первинну структуру мРНК?
28. У чому полягає відмінність процесингу 5S-рРНК про- і еукаріот?
29. З яких реакцій складається процесинг попередників тРНК?
30. Які функції виконує екзосома?

Матеріали самостійного опрацювання:

1. Інтрони, екзони, транспозони.
2. Сплайсинг та його типи.
3. Транспорт сплайсингових і несплайсингових мРНК з ядра в цитоплазму.

4. ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ

Кінцевим результатом експресії генів (рис. 5), що кодують білки або нуклеїнові кислоти, має бути утворення цих повноцінних у функціональному відношенні макромолекул, що супроводжується формуванням певного фенотипу організму.

Відповідно до основного постулату молекулярної біології генетична інформація в процесі її реалізації передається однонапрямлено від нуклеїнових кислот до білків. При цьому реалізується наступна узагальнена схема: «ДНК $\leftrightarrow$ РНК $\rightarrow$ білок», яка підкреслює, що у ряді спеціальних випадків можлива передача генетичної інформації від РНК до ДНК з використанням механізму зворотної транскрипції. Досі не виявлена передача генетичної інформації від білків до нуклеїнових кислот. На першому етапі експресії генів відбувається переписування генетичної інформації, що знаходиться в генах, на матричний (інформаційний) РНК (мРНК), які є місцем проміжного зберігання цієї інформації при її реалізації. У деяких випадках вже самі РНК є кінцевим результатом експресії генів, і після ряду ферментативних модифікацій вони безпосередньо використовуються в клітинних процесах. Це відноситься, передусім, до рибосомних і транспортних РНК (рРНК і тРНК), що разом складають основну частину сумарної РНК клітини. До таких РНК належать і малі ядерні РНК (мяРНК), такі, що беруть участь у процесингу попередників мРНК еукаріот, РНК, що входять до складу ферментів, і природні антисмислові РНК.

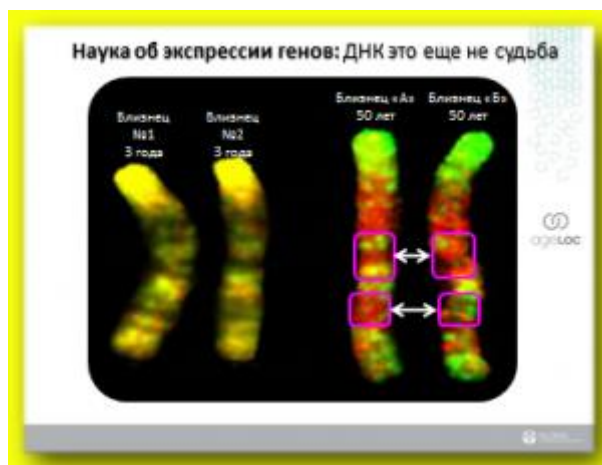


Рис. 5. Гени та їх роль у формуванні морф і функцій

Синтез РНК відбувається в результаті складної послідовності біохімічних реакцій, званою транскрипцією. Поява русифікованого терміну "мРНК" пов'язана з тим, що на другому етапі реалізації генетичної інформації, званому трансляцією, послідовність нуклеотидів мРНК згідно з генетичним кодом однозначно визначає послідовність амінокислотних залишків білків, що синтезуються, тобто є матрицею, відповідно до послідовностей нуклеотидів якої відбувається з'єднання амінокислотних залишків один з одним в поліпептидних ланцюгах білків під час їх біосинтезу.

Таким чином, експресію генів визначають два глобальні молекулярно-генетичні механізми: транскрипція генів і трансляція синтезованих мРНК рибосомами, яка завершується утворенням поліпептидних ланцюгів, що кодуються генами. Проте процес експресії генів не обмежується їх транскрипцією і трансляцією. Істотними моментами експресії генів є модифікації посттранскрипційних і посттрансляційних мРНК і білків, які включають процесинг їх попередників (видалення надмірних послідовностей і інші ковалентні модифікації послідовностей РНК і білків). Модифікації посттранскрипційних попередників мРНК забезпечують підготовку мРНК до ефективної трансляції рибосомами і визначають тривалість її існування в цитоплазмі. Посттрансляційні модифікації білків також потрібні для їх повноцінного функціонування.

Транскрипція

У процесі транскрипції генів відбувається біосинтез молекул РНК (рис. 6), комплементарних одному з ланцюгів матричної ДНК, супроводжуваний полімеризацією чотирьох рибонуклеозидтрифосфатів (АТР, ГТР, СТР і УТР) з утворенням 3'-5'-фосфодієфірних зв'язків і звільненням неорганічного пірофосфату. Основними ферментами, що здійснюють транскрипцію, є ДНК-залежні РНК-полімерази, що функціонують за участю численних чинників транскрипції – регуляторних білків, які здійснюють високоспецифічні білок-білкові і білково-нуклеїнові взаємодії. Взаємодії чинників транскрипції з регуляторними нуклеотидними послідовностями генів, один з одним і з молекулами РНК-полімерази необхідні для правильного пізнання комплексом транскрипції регуляторних послідовностей у складі генів і призводять до підвищення або пониження рівня транскрипції відповідних послідовностей як відповідь клітин на зовнішні або внутрішні регуляторні сигнали. Завдяки чинникам транскрипції і регуляторним послідовностям генів стає можливим специфічний синтез РНК і здійснюється регуляція експресії генів на рівні транскрипції.

ДНК-залежні РНК-полімерази

Відповідно до субдиничного складу РНК-полімерази підрозділяються на дві групи:



Рис. 6. Біосинтез молекул РНК та зміна експресії генів

☑ До першої групи відносяться ферменти, що складаються тільки з однієї субодиниці, серед них – РНК-полімерази мітохондрій і невеликих бактеріофагів, наприклад SP6 і T7. Ці РНК-полімерази транскрибують невелике число генів простих геномів, і для їх функціонування не потрібно складні регуляторні дії.

☑ Другу групу складають складно влаштовані РНК-полімерази бактерій і еукаріот, які є багатосубодиничними білковими комплексами, що транскрибують сотні і тисячі різних генів. Такі ферменти під час свого функціонування реагують на численні регуляторні сигнали, що поступають від регуляторних послідовностей нуклеотидів і білкових чинників. Не виключено, що загальноприйнятий розподіл РНК-полімераз за структурно-функціональною ознакою є спрощенням. Є дані, що вказують на те, що і просто влаштовані фагові РНК-полімерази функціонують *in vivo* в комплексі з іншими білками бактерійних клітин, які можуть істотно змінювати їх ферментативні властивості.

РНК-полімераза *E.coli*.

Найбільш вивченою з бактерійних ферментів є РНК-полімераза *E.coli*. Вона здійснює транскрипцію усіх бактерійних генів. Фермент складається з п'яти субодиниць:

- β' - (молекулярна маса 165 кДа),
- β - (155 кДа),
- двох α - (35 кДа кожна) і
- σ - (частіше всього 70 кДа ($\sigma 70$)).

Комплекс з чотирьох субодиниць $\beta\beta'\alpha\alpha$, що часто означають літерою E (enzyme), утворює так званий мінімальний (кор-) фермент *E.coli*, який здатний здійснювати усі основні етапи транскрипції, за винятком правильної ініціації (див. нижче). Для ініціації транскрипції необхідна присутність визначеною регуляторною σ -субодиниці, що слугує для розпізнавання РНК-полімеразою промоторів бактерійних генів, що визначає специфічність взаємодії РНК-полімерази з промоторами і, можливо, наступну ізомеризацію комплексу РНК-полімераза-промотор, необхідну для початку синтезу РНК.

Повний фермент, включаючи $\sigma 70$ -субодиницю, часто називають холоферментом і означають $E\sigma 70$. РНК-полімераза $E\sigma 70$ здатна транскрибувати більшість (але не усі) генів *E.coli*. Зокрема, для транскрипції генів теплового шоку, оперонів *gln* або *nit* потрібно включення до складу повного ферменту іншої регуляторної субодиниці – $\sigma 54$ (молекулярна маса 54 кДа) замість $\sigma 70$ з утворенням ферменту $E\sigma 54$. Нині описано до десяти різних σ -факторів, об'єднання яких з мінімальним ферментом дає можливість холоферментам, що утворюється, дізнаватися різні промотори. Усі чотири субодиниці кор-ферменту забезпечують контакт РНК-полімерази з промоторами. При цьому β' -

субодиниця бере участь у зв'язуванні ферменту з ДНК, β -субодиниця утворює каталітичний активний центр, проте α -субодиниці забезпечують правильну взаємодію ферменту з промоторами. Твердження, що знаходяться в двох останніх пропозиціях, треба сприймати з відомою долею скепсису. Дані такого роду зазвичай отримують з використанням ферментів, у яких під дією мутацій змінені конкретні субодиниці, і якщо, наприклад, мутація в гені α -субодиниці порушує зв'язування РНК-полімерази з ДНК, робляться відповідні висновки. Така методологія (втім, одна з найплідніших серед існуючих), на жаль, нагадує відомий спосіб локалізації органу слуху у тарганів шляхом обриву ніг – оскільки таргани без ніг не реагують на звуки втечею, робиться висновок, що вони сприймають звукові сигнали ногами. Будь-яка субодиниця мутанта у складі олігомерного ферменту може змінювати його загальну конформацію і надавати ферменту найнесподіваніші властивості. Прямішим методом визначення місць контакту макромолекул при білок-білкових і білково-нуклеїнових взаємодіях являється метод поперечних зшивань з використанням біфункціональних хімічних агентів. Такі хімічні сполуки утворюють ковалентні зв'язки (поперечні зшивання) між близько розташованими реакційноздатними групами. Проте сам факт наявності контакту між макромолекулами ще не можна однозначно інтерпретувати на користь його функціональної значущості. На відміну від еубактерій, які, як вже згадувалося вище, при транскрипції різних наборів генів використовують різні σ -фактори, еукаріоти для досягнення тих же цілей удаються до іншої стратегії – спеціалізації молекул РНК-полімераз.

В ядрах еукаріот виявлено щонайменше три спеціалізовані форми РНК-полімераз. РНК-полімераза I здійснює транскрипцію генів рибосомних РНК (рРНК), синтезуючи в ядерцях попередники 18S і 28S рРНК; РНК-полімераза II бере участь в утворенні мРНК, а РНК-полімераза III транскрибує гени транспортних (тРНК), 5S і інших низькомолекулярних РНК. Кожен з цих ферментів є багатосубодиничним білковим комплексом, що складається з двох великих (120-220 кДа) і 5-13 малих (10-100 кДа) субодиниць. Декілька малих субодиниць є загальними для різних форм РНК-полімераз. Великі ж субодиниці гомологічні своїми амінокислотними послідовностями ділянкам β - і β' -субодиниць еубактерій, що, можливо, відбиває фундаментальну схожість в структурі і функціонуванні активних центрів цих ферментів. Більше того, амінокислотні послідовності α -субодиниць РНК-полімераз бактерій, необхідні для їх взаємодії з великими субодиницями мінімального ферменту, мають гомологи в третій за розміром великій субодиниці РНК-полімерази II, а також в субодиниці, загальній у РНК-полімераз I і III. Декілька невеликих субодиниць еукаріотичних РНК-полімераз, аналогів, що не мають, у бактерійних ферментів, є загальними для усіх РНК-полімераз, що може вказувати на їх однакові функції в транскрипції, здійснюваній відповідними ферментами, і на їх можливу участь в координації функціонування різних РНК-полімераз.

РНК-полімераза I еукаріот (Pol I).

Як і більшість інших високомолекулярних поліпептидів, великі субодиниці РНК-полімераз містять добре помітні структурні і функціональні домени: дискретні ділянки поліпептидних ланцюгів, що несуть конкретне функціональне навантаження (рис. 7). Клонування генів відповідних субодиниць і визначення їх первинної структури дозволили виявити еволюційно консервативні ділянки поліпептидних ланцюгів і провести мутаційний аналіз функціональної значущості їх окремих доменів.

З цією метою до Pol I мишей, які є функціональними аналогами β' - і β -субодиниць РНК-полімерази *E.coli* РНК-полімераза I еукаріот є великим ферментом, побудованим щонайменше з 11 субодиниць. Мінімальний фермент Pol I містить два, що обговорювалися вище, великих поліпептиди з молекулярною масою 194 і 116 кДа, які асоційовані з декількома малими субодиницями (від трьох до 14 залежно від методу

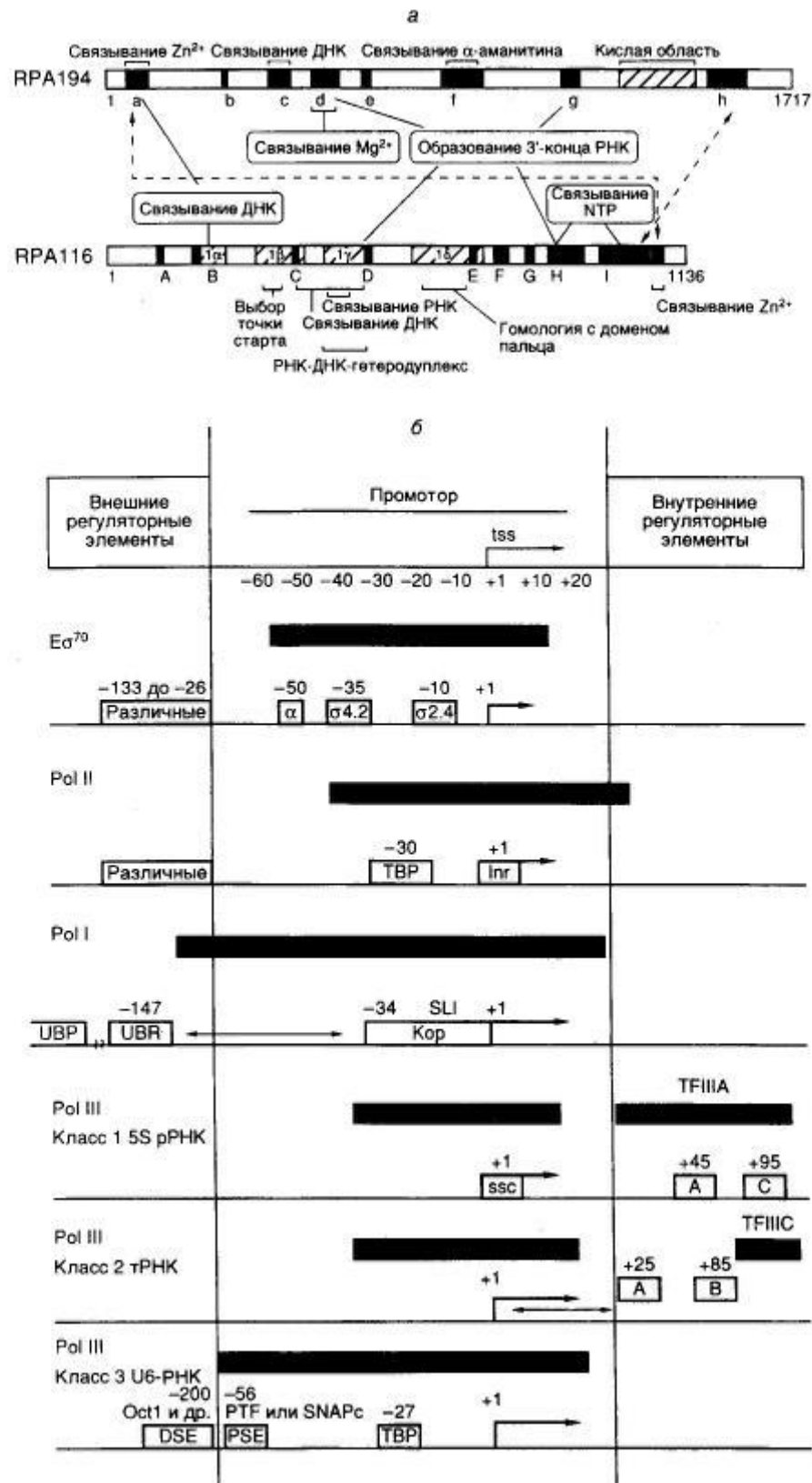


Рис. 7. Структурні та функціональні домени великих субодиниць еукаріотичної РНК-полімерази I (а) й особливості структури промоторів еубактерій та еукаріот (б)

а – поліпептидні ланцюги двох великих субодиниць зображені у вигляді горизонтальних прямокутників, в яких чорним кольором і латинськими літерами відмічено ділянки, консервативні у більшості відомих РНК-полімераз. Кисла область і ділянки Іα- Іδ характерні для РНК-полімераз I. Позначені зони поліпептидних ланцюгів, що формують активний центр ферменту і необхідні для виконання відповідних функцій (наприклад зв'язування Mg^{2+}). Пунктирні стрілки вказують на ділянки субодиниць, що контактують один з одним. Незаштрихованими прямокутниками позначені відомі структурні елементи промоторів, необхідні

для ініціації або активації транскрипції. Усередині прямокутників приведені назви чинників транскрипції, промоторів, що взаємодіють з відповідними елементами, а також назви сайтів або білків, що взаємодіють з ними, що знаходяться над сайтами. Стрілки $\leftrightarrow$ означають фіксовані відстані між елементами промоторів, а $\rightarrow$ - 5'-кінцеві частини транскриптів елонгації. Чорними прямокутниками позначені ділянки промоторів, що захищаються від дії ДНКаз I або інших агентів *Eco*70, а також еукаріотичними комплексами транскрипції, що забезпечують базальний рівень транскрипції. *tss* - точка ініціації транскрипції.

очищення), молекулярні маси яких лежать у межах 15-60 кДа. Третя за величиною субодиниця Pol I мишей з молекулярною масою 53 кДа, названа PAF53 (polymerase associated factor 53), відіграє важливу роль у пізнаванні Pol I своїх промоторів і, мабуть, є структурним і функціональним аналогом білка RPA49 дріжджів. Pol I дріжджів за відсутності субодиниць RPA49 і RPA35.5 (так звана Pol I*) ефективно транскрибує при низьких концентраціях солей штучну матрицю poly[d(A-T)], але не нативну дволанцюжкову ДНК.

Вважають, що ці субодиниці необхідні для ефективного утворення комплексів ініціації. Використовуючи антитіла до окремих субодиниць Pol I і наступну імунопреципітацію, встановили, що в клітині, принаймні, частина Pol I знаходиться у складі великих комплексів, з якими асоційовані чинники транскрипції. П'ять компонентів такого холофермента Pol I вивчені нині найдетальніше. Мишачий чинник TIF-IB (Pol I – specific transcription initiation factor B), відомий також, як чинник D, забезпечує Pol I селективність відносно промоторів генів рРНК (рДНК). Аналогічний білок у людини названий hSL1, у щурів – rSL1 і у *X.laevis* – Rib 1. Взаємодія чинника TIF-IB/SL1 з промотором рДНК забезпечує зв'язок холофермента Pol I з промотором і зборку комплексу передініціації. Чинник TIF-IB/SL1 складається з чотирьох субодиниць, одна з яких є основним чинником транскрипції TBP, необхідним для функціонування РНК-полімераза усіх трьох класів. Три інші субодиниці з молекулярними масами 110, 63 і 48 кДа є різні TBP-асоційовані чинники TAFI, індивідуально і що специфічно взаємодіють з TBP, а також один з одним, утворюючи міцний комплекс. У складі комплексу TAFI48 забезпечує контакт TIF-IB/SL1 з чинником UBF (див. нижче), а TAFI63 і TAFI110 беруть участь в розпізнаванні промотора. Чинники TAFI не виявляють гомології з відповідними чинниками TAFII, специфічними відносно Pol II. Більше того, перший з тих, що зв'язалися з TBP чинників, TAFI, запобігає взаємодії з TBP чинників TAFII (і навпаки), що робить неможливим утворення непродуктивних химерних комплексів. Одночасно взаємодія TAFI48 з TBP змінює ДНК-зв'язуючі властивості останньої, після чого той перестає розпізнавати ТАТА-бокс – характерний структурний елемент Pol II-промоторів, і, отже, втрачає здатність забезпечувати ініціацію транскрипції Pol II. Інший білок, що входить до складу холоферменту Pol I, UBF (upstream binding factor) високо консервативний у різних видів тварин. UBF є членом сімейства чинників транскрипції, що містять ДНК-зв'язуючий-НМГ – домен (high mobility group domain) – основну послідовність з 80 амінокислот. За допомогою ЯМР-спектроскопії встановлено, що поліпептидний ланцюг НМГ-домени організований в три α -спіралі, розташовані у вигляді літери L, що формують три ДНК-зв'язуючі поверхні із зовнішнього боку L. У клітині UBF є присутній в двох формах – UBF1 і UBF2 з молекулярними масами 97 і 95 кДа, які утворюються в результаті альтернативного сплайсингу. UBF1 містить п'ять НМГ-доменив, фланкованих N-кінцевим димеризуючим мотивом і короткою кислою C-кінцевою послідовністю. Цікаво, що сусідні НМГ-домени одного і того ж UBF мають набагато меншу гомологію, ніж відповідні домени UBF різних видів (наприклад шпорцевої жаби і людини). Вважають, що кожен НМГ-домен забезпечує особливу, еволюційно консервативну функцію молекули UBF. Такими функціями можуть бути розпізнавання специфічних послідовностей ДНК, створення молекулярних інтерфейсів для білок-білкових взаємодій між Pol I і TIF-IB/SL1, а також різними репресорами і активаторами транскрипції рДНК. C-кінцева послідовність UBF містить декілька залишків Ser, що фосфорилують, і необхідна для активації транскрипції рДНК.

Однією з основних характеристик білків, що містять HMG-бокс, є їх здатність згинати молекулу ДНК і міцно зв'язуватися з її хрестоподібними структурами. Усі ці властивості має UBF, і вони детально досліджені. Білок CPBF (core promoter binding factor), виділений з асцитних клітин аденокарциноми молочних залоз щурів, специфічно взаємодіє з кóровою ділянкою промотора рДНК. CPBF, що міцно взаємодіє з Pol I, складається з двох субодиниць USF1 і USF2 з молекулярними масами 44 і 39 кДа відповідно. Гомодімери USF1 і USF2 є сильними інгібіторами транскрипції Pol I, проте як гетеродімери USF1/USF2 стимулюють транскрипцію *in vitro*. Вважають, що CPBF бере участь в регуляції транскрипції Pol I *in vivo*. TIF-1A – інший компонент холоферменту Pol I, також бере участь в регуляції синтезу рРНК цим ферментом. У його відсутність комплекс ініціації не може утворювати першого фосфодієфірного зв'язку, а отже, і ініціювати синтез РНК. TIF-1A звільняється після ініціації транскрипції і може знову входити до складу комплексів передініціації, що збираються. По цих і ряду інших критеріїв TIF-1A розглядають як функціональний аналог бактерійного чинника $\sigma 70$. TIF-1A є мономерним глобулярним білком з молекулярною масою 70-80 кДа. Активність цього чинника або його внутрішньоклітинний зміст зменшується при пригніченні синтезу білку, виснаженні сироватки або диференціюванні клітин і зростає у відповідь на мітогенні стимули, що корелює з пригніченням або стимуляцією синтезу рРНК. Хроматографічно і за допомогою імунопреципітації було встановлено, що життєво важливий чинник TIF-1C в розчині асоційований з Pol I. Цей чинник потрібний як для зборки комплексів ініціації, так і утворення першого фосфодієфірного зв'язку. Його присутність запобігає неспецифічній ініціації транскрипції і її передчасній термінації, що проявляється в утворенні гомогенних транскриптів правильної довжини. За цими критеріями чинник TIF-1C розглядають як функціональний аналог TFIIIF (RAP30/74) Pol II.

РНК-полімераза II (Pol II).

Pol II людини містить більше 10 субодиниць, які важко назвати субодиницями в звичайному сенсі через слабку асоціацію один з одним. Деякі з них належать до основних чинників транскрипції (GTFs – general transcription factors). Взагалі ж поняття холофермента Pol II еукаріот не є сталим. Лише нещодавно в лабораторіях Р.Янга і Р.Корнберга було встановлено, що деякі основні чинники транскрипції вже знаходяться в комплексі з РНК-полімеразою до її включення в комплекс передініціації. На думку Янга, яке стає усе більш обґрунтованим, до складу холоферменту Pol II дріжджів входять щонайменше 14 білків і білкових комплексів.

Серед чинників, які відрізняються від основних чинників транскрипції, але грають особливу роль в транскрипції у дріжджів, слід зазначити так звані SRB-білки (suppressor of RNA polymerase B). Останні є невід'ємною частиною холоферменту Pol II і відносяться до коактиваторів транскрипції. SRB-білки ідентифіковані за допомогою генетичних методів при відборі мутацій у дріжджів, що супресировали умовно-летальні мутації в CTD-домені Pol II (С-кінцевому домені великої субодиниці РНК-полімерази II). Такий генетичний скринінг привів до відкриття дев'яти генів SRB. За допомогою тих же мутантів встановлено, що SRB-білки необхідні для здійснення ініціації транскрипції РНК-полімеразою *in vivo*. Незабаром було підтверджено фізичну і функціональну взаємодію між SRB-білками і CTD-доменом Pol II, які, як виявилось, утворюють з РНК-полімеразою міцний комплекс. Транскрипція за участю холоферменту Pol II стимулюється активатором GAL4-VP16, що не відбувається у присутності тільки одних очищених основних чинників транскрипції і Pol II. На цій підставі був зроблений висновок, що істинний холофермент Pol II містить додаткові компоненти, які дозволяють йому реагувати на дію білків-активаторів транскрипції. Більше того, показано, що антитіла до CTD-домену викликають дисоціацію багатосубодиничного комплексу Pol II, що містить, SRB-білки, TFIIIF, GAL11/SPT13, SUG1 і ще 10 білків, частина з яких відноситься до класу білків-коактиваторів транскрипції. Цей комплекс білків дістав назву *медіауторованого комплексу*. Він виявився необхідним для здійснення функціонального зв'язку між Pol II і

білками-активаторами транскрипції. Субодинична будова РНК-полімераз різного походження, ймовірно, відбиває їх функціональну роль в акті транскрипції. Дійсно, усі РНК-полімерази простої будови транскрибують вузькообмежане коло генів або невеликі частини генома, що має місце, наприклад під час синтезу РНК-затравок для фрагментів Оказаки в процесі реплікації ДНК у бактерій. Промотори, впізнанні РНК-полімеразами простої будови, не відрізняються різноманітністю і мають просту структуру. Показово, що при складній будові генома парних Т-фагів, у процесі розвитку яких відбувається багатократне перемикання транскрипції з одних груп генів на інші, використовується складна РНК-полімераза бактерії-господаря, а не індукується простий фермент, як це має місце у бактеріофага Т7. РНК-полімерази бактерій і еукаріот повинні, по-перше, розпізнавати різні промотори, по-друге, реагувати на різні білки-регулювальники і, по-третє, змінювати специфічність пізнання послідовностей нуклеотидів матричної ДНК під дією різноманітних білкових ефекторів. Звідси витікає, що у живих організмів, починаючи з бактерій, виникає потреба в РНК-полімеразах складної структури, здатних здійснювати велику програму реалізації генетичної інформації. Ймовірно, тому спостерігається ієрархія в мірі складності будови вказаних ферментів, яка досягає верхньої межі у випадку РНК-полімераз еукаріот.

Проте, елементарні акти основних етапів транскрипції забезпечуються молекулами РНК-полімераз простої будови, такими як у фагів Т7, мітохондрій і інших об'єктів. Ці ферменти, на думку Р.Бі.Хесина, можна розглядати як еволюційних попередників складних олігомерних РНК-полімераз, здатних самотійно здійснювати усі основні функції в процесі транскрипції. Дійсно, в олігомерних РНК-полімеразах, як і у більшості складноутворених ферментів, мабуть, тільки одна субодиниця (β - у РНК-полімераз еубактерій) є власне каталітичною, а інші, можливо, виконують функції регуляторних.

Регуляція експресії генів на рівні транскрипції у прокаріот

Регуляція транскрипції в клітинах здійснюється на рівні індивідуальних генів, їх блоків і навіть цілих хромосом. Можливість управління багатьма генами, як правило, забезпечується наявністю у них загальних регуляторних послідовностей нуклеотидів, з якими взаємодіють однотипні чинники транскрипції. У відповідь на дію специфічних ефекторів такі чинники набувають здатність з високою точністю зв'язуватися з регуляторними послідовностями генів. Наслідком цього є послаблення або посилення транскрипції (репресія або активація) відповідних генів. Три основні етапи транскрипції – ініціація, елонгація і термінація, розглянуті нами вище, використовуються бактерійними клітинами для регуляції синтезу РНК. Те ж, мабуть, характерно і для інших живих організмів. Нижче наведені приклади регуляторних дій на транскрипцію.

Регуляція на рівні ініціації транскрипції

Активність багатьох генів прокаріот регулюється за допомогою білкових чинників, що взаємодіють з регуляторними ділянками промоторів генів. При цьому відбуваються як активація транскрипції генів, так і пригнічення прочитування генетичної інформації РНК-полімеразами. У першому випадку регуляторні білкові чинники називають *активаторами*, що здійснюють позитивну регуляцію транскрипції, а в іншому – *репресорами*. Регуляцію, пов'язану з пригніченням транскрипції, називають *негативною*. Механізми, за допомогою яких активатори стимулюють ініціацію транскрипції, можуть бути розглянуті з двох точок зору – кінетичної і структурної. Оскільки активація промоторів шляхом утворення відкритих комплексів є лімітуючою стадією на шляху активації транскрипції в цілому, дія різних активаторів може бути охарактеризована за зміною (збільшенням) значень кінетичних параметрів реакцій, що відбуваються на різних етапах активації. Так, при дії активуючого комплексу Crp-cAMP на *lac*-промотор відбувається десятиразове збільшення рівноважної константи асоціації КВ РНК-полімерази з промотором із утворенням закритого комплексу. Активація промотора PRM

фагу λ , опосередкована cI-білком (див. нижче), характеризується п'яти-десятикратним збільшенням константи швидкості k_f переходу закритих комплексів у відкриті. Активує дія білку λ – cII на промотор PRE супроводжується зміною обох вищезгаданих кінетичних параметрів. Активація транскрипції може бути, також, опосередкована збільшенням швидкості звільнення промотора РНК-полімеразою після ініціації синтезу РНК. Багато активаторів транскрипції, у тому числі і Cpr-cAMP, згинає молекулу ДНК після взаємодії з нею, причому центр такого вигину знаходиться в сайті зв'язування активатора. Проте з використанням білків-мутантів було встановлено, що вигинання ДНК і зв'язування активаторів з ДНК – як таке ще не забезпечують активацію транскрипції. В більшості випадків абсолютно необхідною умовою активації є наявність контакту між специфічними ділянками поверхонь молекул активатора і РНК-полімерази, часто з її α -субодиницями. Важливим наслідком утворення контактів між активаторами і холоферментом РНК-полімерази є часто спостережуваний синергізм в зв'язуванні обох білків із відповідними промоторами. При цьому мутації в сайтах зв'язування активаторів або промоторі як такому, можуть запобігати активації транскрипції шляхом зміни конформації молекули пов'язаного активатора або контактної ділянки на РНК-полімеразі. Послідовності нуклеотидів промоторних ділянок генів, з якими взаємодіють молекули репресора, дістали назву *операторів*. У багатьох випадках репресор зв'язується з оператором тільки за присутності низькомолекулярного ліганду, що специфічно взаємодіє з репресором. Такі низькомолекулярні ефектори отримали назву *корепресорів*. Останні часто необхідні і для функціонування білків-активаторів транскрипції. Простий механізм репресії полягає в стеричному блокуванні зв'язування РНК-полімерази з промотором. Це відбувається у тому випадку, якщо послідовності нуклеотидів місць посадки РНК-полімерази на промотор і репресора на оператор, перекриваються. Деякі бактерійні білки-репресори можуть чинити свою негативну дію на етапи ініціації, що відбуваються після зв'язування РНК-полімерази з промотором. Наприклад, молекули репресора *gal* – оперону *E.coli*, що зв'язалися з операторами OE і OI, центри послідовностей яких розташовані відповідно на відстанях -60,5 і +53,5 по відношенню до точки ініціації транскрипції, викликають утворення петлі ділянки ДНК, ув'язненої між ними, але не перешкоджають взаємодії РНК-полімерази з промотором. Вони чинять свою дію на наступні етапи ініціації, передуючі утворенню першого фосфодієфірного зв'язку. У тому випадку, якщо лише одна молекула репресора зв'язується із зовнішнім оператором OE, він частково інгібує транскрипцію шляхом взаємодії з α -субодиницею РНК-полімерази. Це супроводжується пониженням рівня, але не повним припиненням синтезу РНК *gal*-оперона, тобто тоншою зміною рівня експресії відповідних генів.

Поширеним механізмом активації транскрипції за допомогою білків-активаторів є полегшення її ініціації РНК-полімеразою після утворення контакту між ферментом і білком-активатором, пов'язаними з регуляторною частиною промотора, що супроводжується конформаційними змінами РНК-полімерази. У бактерій є білки-регулювальники, що мають активність як репресора, так і активатора транскрипції. Такі "амфотерні" властивості має, зокрема, репресор cI фага λ . Білок-активатор катаболічних оперонів (Cpr-білок) активує транскрипцію бактерійних генів, продукти яких беруть участь в розщеплюванні (катаболізмі) різних органічних сполук (переважно цукрів), використовуваних зростаючою бактерійною клітиною як джерело вуглецю. Свої властивості активатора Cpr-білок набуває лише в комплексі з циклічним АМР (сАМР). Внутрішньоклітинна концентрація сАМР підвищується у бактерій, зростаючих на бідних поживних середовищах, і знижується в умовах надлишку легко засвоюваних джерел вуглецю, наприклад глюкози. Тому система Cpr-cAMP забезпечує включення експресії катаболічних оперонів лише на бідних поживних середовищах. Cpr-білок може виступати і в ролі репресора транскрипції генів галактозного оперону *E.coli*. Якщо усі гени катаболічних оперонів активуються Cpr-білком у присутності сАМР, то негативна регуляція їх транскрипції відбувається індивідуально. Добре відомими прикладами такого

роду є регуляції транскрипції *lac*-оперона *E.coli* під дією *Lac*-репресора, а також галактозного і арабінозного оперонів специфічними білками-репресорами цих оперонів. Низькомолекулярні ефектори можуть змінювати активність РНК-полімерази не лише опосередковано через білки-регулювальники, але і безпосередньо при взаємодії з ферментом. За допомогою гуанозінтетрафосфату (ppGpp) в клітинах *E.coli* здійснюється координація експресії генів рибосомних РНК (рРНК) і білків. Цей незвичайний нуклеотид (відомий також під назвою "Магічної плями") синтезується бактерійними клітинами в умовах внутрішньоклітинної нестачі амінокислот, що призводить до значного зниження інтенсивності транскрипції генів рРНК і білків і одночасної стимуляції синтезу РНК оперонів, що контролюють біосинтез амінокислот. У присутності ppGpp очищена РНК-полімераза припиняє синтез рРНК з одного з двох промоторів цих оперонів, що призводить до послаблення, але не повного припинення їх транскрипції. Відомі мутації, локалізовані в гені β -субодиниці РНК-полімерази *E.coli*, впливи ppGpp, що призводять до припинення, на синтез РНК, що підтверджує наявність безпосереднього контакту між нуклеотидом і ферментом у процесі транскрипції. Деякі регуляторні елементи бактерій, транскрипції, що беруть участь в активації, так само як і енхансери еукаріот, можуть розташовуватися на великій відстані від промоторів, на які вони чинять свою дію. В цьому випадку контакт активатора з РНК-полімеразою забезпечується завдяки випетлюванню ділянки ДНК, розташованої між цими регуляторними елементами, що призводить до просторового зближення двох білків. Прямий доказ утворення таких петель на ДНК *E.coli* було, зокрема отримано за допомогою електронної мікроскопії для білків NtrC і NifA, діючих відповідно на промотори генів *glnA* і *nifH*. Іншим шляхом досягнення білком-активатором молекули РНК-полімерази на віддаленому промоторі (наприклад промоторі пізніх генів бактеріофага Т4) є його переміщення уздовж відрізка ДНК, що розділяє ці два регуляторні елементи. Процес такого переміщення може бути ініційований послідовностями нуклеотидів, розташованими вище або нижче за промотор на відстані декількох сотень пар основ. Одним з питань, що давно обговорюються, є необхідність зміни структури ДНК в околицях промоторів під дією білків-активаторів для активації транскрипції. У ряді випадків такі докази було отримано. Так, в *mer*-локусі *E.coli*, що забезпечує стійкість бактерійних клітин до іонів ртуті, зв'язування *Mer*-білка з регуляторною ділянкою промотора (*merT*) за присутності ртуті супроводжується розкручуванням спіралі ДНК у районі промотора на 50°. Це призводить до утворення правильної відстані між сайтами зв'язування активатора і промотором, оскільки перший розташований незвично – між нуклеотидами в положеннях -35 і -10 промотора. Без такої зміни структури ДНК активатор, що зв'язався з ним, не може утворити правильного контакту з РНК-полімеразою.

Трансляція в еукаріот

Бактерії мають єдину універсальну систему трансляції, основні механізми функціонування якої були коротко розглянуті вище. На відміну від цього, клітини тварин окрім основної системи трансляції, локалізованої в цитоплазмі, мають додаткову систему трансляції мітохондрій, яка за низкою властивостей наближається до бактерії. Клітини рослин мають ще одну додаткову систему біосинтезу білку, що функціонує в хлоропластах. Більшість даних про механізми біосинтезу білку в еукаріот було отримано з використанням безклітинних білоксинтезуючих систем. Останнім часом важливі результати про механізми трансляції в еукаріот були отримані з використанням стабільно трансформованих клітин тварин і рослин, що вирощуються в культурі. Під час цих досліджень встановлено, що у рослин і тварин в основному функціонують одні і ті ж механізми трансляції. Ініціація біосинтезу білку еукаріотичними рибосомами, як буде видно з подальшого викладу, ініціація трансляції еукаріотичних мРНК може здійснюватися, принаймні, трьома способами. Відповідно до першого найбільш поширеного механізму (модель сканування) рибосоми після взаємодії з 5'-кінцевою

послідовністю мРНК здійснюють пошук AUG-кодона, що ініціює, переміщаючись уздовж 5'UTR. При реалізації іншого, другого механізму рибосоми ініціюють біосинтез білку на внутрішніх AUG-кодонах, віддалених від 5'-кінцевої кеп-групи. І, нарешті, у третьому випадку, після звільнення поліпептиду з транслуючого комплексу рибосоми, не відділяючись від мРНК, здатні реініціювати біосинтез білку на наступному кодоні, що ініціює.

Чинники ініціації трансляції

Більшість молекулярних механізмів, що здійснюють регуляцію експресії генів на рівні трансляції, реалізується на стадії ініціації біосинтезу білку. Мабуть, цей факт знаходить своє віддзеркалення у великій складності апарату ініціації трансляції. Окрім субодиниць еукаріотичних рибосом і білків, що зазвичай асоціюються з 5'- і 3'-кінцевими послідовностями мРНК, в ініціації беруть участь щонайменше 11 білкових чинників, побудованих більш ніж з 25 поліпептидів. Елонгація поліпептидних ланцюгів в ході еукаріотичної трансляції традиційно користувалася меншою увагою дослідників порівняно з ініціацією, оскільки вважалося, що її механізми в основних рисах ідентичні таким у бактерій. Подальші дослідження показали, що ця точка зору в основному відповідає дійсності, хоча еукаріотична система трансляції має складніший набір чинників елонгації.

Чинники і механізми елонгації

Еукаріотичні клітини містять у великій кількості чинник елонгації eEF1A, який є функціональним гомологом бактерійного чинника EF1A(EF-Tu). Так само як і у бактерій, цей чинник утворює потрійний комплекс з GTP і аміноацил-тРНК, забезпечуючи входження останньої в А-ділянку елонгуючої рибосоми. Два інших еукаріотичних чинників eEF1B і eEF2 різко відрізняються від бактерійних функціональних аналогів EF1B(EF-Ts) і EF2(EF-G) за амінокислотними послідовностями. Гетеротримерний чинник eEF1B, як і його бактерійний аналог, каталізує обмін GDP на GTP в комплексі eEF1A-GDP. Чинник eEF2, за аналогією з бактерійними системами, забезпечує транслокацію пептидил-тРНК в Р-ділянку рибосом і перенесення деацільованої тРНК в Е-ділянку. У вищих організмів цей чинник слугує мішенню регуляторних дій через фосфорилування. Чудовою властивістю чинників eEF1A і eEF2 є здатність зв'язуватися з компонентами цитоскелету еукаріотичних клітин. Вважають, що це їх властивість може забезпечувати один з механізмів внутрішньоклітинного транспорту мРНК, що направляють її в полісоми. Зростаючий поліпептид виводиться в цитоплазму через канал, початок якого розташований на поверхні рибосоми, де він взаємодіє з білками, що розпізнають сигнальну послідовність, або з іншими цитоплазматичними чинниками, які забезпечують його спрямований транспорт усередині еукаріотичної клітини. У бактерій зростаючий поліпептидний ланцюг може викликати зменшення швидкості елонгації, а природа передостанньої амінокислоти чинить сильний вплив на термінацію трансляції. Припускають, що такого роду ефекти є наслідком взаємодії між пептидом, що будується, і чинниками трансляції, рРНК або безпосередньо каналом, через який він переноситься до поверхні рибосоми. Подібні механізми, мабуть, функціонують і в еукаріот. У дріжджів, як і в *E.coli*, швидкість елонгації трансляції знижується у присутності кодонів, що рідко зустрічаються, в мРНК. Наявність певного числа таких кодонів поблизу сайту ініціації трансляції значно знижує швидкість прочитування відповідних ОРС. На швидкість декодування мРНК рибосомами роблять вплив і характер фолдингу поліпептидних ланцюгів, що будуються, а також сигнальні послідовності амінокислот, що визначають напрям їх посттрансляційного транспорту усередині еукаріотичних клітин.

Термінація трансляції

В еукаріотичних білоксинтезуючих системах термінація трансляції, як і у бактерій, контролюється специфічними *релізінг-факторами*. Проте в еукаріот ці чинники менш різноманітні. Зокрема, у них відсутній функціональний аналог бактерійного чинника RRF/RF4.

Чинники термінації

За сучасними уявленнями, елонгуюча еукаріотична рибосома розпізнає стоп-кодони, що знаходяться в одній рамці з основними OPC, після взаємодії з гетеродімерним комплексом релізінг-факторів (RF), до складу якого входять чинники eRF1 і eRF3. Чинник eRF1 потрібний для розпізнавання усіх трьох кодонів термінації (UAA, UAG і UGA) і звільнення синтезованого поліпептиду. Чинник eRF3 є GTPазой, гомологічною до eEF1A, яка, гідролізуючи GTP, стимулює термінацію незалежно від послідовності нуклеотидів у кодонах, що термінують.

Отже, визначення функцій продуктів нових генів на основі їх первинної структури ускладнюється тим, що багато білків і нуклеїнових кислот проявляють свою активність і функціонують тільки у складі великих надмолекулярних комплексів, розміри яких часто наближаються до розмірів рибосом. При цьому багато білків самих по собі не мають ферментативної активності, а виконують допоміжні функції, наприклад, молекул-адаптерів, що забезпечують збирання комплексів і що створюють молекулярні інтерфейси для їх взаємодії з регуляторними і каталітичними субодинамиціями. Наявність таких комплексів, як це було встановлено в останнє десятиліття, особливо характерно для клітин еукаріотичних організмів. Так, дослідження молекулярних механізмів транскрипції в еукаріот призвело до розвитку уявлення про *транскриптосому* – гігантський білковий комплекс, в який окрім холоферменту РНК-полімерази з її численними субодинамиціями входять чинники транскрипції, білки-адаптери, білкові компоненти системи репарації і тому подібне. При цьому розмір транскриптосом наближається до такого цілих рибосом. У гігантські надмолекулярні комплекси організовані і молекулярні машини системи синтезу ДНК (*реплісоми*), процесингу і редагування РНК (*сплайсоми* і *едітосом*), молекулярні компоненти системи протеолітичної деградації білків (*протеасом*). Створюється враження, що організація генетичних систем, що функціонують на основних етапах реалізації генетичної інформації, в гігантські просторово впорядковані комплекси, є загальнобіологічним принципом.

Диференціальна експресія генних комплексів

Під час диференціювання і розвитку клітини піддаються драматичним морфологічним і функціональним змінам без яких-небудь змін у послідовностях ДНК. Зміни патернів генної експресії, що лежать в основі, встановлюються і підтримуються за допомогою епігенетичних процесів. Первинна механістична інформація була отримана шляхом спостережень за станами генної активності і репресії, ДНК, що корелює з рівнем метилювання, в їх промоторних регіонах. метилювання ДНК є постреплікативною модифікацією, яка відбувається винятковою в С5 позиції залишків цитозину (5mC) і переважно в контексті CpG дінуклеотидів в клітинах хребетних. Три головних ДНК метилтрансферази (Dnmt1, 3a і 3b) встановлюють специфічні патерни метилювання ДНК під час диференціювання і підтримують їх протягом багатьох клітинних ділень. метилювання CpG розпізнається з допомогою, принаймні, трьох родин білків, які у свою чергу рекрутують гістон, що модифікують і хроматин, ремоделіруючі ензими і тим самим транслують метилювання ДНК до репресивних хроматинових структур. Таким чином, численні модифікації гістонів виявляються пов'язаними різними способами з метильованою ДНК.

Диференціальна експресія генів у процесі розвитку

Один з головних і загальновизнаних догматів сучасної ембріології полягає в тому, що, за винятком декількох особливих випадків, усі клітини цього організму, незалежно від того якими вони стають в диференційованому стані, містять в геномі одну і ту ж ДНК. Проте експресія генів у клітинах одного типу явно відрізняється від їх експресії в клітинах іншого типу. Диференційовані клітини кожного типу мають властиву їм одним морфологією і підтримують свій власний набір білків, що синтезуються. Матричні РНК (мРНК), що містяться в клітинах різного типу, також неідентичні. На основі усіх цих даних учені прийшли до одноставної думки, висловленої, наприклад, у 1976 р. Девідсоном (Davidson), що диференціювання зумовлюється змінами диференціальної експресії генів у різних клітинних лініях зародка, що розвивається.

У бактерій експресія генів контролюється виключно регуляторними механізмами, діючими на рівні транскрипції генів, тобто синтезу мРНК. В еукаріот регуляція дії генів складніша. Регуляція відбувається на рівнях транскрипції, процесингу, в результаті якого в ядрі з великого і складного первинного РНК-транскрипту утворюється відповідна мРНК, а також на рівні транспорту мРНК з ядра в цитоплазму. Трансляція мРНК після того, як вона потрапить до цитоплазми, також регулюється різноманітними механізмами. Ми користуємося досить невизначеним терміном "генна експресія", маючи на увазі множинність регулюючих механізмів, що можуть тут діяти.

Початкова детермінованість бластомерів до диференціювання в певних напрямках забезпечується взаємодією ядерного генома з інформацією, що знаходиться в цитоплазмі. Цю гіпотезу уперше чітко сформулював Т.Морган (Т.Morgan) у 1934 р. у своїй книзі "Ембріологія і генетика": "Відомо, що протоплазма в різних ділянках яйця дещо різна і що ці відмінності виявляються чіткіше в процесі дроблення – завдяки переміщенню матеріалів, що відбувається при цьому. Протоплазма поставляє матеріали, необхідні для збільшення кількості хроматину і для синтезу речовин, що виробляються генами. Можна припускати, що первинні відмінності між ділянками протоплазми чинять вплив на активність генів. Потім гени у свою чергу впливають на протоплазму, що призводить до виникнення нової послідовності реціпрокних реакцій. Такою нам представляється картина поступового ускладнення і диференціювання різних ділянок зародка".

Інформаційні елементи гіпотетичного зародка на зрізі заплідненого яйця, що містить ядро і локалізовані цитоплазматичні макромолекули двох типів. Цитоскелетний матрикс яйця являє вигляд ґрат. Слід вказати, що ґрати – це просто статичне зображення цитоскелетної системи, яка сама, мабуть, змінюється з течією розвитку. Після того, як почалося дроблення, кожна клітина зародка отримує ядро, рівноцінне за змістом ДНК кожному з інших ядер, проте ці ядра опиняються в різному цитоплазматичному оточенні. Існують певні потоки інформації. Таким чином кожне з ядер, що знаходяться в різних бластомерах, отримує особливий сигнал від певних локалізованих макромолекул. Відповідь ядра на отриманий сигнал залежить від виду макромолекул, локалізованих в цьому бластомері. Ця взаємодія призводить до ініціації ядрами специфічних типів генної експресії (що виходять з ядер). Виборча транскрипція, процесинг і трансляція специфічних частин ядерного генома веде до біохімічного і морфологічного диференціювання клітин зародка. Існує ще і індукція взаємодії – важлива взаємодія від однієї клітини до іншої; виникає між групами клітин зародка, при якому якась речовина, що виробляється однією групою клітин, індукує в певний час специфічне диференціювання іншої групи клітин. У хордових, наприклад, хорда індукує диференціювання вищерозміщеної ектодерми в нервову тканину.

Переконливі приклади локалізованості інформації, що призводить до специфічної експресії генів у різних ділянках клітини, зустрічаються рідко, проте ми опишемо один такий чудовий приклад. Примітивні родичі хордових – асцидії – в дорослому стані не особливо помітні: це мішковидні сидячі форми, за способом живлення що відносяться до фільтраторів. Проте личинки більшості видів асцидії не лише рухливі, але і мають

несподівану і цікаву морфологію. Будова цих пуголовкоподібних личинок відповідає основному плану будови тіла, типовому для хордових, тобто у них є спинний нервовий тяж і хорда, або примітивний хребет. У тулубі знаходяться зачатки статевозрілої асцидії але єдині функціональні ембріональні структури тулуба – це три сосочки прикріплення на передньому кінці тіла, сенсорна бульбашка, що містить одноклітинний отоліт, і очко, в якому є три клітини кришталика, пігмент і десяток ретинальних клітин. Ці сенсорні структури дають личинці можливість орієнтуватися по відношенню до напрямку сили тяжіння і до джерела світла. Рухливий хвіст містить хорду, що складається з 40-42 вакуолізованих клітин. Над хордою лежить нервова трубка, а по обидві сторони від неї – тяжи, що складаються з поперечносмугастих м'язових клітин, по 18 у кожному тяжі. Уся личинка одягнена оболонкою з епідермальних клітин. Личинка не живиться; вона плаває протягом усього декількох годин, після чого знаходить собі відповідний субстрат, прикріплюється і зазнає метаморфоз, перетворюючись на дорослу особину, яка веде сидячий спосіб життя і добуває собі їжу шляхом фільтрації води.

У 1973 р. Р.Уїттейкер (R. Whittaker) опублікував дослідження з регуляції появи у асцидії *Ciona* двох ферментів, місце синтезу яких у зародку було встановлене. Це ацетилхолінестераза, що з'являється тільки в м'язових клітинах на стадії хвостової бруньки, і тирозинази, що з'являється на цій же стадії тільки в двох пігментних клітинах нервового вузла. Пригнічуючи дроблення в різні терміни, Р.Уїттейкер отримувал зародки, що припинили розвиток на стадії 2, 4, 8, 16 або 32 клітин (нормальний зародок до моменту появи двох названих ферментів, тобто через 9-12 г після запліднення, складається приблизно з 1000 клітин). Зародки, дроблення яких було припинене, залишалися живими і синтезували тирозинази і ацетилхолінестеразу в той же самий час, що і нормальні зародки. Найважливіший результат цих експериментів полягав в тому, що синтез ферментів у зародків з пригніченим дробленням був просторово локалізований. Якщо дроблення припиняли на стадії двох бластомерів, то обоє вони синтезували ацетилхолінестеразу, але при зупинці розвитку на пізніших стадіях дроблення синтез її усе більш обмежувався клітинами, з яких в нормі утворюється хвостовий м'яз. Р.Уїттейкер дійшов висновку, що здатність до синтезу тирозинази і ацетилхолінестерази локалізується в певних ділянках цитоплазми на ранніх стадіях розвитку. Цей висновок підтвердили результати пізнішої роботи того ж автора, в якій він і його співробітники хірургічним шляхом видаляли у 8-клітинних зародків *Ciona* ту пару бластомерів, з яких розвиваються м'язи. Потім ці клітини поміщали в морську воду, де вони синтезували ацетилхолінестеразу, проте як в інших клітинах зародка цей фермент не синтезувався.

Пуроміцин – один з інгібіторів білкового синтезу – перешкоджав появі тирозинази і ацетилхолінестерази, і це доводить, що молекули ферменту дійсно синтезуються в той самий час, коли виявляється ферментна активність. Далі, обробка актіноміцином D, що пригнічує синтез РНК, також перешкоджала появі ферментів, якщо її виробляли за 2 г до появи ферментативної активності. Ці результати дозволяють вважати, що мРНК, необхідні для синтезу цих ферментів, не запасуються заздалегідь, а продукуються незадовго до синтезу. Регіонально-специфічний синтез мРНК – результат дії макромолекул, локалізованих в певних ділянках цитоплазми.

Описані тут експерименти можна було б, ймовірно, піддати критиці на тій основі, що актіноміцин пригнічує синтез ферменту, отруюючи клітини якимось неспецифічним чином. Проте інша серія експериментів, проведених Р.Уїттейкером на іншому ферменті, який з'являється тільки в ентодермі личинки, а саме на лужній фосфатазі, показала, що це не так: поява цього ферменту не пригнічується актіноміцином. Необхідна для синтезу лужної фосфатази мРНК, мабуть, вже міститься в яйці і в ході розвитку сама стає усе більш локалізованою.

З такою локалізацією інформаційних детермінантів, що визначають появу ацетилхолінестерази у личинок покривників, пов'язано одне цікаве і повчальне явище. Р.Уїттейкер вивчав, також, деякі види покривників, що відносяться до роду *Mogula*, у яких

личинки не розвиваються до пуголовкаподібної стадії. В одного з них, *M.arenata*, незважаючи на те що у нього не утворюється а ні хвостових м'язових клітин, ні навіть самого хвоста, відбувається локальний синтез ацетілхолінестерази в тій ділянці зародка, де повинні були б знаходитися м'язові клітини хвоста. Отже, незважаючи на втрату здатності до морфогенезу хвоста, локалізовані детермінанти синтезу ацетілхолінестерази збереглися. У деяких інших (можливо, більше стародавніх) видів *Mogula*, в яких личинки також позбавлені хвостів, здатність синтезувати цей фермент втрачена. Важливе значення незв'язаності клітинного диференціювання, про яке можна судити за синтезом ферментів або інших білків, з морфогенезом як механізмом еволюції розглядається детальніше далі.

Роботи Р.Уїттекера по покривниках розкривають два важливі аспекти цієї проблеми:

❶ диференціальна експресія генів, зумовлена дією локалізованих в певних ділянках детермінантів, грає вирішальну роль в диференціюванні;

❷ існує, мабуть, декілька механізмів, що забезпечують зберігання і експресію локалізованої морфогенетичної інформації.

Зародки активно синтезують білки, використовуючи мРНК-матриці, що походять з двох джерел:

→ мРНК одного класу синтезуються в процесі оогенезу і зберігаються в яйці до тих пір, поки не використовуються в процесі розвитку;

→ мРНК іншого класу синтезуються в результаті транскрипції, що відбувається в ядрах самого зародка.

мРНК обох класів містять велике число послідовностей і транскрибуються на ранніх стадіях розвитку. Для того, щоб уявити собі кількість мРНК, що синтезується при оогенезі, і міру її різноманітності (її складність), слід простежити, до якого рівня може дійти розвиток зародків морського їжака, якщо блокувати транскрипцію в їх клітинах. Такі зародки досягають стадії бластули, що вимагає значного рівня морфогенетичної активності, у тому числі клітинних ділень, змін форми клітин, зборки вій і синтезу ферменту вилуплення. Якщо блокувати транскрипцію в клітинах зародка, то гастрюляції не відбувається. Диференціювання на пізніших стадіях, ніж бластула, значною мірою залежить від дії генів цього зародка.

Галау (Galau) і його співавтори вивчали питання про число структурних генів, які повинні експресуватися в процесі розвитку зародків морського їжака. На думку цих дослідників, величина набору генів, які повинні експресувати в клітинах одного типу, щоб віддиференціювати їх від клітин іншого типу в тому ж організмі, ще не встановлена. Невідомо також, яке число генів необхідно для забезпечення основних життєвих функцій ("housekeeping"), загальних для усіх клітин. Використовуючи метод гібридизації нуклеїнових кислот, Галау та ін. визначали число структурних генів, представлених у вигляді активної мРНК на різних стадіях зародкового розвитку і в різних тканинах дорослого організму. Далі вони визначали, яка частина конкретних генів, представлених в мРНК гастрюли, була представлена також в мРНК інших стадій, що вивчалися ними, і тканин. Виявилось, що під час розвитку дуже велике число генів експресується у вигляді мРНК. Наприклад, на стадії гастрюли в процесі трансляції в білках знаходяться мРНК, що представляють від 10 до 15 тисяч генів. Велике число структурних генів експресується аналогічним чином на інших стадіях розвитку і в тканинах дорослого організму. Деякі з них є загальними для усіх вивчених стадій і тканин, але більшість експресується лише на окремих стадіях і в певних тканинах. Автори цієї роботи дійшли висновку, що ці глибокі відмінності між різними стадіями розвитку або різними тканинами відносно експресії генів лежать в основі їх функціонального диференціювання. Таким чином, в диференціюванні, що відбувається в процесі розвитку, бере участь диференціальна експресія тисяч генів у вигляді мРНК, і ця експресія супроводжується зміною складу мРНК, клітин, що синтезуються ядрами, зазнають диференціювання.

Якщо диференціальна дія генів повинна викликатися чинниками, локалізованими в цитоплазмі, то повинні існувати докази на користь того, що компоненти цитоплазми дійсно здатні направляти функцію ядра. Такі докази отримані в експериментах по трансплантації ядра з клітини одного типу в клітину якого-небудь іншого типу. Яскравим прикладом такого підходу служать експерименти по введенню ядер клітин головного мозку дорослої жаби в жаб'ячих клітини-реципієнтів трьох типів, проведених Грехемом із співробітниками (Gracham et al.) і Гьордоном (J. Gurdon) в лабораторії останнього. Ядра з клітин головного мозку дорослої жаби зазвичай не синтезують ДНК і не зазнають мітозу. Ці ядра вводили:

- ① у незрілі ооцити, що синтезують РНК, але не ДНК;
- ② в ооцити після овуляції, що завершують мейоз і ущільнені хромосоми, що містяться, на веретенах мейозу;
- ③ в яйцеклітини відразу після активації, синтезуючі ДНК, але не РНК.

В усіх випадках введені ядра змінювали свою активність, так щоб вона відповідала характеристикам клітин-реципієнтів.

Так, наприклад, в ядрах, введених в дозріваючі ооцити, хромосоми ущільнювалися і асоціювалися з веретенами, а в ядрах, введених в активовані яйця, починався синтез ДНК. Оскільки ні та ні інша активність невластиві ядрам клітин мозку, ці нові активності, очевидно, викликалися цитоплазмою клітин-реципієнтів. Схожі експерименти з пересадки ядер показали також, що транскрипція певних генів у пересаджених ядрах (а саме, генів рибосомної РНК) регулюється цитоплазмою клітини-хазяїна.

Вплив цитоплазми на ядро досягає такої міри, що воно визначає специфічні типи синтезу мРНК. Де Робертс і Гьордон (De Robertis і Gurdon) вводили ядра клітин шпорцевої жаби (*Xenopus*), що вирощувалися в культурі тканини, в ооцити трітона *Pleurodeles*. Використовуючи високе розділення за допомогою двовимірного гел'єлектрофорезу, вони могли відрізнити синтез білків, характерних для *Xenopus*, від білків, характерних для культивованих клітин *Pleurodeles*, а також синтез білків, характерних для культивованих клітин *Xenopus*, від білків, характерних для її ооцитів. При пересадці ядер з культивованих клітин *Xenopus* в ооцити *Pleurodeles* у них починали синтезуватися білки, властиві ооцитам *Xenopus*, але не культивованим клітинам. Ці зміни складу білків, що синтезуються, можна було запобігти за допомогою α -аманітину – речовини, що пригнічує синтез РНК. Таким чином, дія цитоплазматичного середовища ооцитів *Pseudouroleles* на ядра *Xenopus* полягала в інактивації експресії одного набору генів і активації експресії іншого набору, характерного для ооцитів.

Цитоплазма чинить свою регулюючу дію на ядерну активність, швидше за все, на рівні транскрипції; відомі випадки специфічної транскрипції генів при диференціюванні. Один такий приклад пов'язаний з кільцями Бальбіані в політенних хромосомах двокрилих. У мух і інших двокрилих клітини деяких тканин (слинні залози, мальпігієві судини, середня кишка) містять гігантські політенні хромосоми, в яких при забарвленні на ДНК виявляються чітко виражені поперечні смуги (диски). Показано, що багато окремих смуг відповідають місцю розташування окремих генів і що можна встановити кореляцію між генетичною картою, з одного боку, і характером й відносним фізичним розташуванням смуг, з іншою. У деяких диференційованих клітинах обмежене число певних смуг утворює здуття, виступаюче за межі хромосоми (пуфи). Особливо великі пуфи – кільця Бальбіані виникають в тих ділянках, в яких знаходяться гени, надзвичайно активні відносно транскрипції. Кільця Бальбіані мають чотири важливі властивості:

1. Клітини різного типу містять різні кільця Бальбіані. Так, в слинних залозах двокрилого *Acricotopus* є клітини трьох типів, які усі містять одні і ті ж три гігантські хромосоми, але хромосоми з різних клітин розрізняються за характером пувів і їх розподілом.

2. Зміни, що відбуваються в клітинах деяких типів у процесі розвитку, корелюють із змінами в характері пувів. У деяких мух гігантські клітини подушечок на лапках в

процесі розвитку зазнають складні зміни, що супроводжуються впорядкованими послідовними змінами пуфів політенних хромосом.

3. Кільця Бальбіані в політенних хромосомах служать місцями активної транскрипції. Дейнхолту (Daneholt) вдалося ізолювати єдину у своєму роді високомолекулярну РНК, транскрибовану в одному з кілець Бальбіані мотилля *Chironomus*.

4. Існує пряма кореляція між наявністю цього кільця Бальбіані і синтезом певного білку. Гроссбах (Grossbach) вивчав два близькоспоріднені види: *Chironomus tentans* і *C.pallidivittatus*, слинні залози яких виробляють великі кількості секреторних білків. У слинних залозах *C.tentans* синтезується п'ять білків, а в залозах *C.pallidivittatus* – ті ж п'ять білків і ще один. Синтез цього шостого білку корелює з наявністю в 4-ій хромосомі *C.pallidivittatus* певного пуфа, відсутнього у *C.tentans*. Схрещуючи ці два види і вивчаючи отримані гібриди, Гроссбах показав, що синтез шостого білку у гібридів залежить від наявності у них 4-ої хромосоми *C.pallidivittatus* з цим особливим пуфом.

До недавнього часу такого роду дані розглядали як доказ того, що диференціальна експресія генів в процесі розвитку зумовлена головним чином диференціальною транскрипцією генів, як це ясно видно у разі кілець Бальбіані. Проте деякі недавні спостереження змусили віднестися до цього висновку з деякою обережністю, оскільки може виявитися, що таку ж важливу роль грає регуляція експресії генів і на інших рівнях.

Складність або число різних унікальних послідовностей ДНК, представленої у вигляді РНК, зазвичай в 5-10 разів вище в ядерній РНК, ніж в мРНК. Ядерні РНК, такі, що є безпосередніми продуктами транскрипції, довше, ніж мРНК, і містять попередники останніх. Проста модель диференціальної транскрипції вимагає, щоб дві стадії розвитку з популяціями матричних, що сильно розрізняються, РНК, подібні до тих, які вивчав Галау, істотно розрізнялися і по своїх ядерних РНК. Клін і Хамфрі (Kleene, Humphreys) порівнювали ядерні РНК, наявні у морського їжака на двох різних стадіях розвитку, і зіткнулися з несподіванкою: число унікальних послідовностей ДНК, що транскрибується в ядерні РНК, було дуже велике (транскрибувалася приблизно третина усіх цих послідовностей), а послідовності ядерних РНК, присутні на цих двох стадіях, були ідентичні. Така схожість між ядерними РНК спостерігається на всіх стадіях життєвого циклу. Уолд та ін. (Wold et al.) відмічають, що лише небагато з послідовностей мРНК, що транслюються в білки у зародків морського їжака на стадії бластули, є присутніми також в цитоплазмі клітин дорослих особин, проте як в ядрах ці ж послідовності містяться як у зародків, так і у дорослих особин. Створюється враження, що в ядрах на всіх стадіях розвитку транскрибується одне і те ж дуже велике число структурних генів, але що лише певні підмножини цих транскриптів піддаються процесингу з утворенням специфічних мРНК, що транслюються на кожній окремій стадії.

Наявність механізмів транскрипцій, а також посттранскрипцій, регулюючих диференціальну експресію генів, визначувану ядром, зрештою ускладнює розуміння чинників, регулюючих дію генів, проте існування цих механізмів не міняє витікаючий з усього нашого обговорення головний ембріологічний висновок. Суть гіпотези полягає в тому, що певні макромолекули, локалізовані в цитоплазмі і розподілені по деяких blastomeres зародка, викликають в цих blastomeres специфічну експресію генів, що визначається ядром.

Під час диференціювання і розвитку клітини піддаються драматичним морфологічним і функціональним змінам без яких-небудь змін в послідовностях ДНК. Зміни патернів генної експресії, що лежать в основі, встановлюються і підтримуються за допомогою епігенетичних процесів. Первинна механістична інформація була отримана шляхом спостережень за станами генної активності і репресії, ДНК, що корелює з рівнем метілювання, в їх промоторних регіонах. Метілювання ДНК є постреплікативною модифікацією, яка відбувається винятковою в C5 позиції залишків цитозину (5mC) і переважно в контексті CpG дінуклеотидів в клітинах хребетних. Три головних ДНК метилтрансферази (Dnmt1, 3a і 3b) встановлюють специфічні патерни метілювання ДНК

під час диференціювання і підтримують їх протягом багатьох клітинних ділень. Метилування CpG розпізнається з допомогою, принаймні, трьох сімейств білків, які у свою чергу рекрутують гістон що модифікують і хроматин ремоделюючі ензими і тим самим транслюють метилування ДНК в репресивні хроматинові структури. Таким чином, численні модифікації гістонів виявляються пов'язаними різними способами з метилованою ДНК.

Метилування ДНК

Модифікація ДНК за допомогою метилування є специфічною формою регуляції генів, при якій метильовані CpG дінуклеотиди зберігаються в наступних клітинних діленнях, завдяки функції підтримки метілаз, діючих на напівметильовану ДНК під час реплікації (Leonhardt et al., 1992). Епігенетичні модифікації можуть, отже, розмножуватися з ДНК клітин, що діляться, незалежно від складу транс-діючих чинників, що міняються. Ця властивість робить метилування ДНК зручним механізмом для створення успадкованих патернів експресії генів у клітинних клонах під час розвитку. Важливість метилування ДНК під час ембріогенезу продемонстрована за допомогою цілеспрямованого руйнування гена метилтрансферази ДНК миші за допомогою гомологічної рекомбінації (Li et al., 1992).

Метилування ДНК відіграє важливу роль в регуляції тканино-специфічної експресії генів під час диференціювання склетних м'язів (Yisraeli et al., 1986). Різні делеційні мутації в актиновому промоторі попереджають деметилування і експресію, вказуючи тим самим, що видалення метилових груп знаходиться під цис-діючим контролем і може бути обов'язковим для активації транскрипції під час диференціювання м'язів (Paroush et al., 1990).

У цій роботі (Grieshammer et al., 1995) представлений детальний аналіз CpG метилування ДНК регуляторних елементів в myosin light chain MLC 1/3 гени, як під час ембріонального розвитку, так і в різних типах волокон дорослих м'язів у трансгенних мишей (chloramphenicol acetyl transferase CAT репортерний ген під контролем MLC регуляторних послідовностей). У трансгенних ембріонів миші експресія м'язеспецифічного репортерного гену градірує в аксіальних м'язах, що розвиваються упродовж росто-каудальної вісі і в клітинних культурах з цих м'язів. Показано, що підтримка позиційних відмінностей експресії трансгена MLC-CAT не може бути пояснено відмінностями в транскрипційній компетентності відповідних м'язів. Швидше патерн експресії трансгена відбиває міру CpG деметилування як MLC1 промотора, так і MLC ехансера. Селективне метилування бере участь у підтримці швидше, ніж виникненні транскрипційних відмінностей в м'язах, що розвиваються. Градієнт в експресії трансгена MLC-CAT у сегментованих аксіальних м'язах уздовж передньо-задньої вісі ембріонів (Donoghue et al., 1991a; Grieshammer et al., 1992) вказує на те, що ДНК регуляторні елементи можуть бути як мішені для регіональних регулювальників, що створюють позиційно обмежені патерни експресії трансгенів під час раннього розвитку м'язів. У дорослих росто-каудальний градієнт експресії трансгена зберігається тільки в сегментованих аксіальних м'язах міжреберних і міжхребцевих, проте як м'язи голови і латеральні м'язи тулуба і передніх кінцівок виявляють високі рівні експресії трансгена незалежно від положення (Donoghue et al., 1991a; Grieshammer et al., 1992).

Регіональні відмінності в експресії MLC-CAT трансгена зберігаються в склетних клітинних клонах, що походять з латеральних м'язів трансгенних тварин і корелюють із станом метилування. В цьому дослідженні встановлено безпрецедентну кореляцію між метилування елементу нижчестоячого ехансера і регуляцією тканино-специфічної експресії гена. Припущення, що епігенетичні модифікації дистальних (видалених) регуляторних елементів можуть контролювати транскрипцію, підтверджене дослідженнями U.Grieshammer M.J.McGrew and N.Rosenthal. Цікаво, що CpG метилування не впливає на зв'язування ядерних чинників з серцевиною MLC ехансера.

Механізм зумовленого метилуванням інгібіції експресії MLC-CAT трансгена найімовірніше пов'язаний із зміною локальної конфігурації хроматину (Cedar and Razin, 1990; Bird, 1992) з наступною модифікацією взаємодій регуляторних білків з ДНК. Згідно з цим дослідженням регуляторні послідовності, включені до трансгену MLC-CAT є мішенню для низки чинників, що наві'язують нові патерни метилування, коли вони ізольовані з контексту ендегенного локуса. Патерн градуїованої експресії трансгена MLC-CAT у сегментованих міжкостальних і міжхребцевих м'язах виникає в міотомних, м'язових масах що розвиваються рано, і не виявляється в м'язах стінки тіла або мускулатурі кінцівок (Grieshammer et al., 1992). Вочевидь, що відмінності в експресії трансгена відбивають відмінності в їх ембріональному походженні. У сомітах, що розвиваються, множинні міогенні клони виникають під час ембріогенезу, що можна відрізнити за їх локалізацією в сомітах (Ordahl and LeDouarin, 1992), по їх міграторній поведінці та від їх залежності від аксіальних структур, таких як нервова трубка і хорда для міогенного диференціювання (Rong et al., 1992; Pourquie et al., 1993). Формування м'язів кінцівок залежить від функції Pax3, у той час як аксіальні лицьові і м'язи стінки тіла не залежать (Bober et al., 1994). Отже, різні регуляторні шляхи можуть відповідати за формування специфічних міогенних клонів.

Це дослідження вказує на те, що ці відмінності можуть жорстко підтримуватися в результаті створення чітко певних епігенетичних модифікацій, контролюючих регіональну регуляцію генів. Так, патерн метилування енхансерного елементу MLC, розташованого дистально від стартової точки транскрипції, безпосередньо відбиває роство-каудальний градієнт експресії трансгена MLC-CAT у міжхреберних м'язах. Експресія і відповідне метилування трансгена MLC-CAT, отже, виступає як маркер виникаючих різних міогенних клонів. Залишається визначити чи маркірує мінливість в метилуванні ендегенного локусу також відмінності, що дають різні групи м'язів.

Під час розвитку ссавців геном піддається глобальним змінам в рівнях метилування (Monk et al., 1987; Chaillet et al., 1991; Kafri et al., 1992), що поступово модифікують індивідуальні локуси. Виникнення тканино-специфічних патернів метилування відбувається до детерміації (before concomitant). Здається, що деметилування у ссавців нижчестоячого енхансерного елементу MLC може бути обов'язковою умовою для ініціації транскрипції з MLC1 промотора. Ця модель підтверджується роботою, де було показано, інтронний енхансер необхідний і достатній для тканино-специфічного деметилування і активації імуноглобулінового гена (Lichtenstein et al., 1994).

Маловірогідно, що метилування є первинним детермінантом позиційно-обмеженої експресії трансгена MLC-CAT у міотомі, що розвивається. Відносно уніформне метилування енхансерних послідовностей трансгена MLC в ембріональних сомітах з різних аксіальних рівнів підтверджує, що мінливість в метилуванні енхансера MLC в неонатальних м'язах виникає пізніше. Рівні експресії генів у різних м'язах можуть підтримуватися локальними конфігураціями хроматину, що відбивають селективне CpG метилування регуляторних послідовностей. Повинні існувати регіональні регулювальники, що безпосередньо встановлюють патерн диференціального метилування використовуючи субнабори CpG дінуклеотидів, які ще не проаналізовані. Такі сайти повинні виступати як ініціальні маркери фінального патерну метилування, що градирує, і який встановлюється на пізніх стадіях розвитку. Цей механізм аналогічний моделі *імпринтингу генома*, при якому хромосомні маркери алелей що імпринтуються потрібні після запліднення, але до інактивації гена (Latham et al., 1994). Можуть бути виявлені схожі молекулярні шляхи забезпечення позиційною інформацією м'язів, що розвиваються, в ембріонів хребетних.

У клітинах ссавців приблизно 3-5% цитозинових залишків ДНК генома є присутні як 5-метилцитозин. Ця модифікація цитозина відбувається після реплікації ДНК і каталізується ДНК метилтрансферазою з використанням S-аденозил-метионіну як донора

метилу. Перша з клітин ссавців клонована, її функція підтримувати суворо певний патерн метилювання, характерний для кожного типу диференційованих клітин. Три інші Dnmt (Dnmt 2, Dnmt 3a і 3b) також клоновані. Дві останні, мабуть, функціонують як *de novo* метилази, оскільки вони можуть метилювати напівметилювану і неметилювану ДНК з однаковою ефективністю. Експресія 3b істотно збільшується в пухлинах. Друга, мабуть, метилює інтегровані ретровірусні послідовності. Деякі вважають, що друга не потрібна для підтримки метилювання вірусної ДНК і *de novo* метилювання. Ідентифікована і специфічна деметилаза, яка використовує CpG ДНК як субстрат.

Близько 70-80% 5-метилцитозинових залишків виявляється в CpG послідовностях. Ці послідовності виявляються з високою частотою в геномі і позначаються як CpG острівці. CpG острівці – це ділянки ДНК більше 200 п.н. із змістом G+C більше 0,5 (очікувана/спостережувана присутність $CpG > 0,6$). Було встановлено, що більшість CpG острівців, що асоціюються з генами неметилювано в зародковій лінії і вони часто розташовуються в промоторних ділянках генів. Ці промотори близько 1 т.п.н., метилювання острівців CpG усередині них може ефективно і спадково укласти гени в стані "off". Неметилювані CpG острівці асоційовані з генами домашнього господарства, проте як острівці більшості тканино-специфічних генів метилювані.

Метилювання ДНК бере участь в ембріональному розвитку. Імпринтинг генома також пов'язаний з метилюванням ДНК, з інактивацією специфічних генів на X хромосомі. Передбачається, що метилювання ДНК бере участь і в процесах старіння.

Метилювання CpG острівців часто прирівнюється до неактивності транскрипції і є доказом цього для острівців, локалізованих у промоторах генів. Також метилювання є, певно, частиною механізму перманентного мовчання гена, включаючи і ті, що інактивуються в X-хромосомі.

Метилювання ДНК і регуляція експресії генів

Оскільки 5-метилцитозин проникає у велику борозну спіральної ДНК він, можливо, тим самим модифікує взаємодію цитозину з чинниками транскрипції, що зв'язуються. Показано, що *in vitro* специфічні транскрипційні чинники зв'язуються з меншою спорідненістю з метилюваними мішенями.

Іншим можливим механізмом може бути регуляція за допомогою білків, що зв'язуються переважно з метилюваними промоторами і тим самим запобігають зв'язуванню з чинниками транскрипції. Ідентифіковано 2-а білки, що зв'язуються сиквенс-специфічно, з метилюваною ДНК – MDBP-1 і MDBP-2.

Ідентифікований ще один клас білків, що зв'язуються з метилюваними CpG (MeCPs), які діють, мабуть, як репресори транскрипції. Відомі 2-а члени цього сімейства – 1 і 2, перший потребує 12 метіл-CpG і для переважного зв'язування з метилюваною ДНК, друга є поширеним хромосомним білком, який потребує поодиноких метилюваних CpG сайтів для зв'язування ДНК. Обое репресують транскрипцію.

MeCPs2 ко-преципітується разом з гістоновою деацетилазою; це вказує на наявність зв'язку між метилюванням ДНК і структурою хроматину. Відомо, що експресія гена може залежати від хімічної модифікації гістонів з подальшою зміною структури хроматину. Хроматин у клітинах ссавців складається з серії нуклеосом з компактною їх конфігурацією. Нуклеосома складається з 146 п.н. ДНК, обернутої навколо білкового октамеру, що містить по 2 молекули кожного з гістонів H2A, H2B H3 і H4. У місці транскрипції структура хроматину стає "відкритішою" і доступнішою чинникам транскрипції, а ДНК чутливою до розщеплювання нуклеазою. Ацетилювання гістонів передуює транскрипції і зумовлює деконденсацію хроматину, щоб забезпечити зв'язування чинників транскрипції з ДНК. Гістонова ацетильтрансфераза і гістонова деацетилаза відіграють важливу роль у цьому процесі. Ацетилювання гістонів асоціює з активною транскрипцією. Очевидне ацетилювання ϵ -груп лізинових залишків знижує позитивний заряд гістонів і знижує їх зв'язуючу спорідненість із ДНК, що сприяє "відкриттю"

хроматину. На користь цього свідчить й інгібітор гістонової деацетилази, trichostatin A (TSA) може активувати транскрипцію деяких генів.

Передбачається, що метильовані неактивні гени містять недоацетильовані гістони, проте як неметильовані активні гени переважно асоційовані з високо ацетильованими гістонами. Ділянки, де метильовані гени зв'язують MeCP2, у свою чергу рекрутують гістонову деацетилазу в результаті відбувається супресія транскрипції. TSA може активувати деякі гени, які метильовані, але не усі метильовані гени. Це вказує на те, що взаємодія між метильованою ДНК, 2-ю і гістоновою деацетилазою складне і можливо пов'язано із залученням інших чинників. Часткове деметилування деяких генів за допомогою інгібітору 5-AZA-CdR взаємодіє синергічно із TSA при активуванні метильованих генів, які нечутливі до одного лише TSA.

Парадокс метилування

Але не усі CpG острівці і сайти метилування локалізовані в промоторах; деякі тканино-специфічні та гени, що імпринтіровані мають CpG острівці, розташовані на віддаленні від сайту ініціації транскрипції, а багато генів мають множинні промотори. Прикладом гену з внутрішнім CpG острівцем може служити ген людини APOE, в екзоні 4 якого CpG острівець в 940 п.н.; такими ж є гени p16, MYOD1 і PAX6. Цікаво, що гени домашнього господарства рідко мають розташовані нижче CpG острівці, в той час як ця ситуація спостерігається в 49% генів із більше обмеженим патерном експресії. Величина острівців у таких генах менше (в середньому 935 п.н. на порівняння з 1-35) і зовсім маленькі острівці (200-600 п.н.) асоційовані з генами з обмеженим патерном експресії. Ці CpG островки можуть представляти собою тканино- і стадіоспецифічні промотори. Інша можливість, що вони виконують кодуєчі функції, що не можуть бути втрачені при мутації.

Метилування зумовлює перманентну супресію активності CpG острівців у промоторах. Прикладами такої постійної супресії є:

- промотори Х-зчеплених генів;
- промотори імпринтованих генів;
- паразити внутрішньогеномів;
- гени супресорів пухлин (p16, RB1, VHL і др);
- гени репарації ДНК (напр., MLH1).

Докази:

- ☞ Мовчання генома інактивованих промоторів;
- ☞ Гени, що мовчать, рідко спонтанно реактивуються;
- ☞ Метилування регулюється онтогенетично;
- ☞ Для деметилування необхідно проходження через зародкову лінію;
- ☞ Трансфекція інактивованих алелей не призводить до їх експресії;
- ☞ Метильовані промотори зв'язують MeCP1 і MeCP2;
- ☞ MeCP2 забезпечує зв'язок з гістоновою деацетилазою;
- ☞ *In vitro* метилування пригнічує експресію репортерних генів;
- ☞ Промотор м.б. реактивований за допомогою 5-AZA-CdR.

Білки, пов'язані з метильованою ДНК зумовлюють, також, активність гістонової деацетилази, вказуючи тим самим, що вони індукують конфігурацію супресованого хроматину в сайті ініціації транскрипції. Показано, що метилування 1-2 острівців у промоторі достатньо для суворої супресії активності промотора. Метилування 7% CpG сайтів може ефективно зумовлювати мовчання гена. З іншого боку метилування CpG острівців нижче за активний промотор не блокує формування транскриптів. Гени ссавців відрізняються в цьому відношенні від генів грибів.

Висловлюється припущення, що функціональні копії елементів *Alus* (підходять під визначення CpG острівців), що повторюються, можуть призводити до порушення функції гена і подальшої транспозиції, що метилування ДНК у цьому випадку може супресувати

активність промоторів цих чисельних елементів. Так, метилювання елементу в інтроні 6 гена TP53 людини відбувається в усіх вивчених типах клітин.

Використовується метилювання для контролю активності паразитичних промоторів, метилювання *de novo* CpG-богатих ділянок повинне блокувати ініціацію сторонніх транскриптів, дозволяючи в той же самий час транскрипції з активного промотора.

Метилювання CpG острівців нижче за точку ініціації транскрипції не блокує елонгації в клітинах ссавців. Цей парадокс може бути дозволений, якщо припустити, що транскрипція через CpG острівці сприяє метилюванню *de novo*. У багатьох випадках міра метилювання CpG острівців корелює з підвищенням, чим зі зниженим рівнем експресії генів. Чудовим прикладом є ген Igf2r миші, де транскрипція семантичної нитки материнського гена примушує CpG острівцеві у ділянці 2 до метилювання *de novo*, і таким чином до мовчання його здатності, діяти як промотор для антисемантичної нитки. Ця ситуація протилежна на батьківському алелі – тут ділянка 2 неметилювана і виступає як промотор, що управляє транскрипцією в протилежному напрямку через CpG острівцеві, що веде до його *de novo* метилювання і мовчання. Інактивованій Igf2r промотор не здатний метилювати *de novo* ділянку 2.

Показано, що промотор рецептора естрогену і Igf2 промотори P2-P4 стають метилюваними *de novo* в епітелії колону у старих індивідів. Цікаво, що обидва ці острівці є нижчестоячими по відношенню до інших промоторів. У разі Igf2 рівень метилювання *de novo* P2-P4 острівців був найвищим у печінці, де експресія, керована вищестоячим промотором, також була найвищою. Є численні приклади пухлинних клітин, де метилювання *de novo* корелює з підвищеною експресією певних послідовностей. Наприклад, при хронічній мієлогенній лейкемії людини транслоцирований ABL промотор, який виявляється розташованим нижче за сильний BCR промотор, виявляє *de novo* метилювання, яке збільшується з мірою експресії. В екзоні 2 гени p16 і в екзоні 5 гена PAX6 гіперметилювання острівців корелює з мірою експресії.

Зрозуміло, що однієї транскрипції недостатньо для індукції метилювання *de novo* CpG острівців в генах «домашнього господарства». Також α -глобіновий ген 2, в якому уся кодуюча ділянка є CpG острівцем, не метилюється в експресуючих його еритроїдних клітинах. Ці відмінності можуть бути пов'язані з близькістю до стартової точки транскрипції або з транскрипцією в невідповідному клітинному вмісті. Пов'язане з транскрипцією метилювання м.б. зумовлене походженням транскрипційного комплексу або з тимчасовим утворенням поодинокі нитки ДНК, яка як відомо чудовий субстрат для метилювання *de novo*.

Аномальне метилювання CpG острівців у промоторах генів супресорів пухлин, таких як кодують ретинобластому, Von-Hippel Lindau і p16, може робити свій внесок у функціональну інактивацію.

Метилювання ДНК і пухлини (Momparker, Bovenzi, 2000)

Загальний рівень 5-метилцитозину в пухлинних клітинах часто нижче, ніж в нормі. Але фактично під час туморогенезу є збільшення специфічного метилювання генів, регулюючих ріст клітин.

5-Метилцитозин і мутації

5-метилцитозин може піддаватися спонтанному деамінуванню з утворенням тиміну зі значно більшою швидкістю, ніж деамінування цитозину в урацил. Якщо деамінування 5-метилцитозину не репарується, то виникають С->Т транзиційні мутації. Подібні мутації спостерігаються в p53 гені супресора пухлини. Цей феномен складніший і може бути пов'язаний із залученням додаткових подій. Наприклад, бензопірен переважно формує *adducts* у метилюваних CpG сайтах p53 гена, що є гарячими точками для мутування.

Аберантне метилювання ДНК пов'язаних з пухлинами генів

Клітина ссавців з часом подвоєння в 24 г може дати масу в 1 кг (1012 клітин) протягом 40 днів. Тому вона містить безліч генів, які супресують цей потенціал зростання. Аналіз сімейних випадків ретинобластоми (Rb) дозволив припустити, що обидва алелі Rb тумор-супресуючого гена інактивуються, щоб дати злоякісний фенотип. Виявлення, що багато генів супресори пухлин можуть бути інактивовані аберантним метилюванням CpG острівців промоторної ділянки показало, що ця епігенетична подія відіграє важливу роль в туморогенезі. Передбачається, що біалельне метилюванням або метилюванням в комбінації з мутацією або делецією може призводити до інактивації гена супресора пухлини. Можливо, що ДНК метилтрансфераза може робити помилки при метилюванні CpG острівців у нитці ДНК, що формується, даючи неметилований CpG в паралельній нитці. Можливо, що аномальне метилюванням м.б. зумовлене видаленням CpG зв'язуючих білків, що захищають ці сайти від метилюванням.

Супресори пухлин і інші пов'язані з пухлинами гени гіперметиловані у людини (табл. 1).

Таблиця 1

Гени, що мовчать при аберантному метилюванні ДНК і що активуються 5-AZA-CdR у пухлинних лініях клітин людини

Gene	Activation 5-AZA-CdR
Tumor suppressor	
p15 INK4b (cyclin kinase inhibitor)	+
p16 INK4A (cyclin kinase inhibitor)	+
p73 (p53 homology)	+
ARF/INK4A (regulate level p53)	+
Wilms tumor	+
von Hoppel Lindau (VHL)	+
Retinoic acid receptor- β (RAR β)	+
Estrogen receptor	+
Androgen receptor	+
Mammary-derived growth inhibitor	+
Hypermethylated in cancer (HIC1)	nd
Retinoblastoma	nd
Invasion/metastases suppressor	
E-cadherin	+
Tissue inhibitor metalloproteinase - 3 (TIMP - 3)	+
mts-1	+
CD-44	+
DNA repair/detoxify carcinogens	
Methylguanin methyltransferase	+
hMLH1 (mismatch DNA repair)	+
Glutathione-S-transferase	nd
BRCA-1	nd
Angiogenesis inhibitor	
Thrombospondin-1 (TSP-1)	+
TIMP-3	+
Tumor antigen	
MAGE-1	+

nd, not done

p16 кодує конститутивно експресіруючуся

У різних типах пухлин аномальне або випадкове метилювання CpG острівців виявляється в промоторних регіонах багатьох асоційованих із раком генів, призводячи до пригнічення їх експресії. Залучення до цього процесу генів, супресуючих пухлини, супресуючих метастазування, ангіогенез і репарацію ДНК вказує на те, що цей епігенетичний процес відіграє важливу роль в туморогенезі. Інгібітор метилювання ДНК, 5-AZA-CdR, реактивує експресію більшості з цих генів в пухлинній лінії клітин людини.

Лікування пухлин інгібіторами метилювання ДНК

5-AZA-CdR є потужним і специфічним інгібітором ДНК метилтрансферази. Інактивація ДНК метилтрансферази пов'язана з незворотним утворенням ковалентних містків між цим ферментом і аналогом. Антисемантична ДНК метилтрансферази виявляє *in vitro* протипухлинну активність і деякий потенціал по реверсії злоякісного фенотипу. Ці антисемантичні олігонуклеотиди інгібують зростання пухлин у модельних тваринах. 5-AZA-CdR інгібує кишкові новоутворення у мишей. 5-AZA-CdR є S-фаза специфічним агентом з коротким періодом напів-життя, фармакологічна активність його є дозово-залежною. При клінічній 5-AZA-CdR терапії інтенсивні дози в короткі інтервали дають оптимальний ефект. Він виявився потужнішим антилейкемічним агентом, ніж цитозин арабінозид. Перші клінічні випробування показали, що 5-AZA-CdR викликає повну ремісію у пацієнтів з гострою лейкемією *in relapse*. Істотно знижується ДНК метилювання лейкемічних *blasts*. 5-AZA-CdR виявляє клінічну активність і у пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією при *blast crisis* і у пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом, прелейкемії. 5-AZA-CdR виявляє протипухлинну активність проти пухлини грудей. У попередніх дослідженнях пацієнтів із пухлинами голови й шиї і пацієнтів з пухлинами простати 5-AZA-активність, зумовлену CdR виявляв від мінімального до середнього рівня антипухлинну дію використанням субоптимальних доз. Використання інтенсивних доз 5-AZA-CdR у пацієнтів з IV стадією *non-small cell lung* пухлиною давало протипухлинний ефект, включаючи одного пацієнта, що прожив більше 6 років (ці пацієнти зазвичай живуть дуже недовго). Клінічна протипухлинна активність 5-AZA-CdR складна для оцінки.

Гематопоетична токсичність є основним побічним ефектом 5-AZA-CdR, який обмежує дози. Він може бути здоланий за допомогою генної терапії, тобто введення гена резистентності до ліків, цитидин деамінази, в гематопоетичні клітини для захисту їх від токсичності 5-AZA-CdR.

Питання для самоперевірки знань:

1. Охарактеризуйте етапи трансляції білка та які чинники залучені до цього процесу.
2. Експресія чужорідних генів у мікроорганізмах.
3. Надайте характеристику наступним поняттям: трансформація, трансфекція, трансдукція, кон'югація.
4. Введення генів в ембріони та їх експресія.

Матеріали самостійного опрацювання:

1. Моноцистронні та поліцистронні мРНК.
2. Специфіка трансляції у прокаріот та еукаріотів.

5. СИНТЕЗ БІЛКІВ

Центральна догма молекулярної біології постулювала лише шлях передачі генетичної інформації від нуклеїнових кислот до білків і, отже, до властивостей і ознак живого організму. Вивчення механізмів реалізації цього шляху упродовж десятиліть, що послідували за формулюванням центральної догми, розкрило набагато різноманітніші функції РНК, ніж бути тільки переносником інформації від генів (ДНК) до білків і служити матрицею для синтезу білків.

На рисунку 8 представлена загальна схема біосинтезу білку в клітині. РНК-посередник (messenger RNA, матрична РНК, мРНК), що кодує білки, про яку і йшла мова вище, – це лише один з трьох головних класів клітинних РНК. Основну їх масу (близько 80%) складає інший клас РНК – рибосомні РНК, які утворюють структурний каркас і функціональні центри універсальних білок-синтезуючих часток – *рибосом*. Саме рибосомні РНК відповідальні – як в структурному, так і у функціональному відношенні – за формування ультрамікроскопічних молекулярних машин, званих рибосомами. Рибосоми сприймають генетичну інформацію у вигляді молекул мРНК і, будучи запрограмовані останніми, роблять білки в точній відповідності з цією програмою.

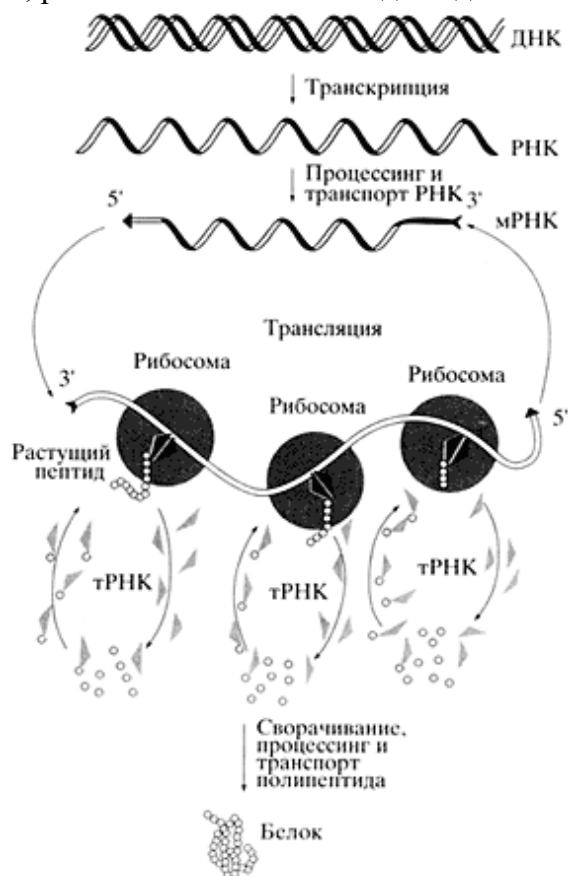


Рис. 8. Загальна схема біосинтезу білків

Проте, щоб синтезувати білки, однієї тільки інформації або програми недостатньо – необхідно ще і матеріал, з якого їх можна зібрати. Потік матеріалу для синтезу білків йде в рибосоми через саме третій клас клітинних РНК – РНК-переносників (transfer RNA, транспортні РНК, тРНК). Вони ковалентно зв'язують – акцептують – амінокислоти, що служать будівельним матеріалом для білків, і у вигляді аміноацил-тРНК надходять в рибосоми. У рибосомах аміноацил-тРНК взаємодіють з кодонами – тринуклеотидними комбінаціями – мРНК, внаслідок чого і відбувається декодування кодонів у процесі трансляції.

Отже, перед нами набір головних клітинних РНК, що визначають основний процес сучасної живої матерії – біосинтез білку. Це мРНК, рРНК і тРНК. РНК синтезуються на ДНК за допомогою ферментів – РНК-полімераз, що здійснюють транскрипцію – переписування певних ділянок (лінійних відрізків) двутяжевої ДНК у форму однтяжевої РНК. Ділянки ДНК, що кодують клітинні білки, переписується у вигляді мРНК, проте як для синтезу численних копій рРНК і тРНК є спеціальні ділянки клітинного геному, з яких йде інтенсивне переписування без наступної трансляції в білки.

Хімічна структура РНК

Хімічно РНК дуже схожа на ДНК. Обидві речовини – це лінійні полімери нуклеотидів. Кожен мономер – нуклеотид – є фосфорильований N-глікозид, що побудований із залишку п'ятиуглецевого цукру – пентози, несе фосфатну групу на гідроксильній групі п'ятого вуглецевого атома (складноєфірний зв'язок) і азотисту основу при першому вуглецевому атомі (N-глікозидний зв'язок). Головна хімічна відмінність між ДНК і РНК полягає в тому, що цукровий залишок мономера РНК – це рибоза, а мономера ДНК – дезоксирибоза, що являється похідним рибози, в якому відсутня гідроксильна група при другому вуглецевому атомі (рис. 9).

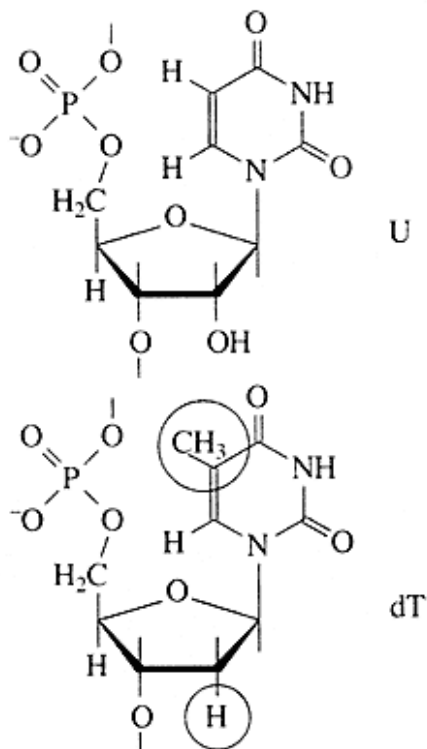


Рис. 9. Хімічні формули залишків одного з рибонуклеотидів – уридилової кислоти (U) і гомологічного йому дезоксирибонуклеотиду – тимідилової кислоти (dT)

Азотистих основ і в ДНК, і в РНК чотири види: два пуринових – аденін (A) і гуанін (G) та два піримідинових – цитозин (C) і урацил (U) або його метильоване похідне тимін (T). Урацил характерний для мономерів РНК, а тимін – для мономерів ДНК, і це друга відмінність РНК і ДНК. Мономери – рибонуклеотиди РНК або дезоксирибонуклеотиди ДНК – утворюють полімерний ланцюг за допомогою формування фосфодієфірних містків між цукровими залишками (між п'ятим і третім атомами вуглецю пентози). Таким чином, полімерний ланцюг нуклеїнової кислоти – ДНК або РНК – може бути представлений як лінійний цукро-фосфатний остов із азотистими основами як бічними групами.

Макромолекулярна структура РНК

Принципова макроструктурна відмінність двох типів нуклеїнових кислот полягає в тому, що ДНК – це єдина подвійна спіраль, тобто макромолекула з двох комплементарно пов'язаних полімерних тяжів, спірально закручених навколо загальної осі, а РНК – однотяжевий полімер. У той же час взаємодії бічних груп – азотистих основ – один з одним, а також з фосфатами і гідроксилами цукро-фосфатного остову призводять до того, що однотяжевий полімер РНК згортається на себе і скручується в компактну структуру, подібно до згортання поліпептидного ланцюга білку в компактну глобулу. У такий спосіб унікальні нуклеотидні послідовності РНК можуть формувати унікальні просторові структури.

Уперше специфічна просторова структура РНК була продемонстрована при розшифровці атомної структури однієї з тРНК у 1974 р. (рис. 10). Згортання полімерного ланцюга тРНК, що складається з 76 нуклеотидних мономерів, призводить до формування дуже компактного глобулярного ядра, з якого під прямим кутом стирчать два виступи. Вони є короткими подвійними спіралями за типом ДНК, але організовані за рахунок взаємодії ділянок одного і того ж ланцюга РНК. Один з виступів є акцептором амінокислоти і бере участь в синтезі поліпептидного ланцюга білку на рибосомі, а інший призначений для взаємодії комплементу з кодуючим триплетом (кодоном) мРНК у тій же рибосомі. Тільки така структура здатна специфічно взаємодіяти з білком-ферментом, що навішує амінокислоту на тРНК, і з рибосомою в процесі трансляції, тобто специфічно "пізнаватися" ними.



Рис. 10. Атомна (ліворуч) і скелетна (праворуч) моделі фенілаланінової тРНК дріжджів

Вивчення ізольованих рибосомних РНК дало наступний разючий приклад формування компактних специфічних структур з ще довших лінійних полімерів цього типу. Рибосома складається з двох нерівних частин – великої і малої рибосомних субчастинок (субодиниць). Кожна субчастка побудована з однієї високополімерної РНК і цілого ряду різноманітних рибосомних білків. Довжина ланцюгів рибосомних РНК дуже значна: так, РНК малої субчастки бактерійної рибосоми містить більше 1500 нуклеотидів, а РНК великої субчастки – близько 3000 нуклеотидів. У ссавців, включаючи людину, ці РНК ще більше – близько 1900 нуклеотидів і більше 5000 нуклеотидів у малій і великій субчастках відповідно.

Було показано, що ізольовані рибосомні РНК, відокремлені від їх білкових партнерів і отримані в чистому вигляді, самі здатні спонтанно згортатися в компактні структури, по своїх розмірах і формі схожі на рибосомні субчастки. Форма великої і малої субчастинок різна, і відповідно розрізняється форма великої і малої рибосомних РНК (рис. 11). Таким чином, лінійні ланцюги рибосомної РНК самоорганізуюватимуться в специфічні просторові структури, що визначають розміри, форму і, мабуть, внутрішній устрій рибосомних субчастинок, а отже, і усієї рибосоми.

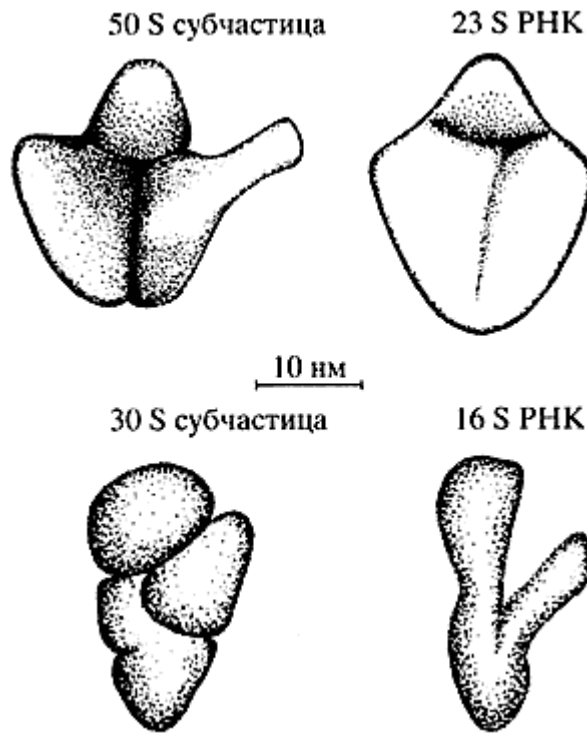


Рис. 11. Порівняння контурів рибосомних субчастинок бактерій і їх ізольованих високополімерних РНК у компактній формі за даними електронної мікроскопії: вгорі – велика субчастика і її РНК; внизу – мала субчастика і її РНК

Міnorні РНК

У міру вивчення компонентів живої клітини і окремих фракцій тотальною клітинною РНК з'ясовувалося, що трьома головними видами РНК справа не обмежується. Виявилось, що в природі існує безліч інших видів РНК. Це, в першу чергу, так звані "малі РНК", які містять до 300 нуклеотидів, часто з невідомими функціями. Як правило, вони асоційовані з одним або декількома білками і представлені в клітині у вигляді рибонуклеопротейдів – "малих РНП".

Мікро РНК є присутніми в усіх відділах клітини, включаючи цитоплазму, ядро, ядерце, мітохондрії. Велика частка тих малих РНП, функції яких відомі, бере участь у механізмах обробки посттранскрипції головних видів РНК (RNA processing) – перетворенні попередників мРНК в зрілі мРНК (сплайсинг), редагуванні мРНК, біогенезі тРНК, дозріванні рибосомних РНК. Один з найбагатше представлених у клітинах видів малих РНП (SRP) грає ключову роль у транспорті білків, що синтезуються, через клітинну мембрану. Відомі види малих РНК, що виконують регуляторні функції в трансляції. Спеціальна мала РНК входить до складу найважливішого ферменту, відповідального за підтримку редуплікації ДНК в поколіннях клітин – *теломерази*. Слід сказати, що їх молекулярні розміри порівнянні з розмірами клітинних глобулярних білків. Таким чином, поступово стає зрозумілим, що функціонування живої клітини визначається не лише різноманіттям білків, що синтезуються в ній, але і присутністю багатого набору різноманітних РНК, з яких малі РНК значною мірою імітують компактність і розміри білків.

Рибозими

Усе активне життя побудоване на обміні речовин – метаболізмі, і усі біохімічні реакції метаболізму відбуваються з належними для забезпечення життя швидкостями тільки завдяки вискоєфективним специфічним каталізаторам, створеним еволюцією. Упродовж багатьох десятиліть біохіміки були упевнені, що біологічний каталіз завжди і усюди здійснюється білками, званими ферментами, або ензимами. І ось в 1982-1983 рр.

було показано, що в природі є види РНК, які, подібно до білків, мають високоспецифічну каталітичну активність. Такі РНК-каталізатори були названі *рибозимами* (рис. 12). Уявленню про винятковість білків в каталізі біохімічних реакцій настав кінець.

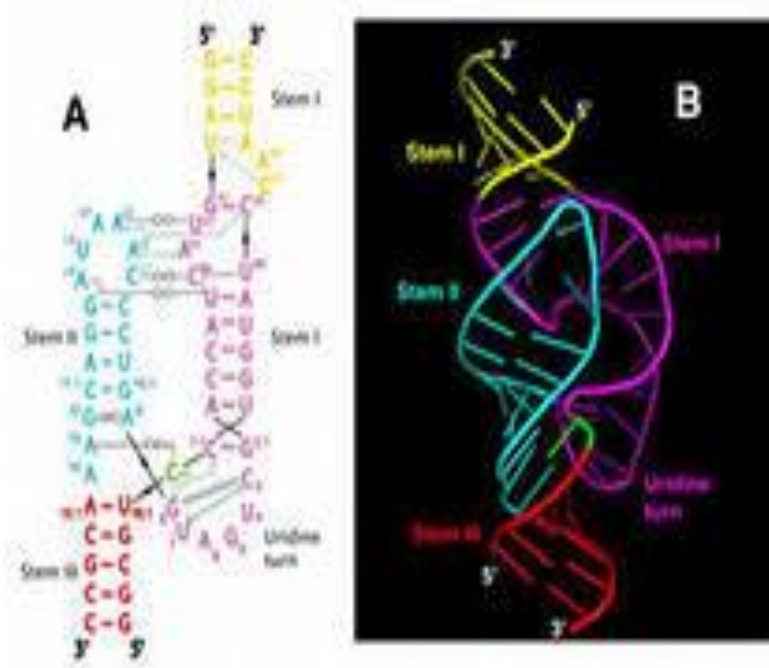


Рис. 12. Рибозими

Нині рибосому теж прийнято розглядати як рибозим. Дійсно, всі наявні експериментальні дані свідчать про те, що синтез поліпептидного ланцюга білку в рибосомі каталізується рибосомною РНК, а не рибосомними білками. Ідентифікована каталітична ділянка великою рибосомною РНК, відповідальна за каталіз реакції транспептидації, за допомогою якої здійснюється нарощування поліпептидного ланцюга білку в процесі трансляції.

Вірусні РНК

Окрім нуклеїнових кислот (ДНК і РНК), організуючих і обслуговуючих життя клітинних організмів, в природі існують паразитичні молекули ДНК і РНК. Одягнені в захисну білкову оболонку, вони називаються *вірусами* (рис. 13). Відповідно, віруси підрозділяються на:

- ДНК-утримуючі
- і
- РНК-утримуючі.

Власне в самих вірусних частках ніякого життя немає – це просто спосіб упаковки, консервації і поширення позаклітинної генетичної речовини (рис. 14). При потраплянні в живу клітину вірусна білкова оболонка скидається, а генетична речовина – нуклеїнова кислота – починає функціонувати як паразит, направляючи життя клітини на синтез білків, нею кодованих, і на реплікацію власне себе. Так зване "розмноження" вірусів в клітині є виробництво численних копій вірусною ДНК або РНК шляхом реплікації, з наступним їх "одяганням" в оболонку із синтезованих клітиною вірусних білків.

Що стосується реплікації вірусної ДНК, то її механізм мало чим відрізняється від редуплікації генетичного матеріалу – ДНК – самої клітини. У разі ж вірусних РНК реалізуються процеси, які пригнічені або зовсім відсутні в нормальних клітинах, де уся РНК синтезується тільки на ДНК як на матриці. При інфекції РНК-утримуючими вірусами ситуація може бути подвійною. В одних випадках на вірусній РНК як на матриці синтезується ДНК ("зворотна транскрипція"), а вже на цій ДНК транскрибуються численні копії вірусною РНК. У інших, найцікавіших для нас випадках, на вірусній РНК

синтезується ланцюг комплементу РНК, яка і служить матрицею для синтезу – реплікації – нових копій вірусної РНК. Таким чином, при інфекції РНК-утримуючими вірусами реалізується принципова здатність РНК детермінувати відтворення своєї власної структури, як це має місце у ДНК.

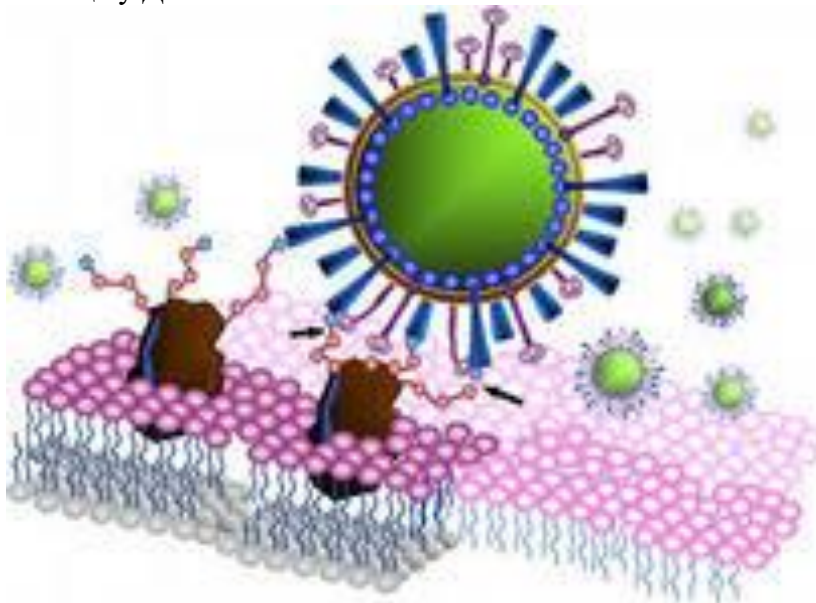


Рис. 13. Схеми вірусу та його функціонування

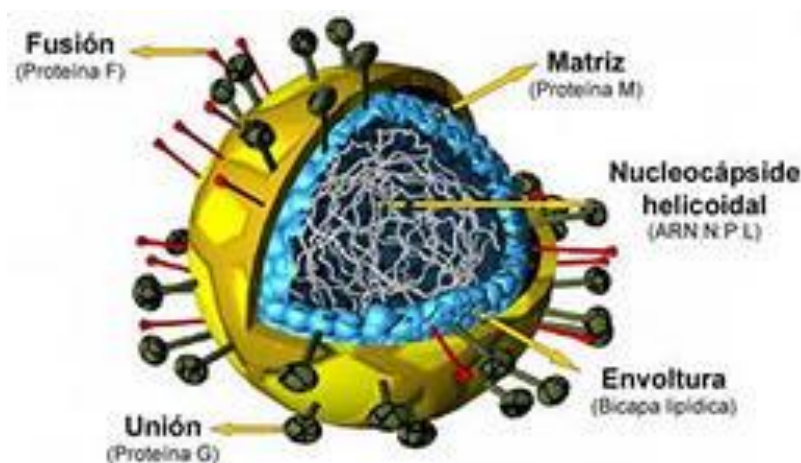


Рис. 14. Спосіб упаковки і консервації вірусу

До РНК-вмісних вірусів примикає інша група молекулярних паразитів – *віроїди* (рис. 15). Це патогенні РНК, такі, що не містять і не кодують ніяких білків, але теж здатні до реплікації в живих системах. Тим самим вірусні і віроїдні РНК демонструють здатність РНК не лише кодувати білки, але і виступати повноцінним генетичним матеріалом, що відтворюється. Віруси і віроїди часто розглядаються як еволюційні релікти, і процес реплікації РНК без участі ДНК може відбивати дуже ранній етап еволюції життя, коли ДНК ще не затвердилася як спеціалізована форма зберігання і відтворення генетичної інформації в поколіннях клітин.

Мультифункціональність РНК

Підсумовування і огляд знань про функції РНК дозволяють говорити про незвичайну багатофункціональність цього полімеру в живій природі. Можна дати наступний список основних відомих функцій РНК:

✓ *Генетична реплікативна функція*: структурна можливість копіювання (реплікації) лінійних послідовностей нуклеотидів через послідовності комплементу. Функція

реалізується при вірусних інфекціях і аналогічна головній функції ДНК в життєдіяльності клітинних організмів – редуплікації генетичного матеріалу;

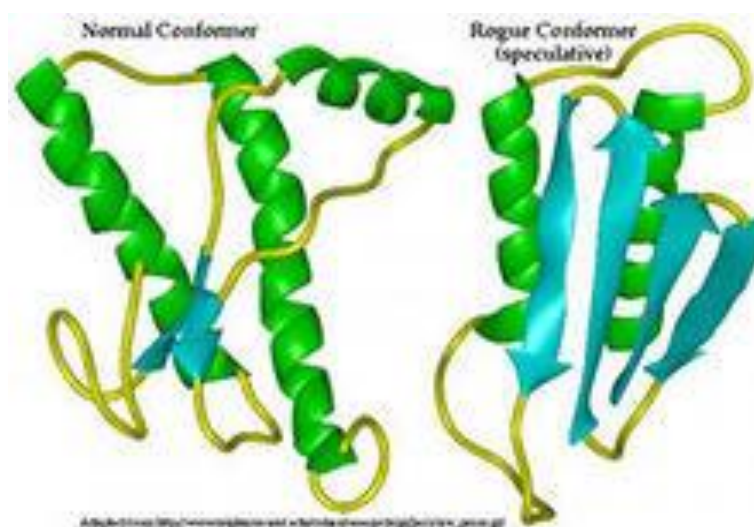


Рис. 15. Зчитування інформації у віроїда

✓ *Кодуюча функція*: програмування білкового синтезу лінійними послідовностями нуклеотидів. Це та ж функція, що і у ДНК. І у ДНК, і в РНК одні і ті ж триплети нуклеотидів кодують 20 амінокислот білків, і послідовність триплетів в ланцюзі нуклеїнової кислоти є програма для послідовного розставлення 20 видів амінокислот в поліпептидному ланцюзі білку;

✓ *Структуроутворююча функція*: формування унікальних тривимірних структур. Компактно згорнуті молекули малих РНК принципово подібні до тривимірних структур глобулярних білків, а довші молекули РНК можуть утворювати і більші біологічні частки або їх ядра;

✓ *Функція пізнавання*: високоспецифічні просторові взаємодії з іншими макромолекулами (у тому числі білками і іншими РНК; рис. 16) і з малими лігандами. Ця функція, мабуть, головна у білків. Вона заснована на здатності полімеру згортатися унікальним чином і формувати специфічні тривимірні структури. Функція пізнавання є базою специфічного каталізу;

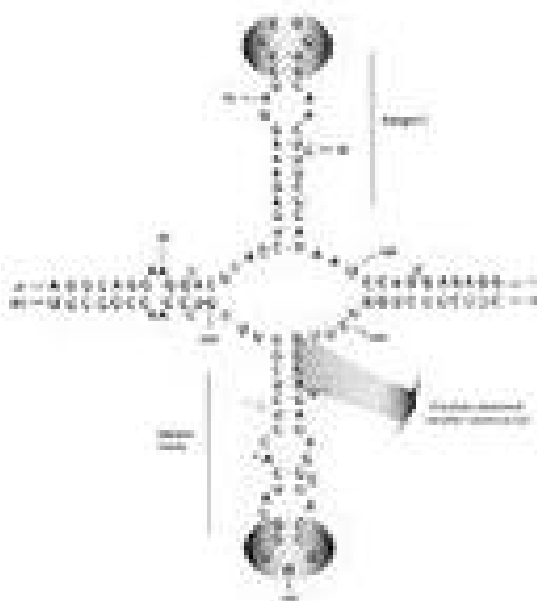


Рис. 16. Схема будови тРНК

✓ *Каталітична функція*: специфічний каталіз хімічних реакцій рибозимами. Ця функція аналогічна ензиматичній функції білків-ферментів.

У цілому РНК з'являється перед нами таким дивним полімером, що, здавалося б, ні часу еволюції Всесвіту, ні інтелекту Творця не повинно було б вистачити на її винахід. Як можна було бачити, РНК здатна виконувати функції обох принципово важливих для життя полімерів – ДНК і білків. Недивно, що перед наукою і постало питання: а не чи могло виникнення і самодостатнє існування світу РНК передувати появі життя в її сучасній ДНК-білковій формі?

Синтез білків у клітині

Одним з найважливіших процесів, що протікають в клітині, є синтез білків. Кожна клітина містить тисячі білків, у тому числі і властивих тільки цьому виду клітин. Оскільки в процесі життєдіяльності усі білки рано чи пізно руйнуються, клітина повинна безперервно синтезувати білки для відновлення своїх мембран, органоїдів і т. ін. Крім того, багато клітин виготовляють білки для потреб усього організму, наприклад клітини залоз внутрішньої секреції – білкові гормони, що виділяють в кров. У таких клітинах синтез білку йде особливо інтенсивно.

Синтез білку вимагає великих витрат енергії. Джерелом цієї енергії, як і для усіх клітинних процесів, являється АТФ. Різноманіття функцій білків визначається їх первинною структурою, тобто послідовністю амінокислот в їх молекулі. У свою чергу спадкова інформація про первинну структуру білку знаходиться в послідовності нуклеотидів в молекулі ДНК (рис. 17).

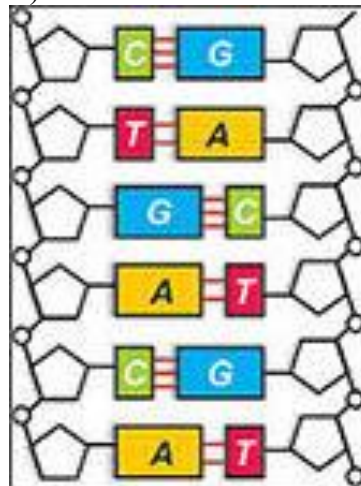


Рис. 17. Схема розміщення послідовностей нуклеотидів у ДНК

Ділянка ДНК, в якій міститься інформація про первинну структуру одного білку, називається *геном*. У одній хромосомі знаходиться інформація про структуру багатьох сотень білків. Кожній амінокислоті білку в ДНК відповідає послідовність з трьох розташованих один за одним нуклеотидів – *триплет*. До теперішнього часу складена карта генетичного коду, тобто відомо, які триплетні поєднання нуклеотидів ДНК відповідають тій або іншій з 20 амінокислот, що входять до складу білків (табл. 2).

Можливі 64 різних амінокислоти, проте як кодується тільки 20 амінокислот. Виявилось, що багатьом амінокислотам відповідає не один, а декілька різних триплетів – *кодонів*. Передбачається, що така властивість генетичного коду підвищує надійність зберігання і передачі генетичної інформації при діленні клітин. Наприклад, амінокислоті *аланіну* відповідають 4 кодони: ЦГА, ЦГГ, ЦТГ, ЦЦЦ, і виходить, що випадкова помилка в третьому нуклеотиді не може відбитися на структурі білку – все одно це буде кодон аланіну. Оскільки в молекулі ДНК містяться сотні генів, то до її складу обов'язково

входять триплети, «перепинання», що є «знаками», і що означають почало і кінець того або іншого гена.

Таблиця 2

Таблиця генетичного коду

Перша основа	Друга основа				Третя основа
	У	Ц	А	Г	
У	ФЕН	СЕР	ТИР	ЦИС	У
	ФЕН	СЕР	ТИР	ЦИС	Ц
	ЛЕЙ	СЕР	Стоп-кодон	Стоп-кодон	А
	ЛЕЙ	СЕР	Стоп-кодон	ТРИ	Г
Ц	ЛЕЙ	ПРО	ГІС	АРГ	У
	ЛЕЙ	ПРО	ГІС	АРГ	Ц
	ЛЕЙ	ПРО	ГЛН	АРГ	А
	ЛЕЙ	ПРО	ГЛН	АРГ	Г
А	ІЛЕ	ТРЕ	АСН	СЕР	У
	ІЛЕ	ТРЕ	АСН	СЕР	Ц
	ІЛЕ	ТРЕ	ЛІЗ	АРГ	А
	МЕТ	ТРЕ	ЛІЗ	АРГ	Г
Г	ВАЛ	АЛА	АСП	ГЛІ	У
	ВАЛ	АЛА	АСП	ГЛІ	Ц
	ВАЛ	АЛА	ГЛУ	ГЛІ	А
	ВАЛ	АЛА	ГЛУ	ГЛІ	Г

Дуже важлива властивість генетичного коду – *специфічність*, іншими словами, один триплет завжди означає тільки одну-єдину амінокислоту. Генетичний код *універсальний* для усіх живих організмів, від бактерій до людини.

Носієм усієї генетичної інформації є ДНК, розташована в ядрі клітини. Сам синтез білку відбувається в цитоплазмі клітини, на рибосомах. З ядра до цитоплазми інформація про структуру білку поступає у вигляді інформаційної РНК (іРНК). Для того, щоб синтезувати іРНК, ділянка ДНК "розмотується" (деспіралізується), а потім за принципом комплементу на одному з ланцюжків ДНК за допомогою ферментів синтезуються молекули РНК (рис. 18). Це відбувається таким чином: проти, наприклад, *гуаніну* молекули ДНК стає *цитозин* молекули РНК, проти *аденіну* молекули ДНК – *урацил* РНК, проти *тиміну* ДНК – *аденін* РНК і проти *цитозину* ДНК – *гуанін* РНК. Так само формується ланцюжок іРНК, що є точною копією іншого ланцюга ДНК (тільки тимін замінений на урацил). Таким чином, інформація про послідовність нуклеотидів якого-небудь гена ДНК "перепишується" в послідовність нуклеотидів іРНК. Цей процес дістав назву *транскрипції*. У прокаріот синтезовані молекули іРНК відразу ж можуть взаємодіяти з рибосомами, і починається синтез білку. В еукаріот іРНК взаємодіє в ядрі із спеціальними білками і переноситься через ядерну оболонку до цитоплазми.

У цитоплазмі обов'язково має бути набір амінокислот, необхідних для синтезу білку. Ці амінокислоти утворюються в результаті розщеплювання харчових білків. Крім того, та або інша амінокислота може потрапити до місця безпосереднього синтезу білку, тобто до рибосоми, тільки прикріплюється до спеціальної транспортної РНК (тРНК; див. рис. 16).

Для перенесення кожного виду амінокислот в рибосоми потрібний окремий вид тРНК. Оскільки до складу білків входить близько 20 амінокислот, існує стільки ж видів тРНК. Будова усіх тРНК схожа (рис. 19).

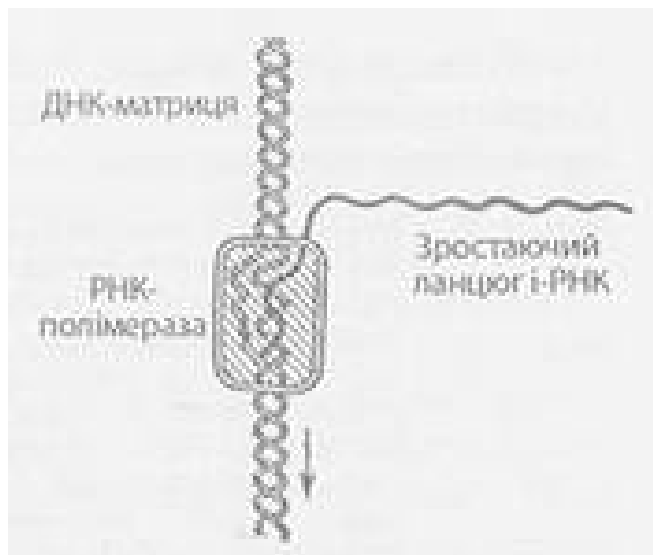


Рис. 18. Синтез іРНК

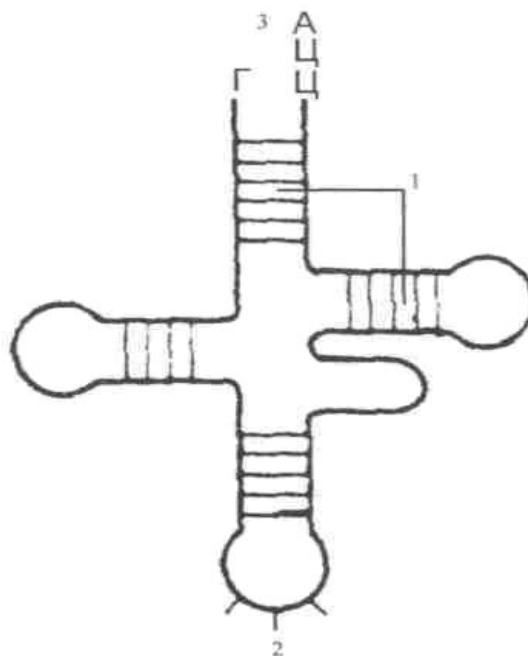


Рис. 19. Будова тРНК

(1 – водневі зв'язки, 2 – антикодон, 3 – акцепторна ділянка)

Їх молекули утворюють своєрідні структури, що нагадують за формою лист конюшини. Види тРНК обов'язково розрізняються за триплетом нуклеотидів, розташованому на "верхівці". Цей триплет, що дістав назву *антикодон*, за генетичним кодом відповідає тій амінокислоті, яку належить переносити цій тРНК. До "черешка листа" (*акцептор*) спеціальний фермент прикріплює обов'язково ту амінокислоту, яка кодується триплетом, комплементарним антикодону.

У цитоплазмі відбувається останній етап синтезу білку – *трансляція*. На той кінець іРНК, з якого треба почати синтез білку, нанизується рибосома (рис. 20).

Рибосома переміщається по молекулі іРНК переривчасто, "стрибками", затримуючись на кожному триплеті приблизно 0,2 с. За цю мить одна тРНК з багатьох здатна "впізнати" своїм антикодоном триплет, на якому знаходиться рибосома. І якщо антикодон комплементарний цьому триплету іРНК, амінокислота від'єднується від "черешка листа" і приєднується пептидним зв'язком до зростаючого білкового ланцюжка. У цей момент рибосома зрушується по іРНК на наступний триплет, що кодує чергову

амінокислоту білку, що синтезується, а чергова тРНК "підносить" необхідну амінокислоту, що нарощує ланцюжок білку. Ця операція повторюється стільки разів, скільки амінокислот повинен містити білок, що "будується". Коли в рибосомі опиняється один з триплетів, що є "стоп-сигналом" між генами, то жодна іРНК до такого триплета приєднатися не може, оскільки антикодонів до них у тРНК не буває. У цей момент синтез білку закінчується. Усі описувані реакції відбуваються за дуже короткі проміжки часу. Підраховано, що на синтез досить великої молекули білку йде всього біля двох хвилин.

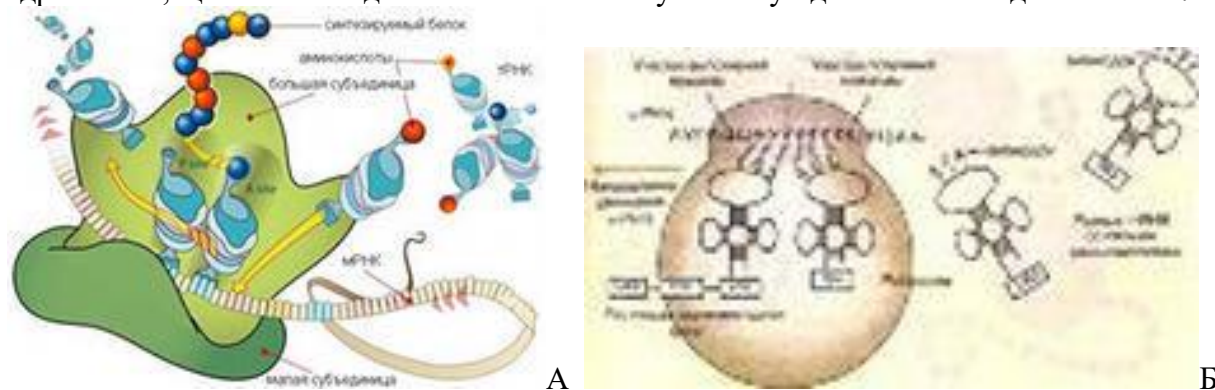


Рис. 20. Схема трансляції спадкової інформації
(А – просторова модель, Б – принципова модель)

Клітині необхідна не одна, а багато молекул кожного білку. Тому як тільки рибосома, що почала синтез першого білка на іРНК просунеться вперед, за нею на ту ж іРНК нанизується інша рибосома, що синтезує той самий білок. Потім на іРНК послідовно нанизується третя, четверта рибосоми і так далі. Усі рибосоми, що синтезують один і той же білок, закодований в цій іРНК, називаються *полісомами*. Коли синтез білку закінчений, рибосома може знайти іншу іРНК і почати синтезувати той білок, структура якого закодована в новій іРНК. Таким чином, *трансляція* – це переклад послідовності нуклеотидів молекули іРНК у послідовність амінокислот білку, що синтезується. Підраховано, що усі білки організму ссавця можуть бути закодовані усього 2% ДНК, що міститься в його клітинах. Для чого ж потрібна інша 98% ДНК? Виявляється, кожен ген влаштований набагато складніше, ніж вважали раніше, і містить не лише ту ділянку, в якій закодована структура якого-небудь білку, але і спеціальні ділянки, здатні "включати" або "вимикати" роботу кожного гена. Ось чому усі клітини, наприклад, людського організму, що мають однаковий набір хромосом, здатні синтезувати різні білки: в одних клітинах синтез білків йде за допомогою одних генів, а в інших – задіяні зовсім інші гени. Отже, в кожній клітині реалізується тільки частина генетичної інформації, що міститься в її генах. Синтез білку вимагає участі великого числа ферментів.

Біосинтез білку

Одному із завдань сучасної біології і її новітніх розділів – молекулярної біології, біоорганічної хімії, фізико-хімічної біології являється розшифровка механізмів синтезу молекули білку, що містить сотні, а іноді і тисячі залишків амінокислот. Механізм синтезу повинен мати точну кодуєчу систему, яка автоматично програмує включення кожного амінокислотного залишку в певне місце поліпептидного ланцюга. Кодуюча система визначає первинну структуру, а вторинна і третинна структури білкової молекули визначаються фізико-хімічними властивостями і хімічною будовою амінокислот.

Первинні уявлення, згідно з якими синтез білку можуть каталізувати ті ж протеолітичні ферменти, що викликають його гідроліз, але шляхом оборотності хімічної реакції, не підтвердилися. Виявилось, що синтетичні і катаболічні реакції протікають не лише різними шляхами, але і в різних субклітинних фракціях. Не підтвердилася так само гіпотеза про попередній синтез коротких пептидів з їх наступним об'єднанням в єдиний поліпептидний ланцюг. Правильнішим виявилось припущення, що для синтеза білку

необхідні джерела енергії, наявність активованих вільних амінокислот і декілька видів нуклеїнових кислот.

До сучасних уявлень про механізм синтезу білку великий вклад внесли радянські біохіміки. Так, в лабораторії А.Е. Браунштейна було уперше вказане на участь АТФ в синтезі квазіпептидних зв'язків. В.Н. Ореховичем ще 50-і роки було показано, що перенесення аміноцільних або пептидильних угруповань на NH_2 групу амінокислот може здійснюватися не лише з амідного або пептидного, але і з складноефірного зв'язку. Як буде показано нижче, саме цей механізм лежить підґрунтям реакції транспептидування в 50S рибосомі у стадії елонгації синтезу білку.

Значно пізніше було отримано докази, що в синтезі білку, що протікає переважно в цитоплазмі, вирішальну роль відіграють нуклеїнові кислоти, зокрема ДНК. Після того, як було встановлено, що ДНК є носієм і ошадником спадкової інформації, було поставлено питання про те, яким чином ця генетична інформація, записана (зашифрована) у хімічній структурі ДНК, трансформується в фенотипічні ознаки і функціональні властивості живих організмів, що передаються у спадок. Нині можна дати однозначну відповідь на це питання: *генетична інформація програмує синтез специфічних білків, що визначають у свою чергу специфічність структури і функції клітин, органів і цілісного організму!* У природі, як відомо, існують два типи біополімерних макромолекул, так звані неінформативні біополімери і інформативні біополімери, що несуть первинну генетичну інформацію і вторинну генетичну, точніше фенотипічну інформацію. Ці загальні представлення можуть бути виражені наступною послідовністю подій (потік інформації):

ДНК → РНК → Білок → Клітина → Організм

Біосинтез білку, хоча безпосередньо і регулюється рибонуклеїновими кислотами, опосередковано пов'язаний з контролюючим впливом ДНК ядра і що РНК спочатку синтезується в ядрі, потім поступає до цитоплазми, де виконує роль матриці в синтезі білку. Отримані значно пізніше експериментальні дані підтвердили гіпотезу про те, що основною функцією нуклеїнових кислот є не лише зберігання генетичної інформації, але і реалізація цієї інформації шляхом програмованого синтезу специфічних білків.

Проте в цій послідовності «ДНК → РНК → Білок» бракувало інформації про те, яким чином відбуваються розшифровка спадкової інформації і синтезу специфічних білків, що визначають різноманіття ознак живих істот. Нині з'ясовані основні процеси, за допомогою яких здійснюється передача спадкової інформації і вони включають:

- × *реплікацію* – тобто синтез ДНК на матриці ДНК,
- × *транскрипцію* – тобто переклад мови і типу будови ДНК на молекулу РНК і
- × *трансляцію* – процес, в якому генетична інформація, що міститься в молекулі мРНК, направляє синтез відповідної амінокислотної послідовності в білку.

Багато тонких механізмів транскрипції остаточно не з'ясовано.

Отримано експериментальні докази наявності ДНК, також, у мітохондріях. Вона не гомологічна і не комплементарна ядерної ДНК. Передбачається, що мітохондріальна ДНК кодує синтез частини структурних білків самих мітохондрій.

В обміні речовин організму провідна роль належить білкам і нуклеїновим кислотам. Білкові речовини складають основу усіх життєво важливих структур клітини, вони входять до складу цитоплазми. Білки мають надзвичайно високу реакційну здатність. Вони наділені каталітичними функціями, тобто є ферментами, тому білки визначають напрям, швидкість і щонайтіснішу узгодженість, зв'язаність усіх реакцій обміну речовин.

Провідна роль білків в явищах життя пов'язана з багатством і різноманітністю їх хімічних функцій, з винятковою здатністю до різних перетворень і взаємодій з іншими простими і складними речовинами, що складають структуру цитоплазми.

Нуклеїнові кислоти входять до складу найважливішого органу клітини – ядра (хромосом і каріоплазми), а також цитоплазми, рибосом, мітохондрій і центріолей, пластид (у рослинних організмах). Нуклеїнові кислоти відіграють важливу, первинну роль у спадковості, мінливості організму, в синтезі білку.

Процес синтезу білку є дуже складним багатоступінчастим процесом. Здійснюється він у спеціальних органелах – рибосомах. У клітині міститься велика кількість рибосом. Наприклад, у кишкової палички їх близько 20 000.

Яким чином відбувається синтез білку в рибосомах?

Молекули білків по суті є поліпептидними ланцюжками, складеними з окремих амінокислот. Але амінокислоти недостатньо активні, щоб з'єднатися між собою самостійно. Тому, перш ніж з'єднатися один з одним і утворити молекулу білку, амінокислоти повинні активуватися. Ця активація відбувається під дією особливих ферментів. Причому кожна амінокислота має свій, специфічно налаштований на неї фермент.

Джерелом енергії для цього (як і для багатьох процесів у клітині) служить аденозинтрифосфат (АТФ). У результаті активування амінокислота стає більше лабільною і під дією того ж ферменту зв'язується з тРНК.

Важливим є те, що кожній амінокислоті відповідає суворо специфічна тРНК. Вона знаходить "свою" амінокислоту і переносить її в рибосому. Тому така РНК і дістала назву *транспортною*.

Отже, в рибосому поступають різні активовані амінокислоти, сполучені зі своїми тРНК. Рибосома є як би конвеєром для збирання ланцюжка білку з різних амінокислот (рис. 21), що поступають до неї.

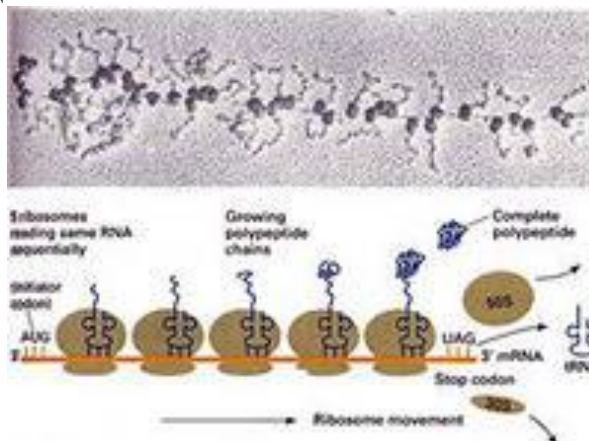


Рис. 21. Конвеєрний принцип дії рибосом під час біосинтезу білку

Виникає питання: від чого залежить порядок зв'язування між собою окремих амінокислот? Адже саме цей порядок і визначає, який білок буде синтезований в рибосомі, оскільки від порядку розташування амінокислот у білку залежить його специфіка. В клітині міститься більше 2000 різних за будовою і властивостям специфічних білків.

Виявляється, що одночасно з тРНК, на якій "сидить" своя амінокислота, в рибосому поступає "сигнал" від ДНК, яка міститься в ядрі. Відповідно до цього сигналу в рибосомі синтезується той або інший білок, той або інший фермент (оскільки ферменти є білками). Направляючий вплив ДНК на синтез білку здійснюється не безпосередньо, а за допомогою особливого посередника, тієї форми РНК, яка дістала назву *матричної* або *інформаційної* РНК (мРНК або іРНК).

Інформаційна РНК синтезується в ядрі під впливом ДНК, тому її склад повторює (копіює) склад ДНК. Молекула РНК як би є зліпком з форми ДНК. Синтезована іРНК поступає до рибосоми і як би передає цій структурі план – в якому порядку повинні з'єднуватися один з одним активовані амінокислоти, що поступили в рибосому, щоб синтезувався певний білок. Інакше, генетична інформація, закодована в ДНК, передається на іРНК і далі на білок. Молекула інформаційної РНК поступає в рибосому і як би прошиває її. Той її відрізок, який знаходиться в даний момент у рибосомі, визначений кодоном (*триплет*), взаємодіє абсолютно специфічно з відповідним до нього по будові

триплетом (*антикодоном*) у транспортній РНК, яка принесла в рибосому амінокислоту. Транспортна РНК зі своєю амінокислотою підходить до певного кодону іРНК і з'єднується з ним; до наступної, сусідньої ділянки іРНК приєднується інша тРНК з іншою амінокислотою і так далі, до тих пір, поки не буде перелічений увесь ланцюжок іРНК і доки не нанижуться усі амінокислоти у відповідному порядку, утворюючи молекулу білку. А тРНК, яка доставила амінокислоту до певної ділянки поліпептидного ланцюга, звільняється від своєї амінокислоти і покидає рибосому. Потім знову в цитоплазмі до неї може приєднатися потрібна амінокислота, і вона знову перенесе її в рибосому. В процесі синтезу білка бере участь одночасно не одна, а декілька рибосом – *полірибосоми*.

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

В організмів, що мають ядро (тварини, рослини), транскрипція і трансляція суворо розподілені в просторі і часі: синтез різних РНК відбувається в ядрі, після чого молекули РНК повинні покинути межі ядра, пройшовши через ядерну мембрану (рис. 22). У подальшому в цитоплазмі РНК транспортуються до місця синтезу білка – рибосомам. Лише після цього настає наступний етап – трансляція. У бактерій, ядерна речовина в яких не відокремлена від цитоплазми мембраною, транскрипція і трансляція відбуваються одночасно.

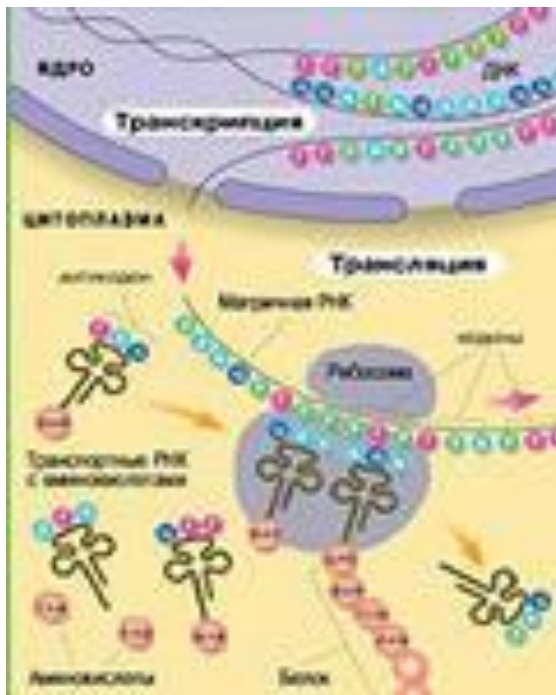


Рис. 22. Проходження зрілої іРНК скрізь каріоболонку та синтез з неї білка

Сучасні схеми, що ілюструють роботу генів, побудовані на підставі логічного аналізу експериментальних даних, отриманих за допомогою біохімічних і генетичних методів. Застосування тонких електронно-мікроскопічних методів дозволяє в буквальному розумінні слова побачити роботу спадкового апарату клітини. Останнім часом отримані електронно-мікроскопічні знімки, на яких видно, як на матриці бактеріальної ДНК, у тих ділянках, де до ДНК прикріплені молекули РНК-полімерази (ферменту, що каталізує транскрипцію ДНК в РНК), відбувається синтез молекул іРНК. Нитки іРНК, розташовані перпендикулярно до лінійної молекули ДНК, просуваються уздовж матриці і збільшуються в довжину. У міру подовження ниток РНК до них приєднуються рибосоми, які, просуваючись, у свою чергу, уздовж нитки РНК у напрямку до ДНК, ведуть синтез білку.

З усього сказаного виходить, що місцем синтезу білків і усіх ферментів у клітині є рибосоми. Іншими словами це, як би "фабрики" білку, або складально-збиральний цех, куди поступають усі матеріали, необхідні для збирання поліпептидного ланцюжка білку з амінокислот. Природа ж білку, що синтезується, залежить від будови іРНК, від порядку розташування в ній нуклеотидів, а будова іРНК копіює будову ДНК, так що зрештою специфічна будова білку, тобто порядок розташування в ньому різних амінокислот, залежить від порядку розташування нуклеотидів у ДНК, від будови ДНК.

Викладена теорія біосинтезу білку дістала назву *матричної теорії*. Матричною ця теорія називається тому, що нуклеїнові кислоти грають ніби роль матриць, в яких записана уся інформація відносно послідовності амінокислотних залишків у молекулі білку. Створення матричної теорії біосинтезу білку і розшифровка амінокислотного коду є найбільшим науковим досягненням ХХ століття, найважливішим кроком на шляху до з'ясування молекулярного механізму спадковості.

Значний вклад в сучасні уявлення про місце, чинники і механізм синтезу білку внесли дослідження Т. Касперсона, П. Берга, П. Замечника, С. Очоа, А.А.Басва, А.С.Спирина та ін.

Генетичний код і його властивості

Необхідність кодування структури білків лінійної послідовності нуклеотидів мРНК і ДНК продиктовані тим, що в ході трансляції:

- Немає відповідності між числом номерів в матриці мРНК і продукті – білку, що синтезується;
- Відсутня структурна схожість між мономерами РНК і білка.

Це виключає компліментарну взаємодію між матрицею і продуктом – принцип, згідно якого здійснюється побудова нових молекул ДНК і РНК, під час реплікації і транскрипції. Звідси стає зрозуміло, що повинен існувати "словник", що дозволяє з'ясувати, яка послідовність нуклеотидів мРНК забезпечує включення в білок амінокислот в заданій послідовності. Цей "словник" дістав назву *генетичного (біологічного, нуклеотидного або амінокислотного) коду* (рис. 23). Він дозволяє шифрувати амінокислоти, що входять до складу білків, за допомогою певної послідовності нуклеотидів у ДНК і мРНК. Для нього характерні певні властивості.

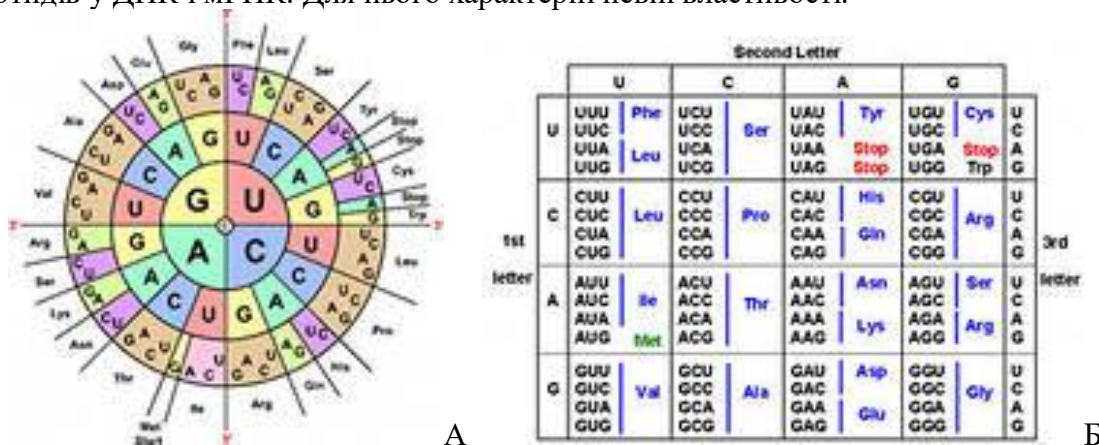


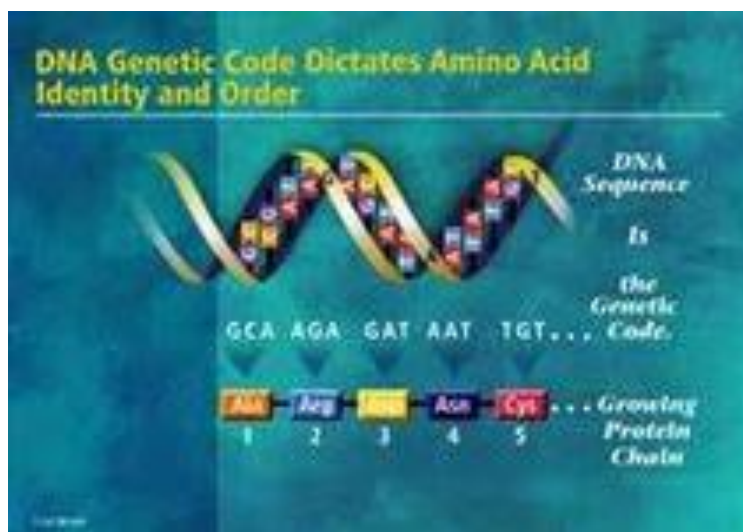
Рис. 23. Генетичний код

(А – радіальна форма запису, Б – діагональна форма запису)

Триплетність

Одним з основних питань при з'ясуванні властивостей коду було питання про число нуклеотидів, яке повинне визначати включення в білок однієї амінокислоти. Відразу було зрозуміло, що це число не може бути рівним 1 або 2, оскільки в цьому випадку кількість кодуючих елементів буде недостатньо для шифрування 20 амінокислот у білках. Число кодуючих послідовностей з чотирьох нуклеотидів по три рівне $4^3=64$, що більш ніж в 3 рази перевищує мінімальну кількість, яка потрібна для кодування 20 амінокислот. Надалі

було встановлено, що кодуєчими елементами в шифруванні амінокислотної послідовності дійсно є трійки нуклеотидів або триплети, які дістали назву "кодони" (рис. 24).



		Second Base				
		U	C	A	G	
First Base	U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC Cys UGA Stop UGG Trp	Third Base U C A G U C A G U C A G
	C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Glu CAG Glu	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	
	A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met (start)	ACU Thr ACC Thr ACA Thr AUG Met (start)	AAG Lys AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AUG Lys AUA Ile AUA Ile AUG Lys	
	G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	

Б

Рис. 24. Порядок використання нуклеотидів у шифрі генетичного коду

Сенс кодонів

Сенс кодонів став зрозумілий в 60-х рр. XX століття, коли використовуючи безклітинну систему синтезу білків і синтетичні полірибонуклеотиди із заданою послідовністю нуклеотидів як матриця, М. Ниренберг і Г. Маттей синтезували поліпептиди певної будови. Так, на матриці полі-У, що складається тільки із залишків УУУ, був отриманий поліфенілаланін, а на матриці полі-Ц – поліпролін. З цього виходило, що триплет – УУУ кодує Фен, а триплет – ССС → Про.

У наступних експериментах використовували змішані синтетичні полірибонуклеотиди з відомим складом. У результаті цієї роботи вдалося встановити, що з 64 кодонів включення амінокислот у поліпептидний ланцюг, що синтезується, шифрує 61 триплет, а 3 інших UAA, UAG, UGA не кодують включення до білка амінокислот і спочатку були названі *безглуздими*, або *нонсенкодонами*. Проте надалі було показано, що ці триплети сигналізують про завершення трансляції, і тому їх стали називати *термінуючими*, або *стоп-кодонами*.

Кодони мРНК і триплети нуклеотидів у кодуючій нитці ДНК з напрямом від 5'- до 3'-кінцю мають однакову послідовність азотистих основ, за винятком того, що в ДНК замість урацила (U), характерного для мРНК, існує тимін (T).

Специфічність

Кожному кодону відповідає лише одна певна амінокислота. У цьому сенсі генетичний код суворо однозначний.

Виродженість

У мРНК і ДНК має сенс 61 триплет, кожен з яких кодує включення в білок однієї з 20 амінокислот. З цього виходить, що в інформаційних молекулах включення в білок однієї і тієї ж амінокислоти визначає декілька кодонів. Це властивість біологічного коду дістала назву *виродженості*. У людини одним кодоном зашифровано тільки 2 амінокислоти – Мет і Три, проте як Лей, Сер і Арг – шістьма кодонами, а Вал, Глі, Про, Тре – чотирма кодонами.

Надмірність кодуючих послідовностей – цінна властивість, оскільки вона підвищує стійкість інформаційного потоку до несприятливих дій зовнішнього і внутрішнього середовища. При визначенні природи амінокислоти, яка має бути поміщена в білок, третій нуклеотид в кодоні не має такого важливого значення, як перші два. Для багатьох амінокислот заміна нуклеотиду у третій позиції кодону не позначається на його сенсі.

Лінійність запису інформації

У ході трансляції кодони мРНК "читаються" з фіксованої стартової точки послідовно і не перекриваються. У записі інформації відсутні сигнали, що вказують на кінець одного кодону і початку наступного. Кодон AUG є таким, що ініціює і прочитується тільки на початку, так і в інших ділянках мРНК як Мет. Триплети, що йдуть за ним, читаються послідовно без яких або пропусків аж до стоп-кодона, на якому синтез поліпептидного ланцюга завершується.

Універсальність

До недавнього часу вважалося, що код абсолютно універсальний, тобто сенс кодових слів однаковий для усіх вивчених організмів: вірусів, бактерій, рослин, земноводних, ссавців, включаючи людину. Проте пізніше стало відоме одне виключення. Здавалося, що мітохондріальна мРНК містить 4 триплети, що мають інше значення, ніж в мРНК ядерного походження. Так, у мРНК мітохондрій триплет UGA кодує Три, AUA – Мет, коли AGA і AGG причитуються як додаткові стоп-кодони.

Колінеарність гена і продукту

У прокариотів виявлена лінійна відповідність послідовності кодонів гена і послідовності амінокислот у білковому продукті, або, як то кажуть, існує *колінеарність* гена і продукту. В еукаріотів послідовності основ у гені, колінеарні амінокислотній послідовності в білці, уриваються інтронами. Тому в еукаріотичних клітинах амінокислотна послідовність білку колінеарна послідовності екзонів у гені або зрілій мРНК, а потім постраскрипційного видалення інтронів.

Основні компоненти білоксинтезуючої системи

Для синтезу поліпептидного ланцюга необхідна велика кількість компонентів, спільна і узгоджена взаємодія яких призводить до утворення білку.

Амінокислоти

Усі 20 амінокислот, що входять до структури білків організму людини, мають бути присутніми в достатній кількості. Ця вимога передусім відноситься до незамінних (тих, що не синтезуються в організмі) амінокислот, оскільки недостатнє постачання клітини хоч би однією незамінною амінокислотою призводить до зниження, а іноді і повній зупинці синтезу білку на кодоні, що вимагає включення цієї амінокислоти в білок.

Транспортна РНК

У лабораторії Хогланда було з'ясоване, що при інкубації ^{14}C -амінокислоти з розчинною фракцією цитоплазми в присутності АТФ і наступним додаванням трихлороцетової кислоти в білковому осаді, що утворився, мітка не відкривається. Було зроблено припущення, що мічена амінокислота не включається в білкову молекулу. Мітка виявилася ковалентно пов'язаною з РНК, що міститься в білковому фільтраті. Показано, що РНК, до якої приєднується мічена амінокислота, має невелику молекулярну масу і зосереджена в розчинній фракції, тому її спочатку назвали розчинною, а пізніше адаптерною або транспортною РНК (рис. 25). На долю тРНК доводиться близько 10-15 % загальної кількості клітинної РНК. До теперішнього часу відкрито більше 60 різних тРНК. Для кожної амінокислоти в клітині є принаймні одна специфічна РНК (для ряду амінокислот відкрито більше за одну, зокрема для серину – 5 різних тРНК, для лізину і гліцину – по 4 різних тРНК, хоча і в цьому випадку кожна тРНК пов'язана із специфічною аміноацил-тРНК-синтетазою). Молекулярна маса більшості тРНК коливається від 24000 до 29000. Так, вони містять від 75 до 85 нуклеотидів. Амінокислоти приєднуються до вільної 3'-ОН-групи кінцевого мононуклеотида, представленого в усіх тРНК АМФ, шляхом утворення ефірного зв'язку. Цікаво, що майже усі тРНК мають не лише індивідуально схожі функції, але і дуже схожу тривимірну структуру.

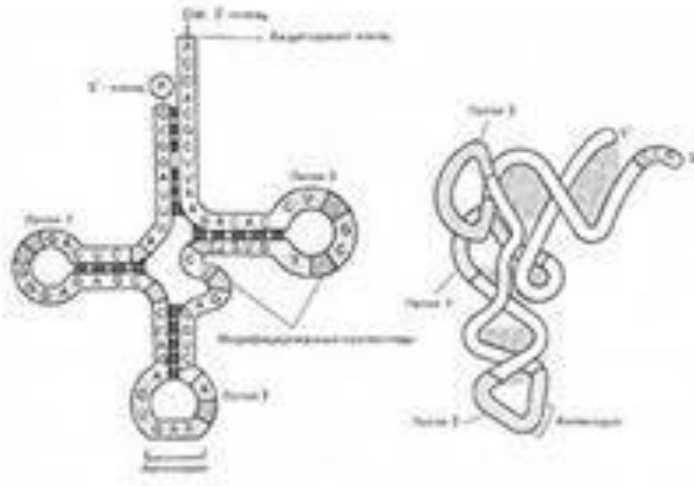


Рис. 25. Схема та конфігурація (структура) тРНК

Встановлена первинна структура майже усіх 60 відкритих тРНК; знання послідовності нуклеотидів і, отже, складу тРНК дало в руки дослідників багато цінних відомостей про біологічну роль окремих компонентів тРНК. Загальною для тРНК виявилася, також, нативна конформація, встановлена методом рентгеноструктурного аналізу і названа спочатку конформацією конюшиного листа; насправді ця конформація має неправильну, Г-подібну, форму.

Визначення структури тРНК дозволило виявити ряд відмітних ділянок. Так, на 3'-гідроксильному кінці розташовується однакова для усіх тРНК послідовність триплета ЦЦА-ОН, до якої приєднується за допомогою ефірного зв'язку специфічна амінокислота. Зв'язування в основному відбувається через 3'-ОН-групу кінцевого аденінового нуклеотиду, хоча отримані докази можливості приєднання амінокислоти і через 2'-ОН-групу. Тимідин-псевдоуридин-цитидилова петля, мабуть, забезпечує зв'язування аміноацил-тРНК з поверхнею рибосоми. Є крім того, додаткова петля, склад якої варіює у різних типів молекул тРНК; її призначення невідоме. Дігідроурідилова петля, з іншого боку, виявилася необхідною як сайт (місце) для пізнавання специфічним ферментом – аміноацил-тРНК-синтетазою. Є також антикодонова петля, що несе триплет – *антикодон*, і розташована на протилежному боці від того кінця, куди приєднується амінокислота. Антикодон є антипаралельним у своєму комплементі.

Ретельний аналіз нуклеотидної послідовності різних тРНК показав, що усі вони містять однаковий 5'-кінцевий нуклеотид – ГМФ з вільною 5'-фосфатною групою. *Адапторна функція* молекул тРНК полягає в зв'язуванні кожної молекули тРНК зі своєю специфічною функціональною амінокислотою. Але оскільки між нуклеїновою кислотою і специфічною функціональною групою амінокислоти не існує відповідності і спорідненості, цю функцію розпізнавання повинна виконувати білкова молекула, яка розрізняє як молекули специфічної тРНК, так і специфічної амінокислоти.

Матрична РНК

Вище було вказано на необхідність участі попередньо утвореної молекули РНК (рис. 26) для правильної розстановки амінокислот у поліпептидному ланцюзі. Було висловлено думку, що ця РНК, необхідна для зміни типу білку, що синтезується, повинна мати високу швидкість оновлення свого складу, тобто молекула такої РНК повинна синтезуватися і розпадатися з такою швидкістю, щоб забезпечити швидку оновлюваність нуклеотидного складу. Фактично ж рРНК позначилася метаболічно дуже стабільно, тому стало очевидним те, що вона не може відігравати роль матриці.

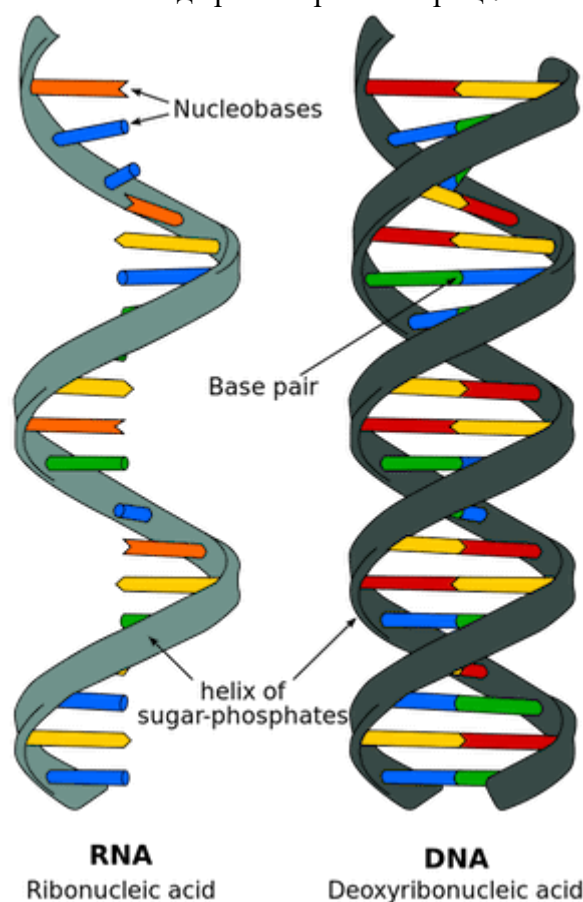


Рис. 26. Схема матричної РНК і відповідної до неї ДНК

У ряді лабораторій було отримано дані про існування в клітинах у з'єднанні з рибосомами короткоживучої РНК, названої інформаційної РНК; зараз вона позначається як матрична РНК, тому що її роль полягає в перенесенні інформації від ДНК в ядрі до цитоплазми, де вона з'єднується з рибосомами і служить матрицею, на якій відбувається синтез білку.

Ці досліді відкрили пряму дорогу для експериментальної розшифровки коду, за допомогою якого інформація від РНК передається на білки, що синтезуються. Послідовність нуклеотидів РНК реалізується в специфічній послідовності амінокислот поліпептидного ланцюга, що синтезується. Досліді Ніренберга свідчать також про те, що не рибосома і не рРНК є матрицею, на якій синтезуються специфічні білки, а цю роль виконують ті, що надходять ззовні матричні РНК. Отже, ДНК передає інформацію на

РНК, яка синтезується в ядрі і в подальшому потрапляє до цитоплазми. Тут РНК виконує матричну функцію для синтезу специфічної білкової молекули. Матрична гіпотеза синтезу білку, як і інших полімерних молекул ДНК і РНК, отримала нині повне підтвердження. Її правильність була доведена в експериментах, які забезпечували точне відтворення первинної структури полімерних молекул; причому цей синтез у відмінності від безладного хімічного синтезу відрізнявся не лише високою швидкістю і специфічністю, але і спрямованістю самого процесу, в суворій відповідності з програмою, записаною в лінійній послідовності молекули матриці.

Аміноацил-тРНК синтетази

У цитозолі клітин 20 різних амінокислот приєднуються α -карбоксильною групою до 3'-гідрофільного акцепторного кінця відповідних тРНК з утворенням складноефірного зв'язку. Ці реакції каталізує сімейство ферментів, що носять назву *аміноацил-тРНК синтетаз*. Кожен член цього сімейства дізнається тільки одну певну амінокислоту і ті тРНК, що здатні зв'язуватися з цією амінокислотою. З цього виходить, що до групи тРНК синтетаз входить 20 різних ферментів. Вони здійснюють активацію амінокислот у 2 стадії: на першій стадії амінокислота приєднується до ферменту і реагує з АТФ із утворенням багатого енергією проміжного з'єднання – *аміноацил-АМФ*. На другій стадії аміноацильний залишок аміноациладенілата, залишаючись пов'язаним з ферментом, взаємодіє з молекулою відповідної тРНК з утворенням аміноацил-тРНК.

Для кожної амінокислоти існує свій фермент – своя аміноацил-тРНК синтетаза: для глутамата – глутаміл-тРНК синтетаза, гістидину – гістиділ-тРНК синтетаза і так далі.

Амінокислоти приєднуються до 3'- або 2'-ОН груп рибози на 3'-кінці тРНК, де усі тРНК мають загальну нуклеотидну послідовність – ССА.

Енергія, що знаходиться в макроергічному складноефірному зв'язку аміноацил-тРНК, згодом використовується на утворення пептидного зв'язку в ході синтезу білку.

Пірофосфат, що виділяється під час цієї реакції, гідролітично розщеплюється з утворенням двох молекул ортофосфату і виділенням енергії, що робить реакцію активації амінокислот безповоротною.

Надзвичайно висока специфічність *aa*-тРНК синтетаз у зв'язуванні амінокислоти з відповідними тРНК лежить в основі точності трансляції генетичної інформації. В активному центрі цих ферментів є 4 специфічних ділянки для пізнавання: амінокислоти, тРНК, АТФ і четвертий – для приєднання молекули H_2O , яка бере участь в гідролізі неправильних аміноациладенілатів. За рахунок існування в активному центрі цих ферментів механізму, що коригує, забезпечується негайне видалення помилково приєданого амінокислотного залишку, досягається вражаюча висока точність роботи: на 1300 пов'язаних із тРНК амінокислот зустрічається тільки одна помилка.

Амінокислота, приєднуючись до тРНК, надалі не визначає специфічних властивостей *aa*-тРНК, оскільки її структуру не дізнається ані рибосома, ні мРНК. Участь у синтезі білку залежить тільки від структури тРНК, а точніше, від компліментарної взаємодії антикодону аміноацил-тРНК з кодоном мРНК.

Антикодон розташований в центральній (антикодоновій) петлі тРНК. Пізнавання тРНК *aa*-тРНК синтетазами не завжди відбувається по антикодоновій петлі. Активний центр деяких ферментів виявляє компліментарну відповідність іншим ділянкам просторової структури тРНК.

Рибосоми

Рибосоми є рибонуклеопротейновими утвореннями – своєрідними "фабриками", на яких відбувається збирання амінокислот у білки. Еукаріотичні рибосоми мають константу седиментації 80S і складаються з 40S (малої) і 60S (великої) субодиниць (рис. 27). Кожна субодиниця включає рРНК і білки. У 40S субодиницю входить рРНК з константою седиментації 18S і близько 30-40 білків. У 60S субодиниці виявлено 3 види рРНК: 5S, 5,8S і 28S і близько 50 різних білків.

Строение рибосом прокариот и эукариот

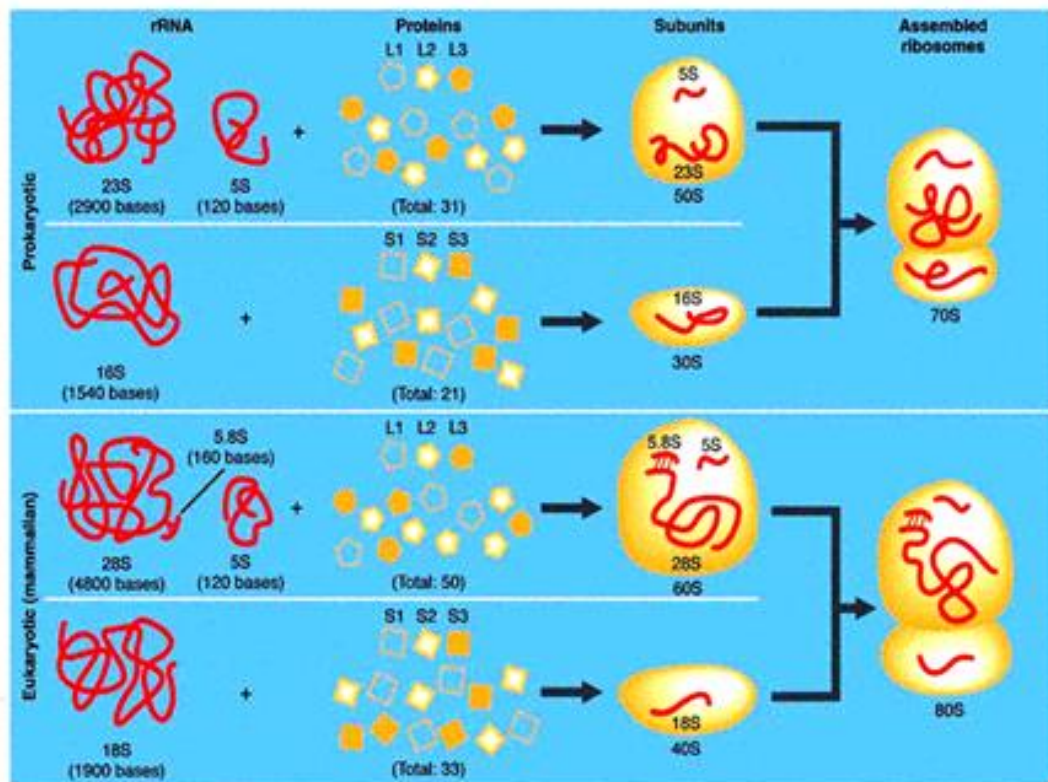


Рис. 27. Схема будови прокаріотичної та еукаріотичної рибосом

Білки входять до складу субодиниць рибосоми у кількості однієї копії і виконують структурну функцію, забезпечуючи взаємодію між мРНК і тРНК, пов'язаними з амінокислотою або пептидом.

За присутності мРНК 40S і 60S субодиниці об'єднуються з утворенням повної рибосоми, маса якої приблизно в 650 разів більше маси молекули гемоглобіну.

У рибосомі є два центри для приєднання молекул тРНК (рис. 28): аміноацильний (A) і пептидильний (P) центри, в утворенні яких беруть участь обидві субодиниці. Разом центри A і P включають ділянку мРНК, що дорівнює двом кодонам. Під час трансляції центр A зв'язує *aa*-тРНК, будова якої визначає кодон, що знаходиться в ділянці цього центру. У структурі цього кодону зашифрована природа амінокислоти, що буде включена в зростаючий поліпептидний ланцюг. Центр P займає пептидил-тРНК, тобто тРНК, пов'язана з пептидним ланцюжком, який вже синтезований.

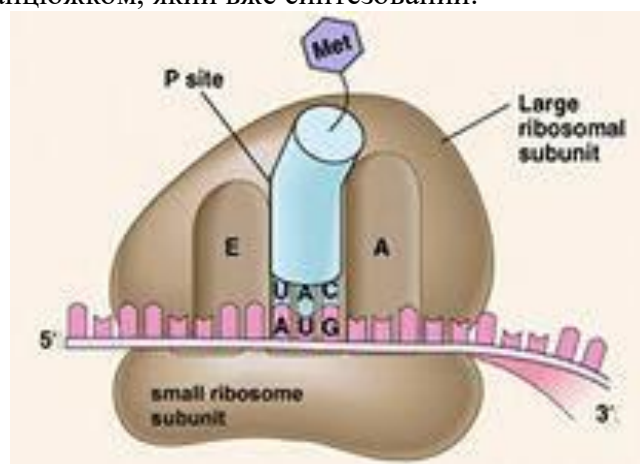


Рис. 28. Центри приєднання тРНК у рибосомі

В еукаріотів розрізняють рибосоми двох типів – "вільні", такі, що виявляються в цитоплазмі клітин, і пов'язані з ендоплазматичним ретикуломом (ЕР). Рибосоми, що асоційовані з ЕР, відповідальні за синтез білків "на експорт", які виходять до плазми крові і беруть участь в оновленні білків ЕР; мембрани апарату Гольджі, мітохондрій або лізосом.

Мітохондрії містять свій набір рибосом. Мітохондріальні рибосоми дрібніші, ніж рибосоми еукаріотів, прокаріотів і мають константу седиментації 55S. Вони, також, складені з двох субодиниць, але відрізняються від еукаріотичних рибосом кількістю і складом РНК і білків.

Білкові чинники

У кожній стадії білкового синтезу на рибосомі: ініціації, елонгації і термінації бере участь різний набір позарибосомних білкових чинників. Ці білки зв'язуються з рибосомою або її субодиницями на певних стадіях процесу і стабілізують або полегшують функціонування білоксинтезуючої машини.

АТФ і ГТФ як джерела енергії

На включення однієї амінокислоти в зростаючий поліпептидний ланцюг клітина витрачає 4 макроергічні зв'язки: 2 з АТФ (рис. 29) в ході реакції, що каталізується *aa*-тРНК синтетазою (в процесі активації амінокислот АТФ розщеплюється на АМФ і пірофосфат), і 2 молекули ГТФ: одна використовується на зв'язування *aa*-тРНК в А-центрі рибосоми, коли інша витрачається на стадію транслокації. До цього слід додати використання ще двох макроергічних зв'язків молекул: АТФ і ГТФ на ініціацію і термінацію синтезу поліпептидного ланцюга.

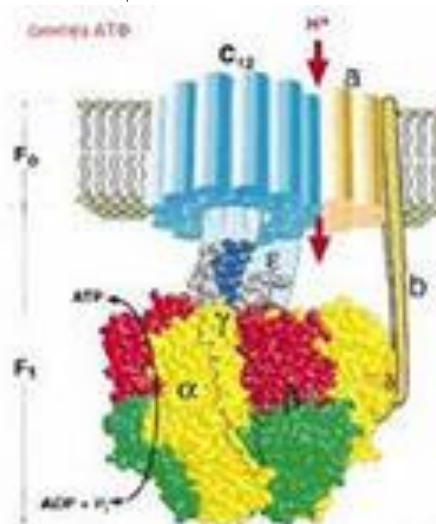
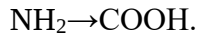


Рис. 29. Синтез АТФ

Етапи синтезу поліпептидного ланцюга

Синтез білку є циклічним багатоступінчастим енергозалежним процесом, в якому вільні амінокислоти полімеризується в генетично детерміновану послідовність з утворенням поліпептидів. Система білкового синтезу, точніше система трансляції, яка використовує генетичну інформацію, транскрибовану в мРНК, для синтезу поліпептидного ланцюга з певною первинною структурою, включає близько 200 типів макромолекул – білків і нуклеїнових кислот. Серед них близько 100 макромолекул, що беруть участь в активуванні амінокислот і їх перенесенні на рибосоми, більше 60 макромолекул, що входять до складу 70S або 80S рибосом, і близько 10S макромолекул, що беруть безпосередню участь в системі трансляції. Не розбираючи природу інших важливих для синтезу чинників, розглянемо детально механізм індивідуальних шляхів синтезу білкової молекули в штучній синтезуючій системі.

Передусім за допомогою ізотопного методу було з'ясовано, що синтез білку починається з N-кінця і завершується С-кінцем, тобто процес протікає в напрямі:



Білковий синтез, або процес трансляції, може бути умовно розділений на два етапи: активування амінокислот і власне процес трансляції. Другий етап матричного синтезу білку, власне трансляцію, що протікає в рибосомі, умовно ділять на три стадії: ініціації, елонгації і термінації.

Активування амінокислот

Необхідною умовою синтезу білку, який кінець кінцем зводиться до полімеризації амінокислот, є наявність в системі не вільних, а так званих активованих амінокислот, що мають в розпорядженні свій внутрішній запас енергії. Активація вільних амінокислот (рис. 30) здійснюється за допомогою специфічних ферментів аміноацил-тРНК-синтетаз в присутності АТФ. Цей процес протікає в дві стадії:

♦ Обидві стадії каталізуються одним і тим же ферментом. На першій стадії амінокислота реагує з АТФ і утворюється пірофосфат і проміжний продукт, який на другій стадії реагує з відповідною 3'-ОН-тРНК, внаслідок чого утворюється аміноацил-тРНК і звільняється АМФ. Аміноацил-тРНК має в розпорядженні необхідний запас енергії.

♦ Амінокислота приєднується до кінцевого 3'-ОН-гідроксилу АМФ, який разом з двома залишками ЦМФ утворює кінцевий триплет ЦЦА, що є однаковим для усіх транспортних РНК.

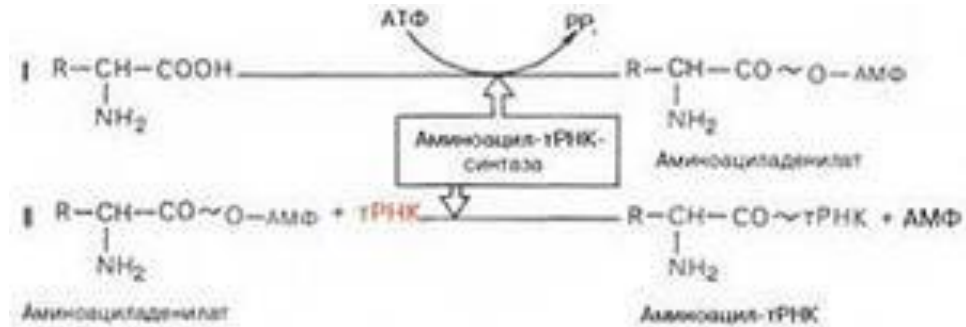


Рис. 30. Активування амінокислот

Ініціація

Ініціація трансляції є подією, в ході якої відбувається утворення комплексу, що включає Мет-тРНК_{імет}, мРНК і рибосому, де – тРНК_{імет}, це метіонінова тРНК, що ініціює. В цьому процесі беруть участь не менше 10 чинників ініціації, які означають як eIF (від англ. eukaryotic initiation factors) з вказівкою номера і літери. Спочатку 40S субодинаця рибосоми з'єднується з чинником ініціації, який перешкоджає її зв'язуванню з 60S субодинацею, але стимулює об'єднання з потрібним комплексом, включаючим Мет-тРНК_{імет}, eIF-2 і ГТФ. У подальшому, цей наразі вже складніший комплекс зв'язується з 5'-кінцем мРНК за участю декількох eIF. Один з чинників ініціації (eIF-4F) дізнається і приєднується до ділянки "кеп" на молекулі мРНК, тому він дістав назву *кепув'язуючого білку*. Приєднавшись до мРНК, 40S субодинаця починає переміщатися по некодуючій частині мРНК до тих пір, поки не досягне кодону AUG кодуєчої нуклеотидної послідовності, що ініціює. Переміщення 40S субодинаць (рис. 31) по мРНК супроводжується гідролізом АТФ, енергія якого витрачається на подолання ділянок тієї, що спіралізує в нетрансльованій частині мРНК. В еукаріотичних клітинах некодуючі ділянки мРНК мають різну довжину, але звичайно від 40 до 80 нуклеотидів, хоча зустрічаються й з протяжністю більше 700 нуклеотидів.

Досягнувши початку кодуєчої послідовності мРНК, 40S субодинаця зупиняється і зв'язується з іншими чинниками ініціації, що прискорюють приєднання 60S субодинаць і утворення 80S рибосом за рахунок гідролізу ГТФ до ГДФ і неорганічного фосфату. При цьому формуються А- і Р-центри рибосом, причому в Р-центрі опиняється AUG-кодон мРНК з приєднаним до нього Мет-тРНК_{імет}.

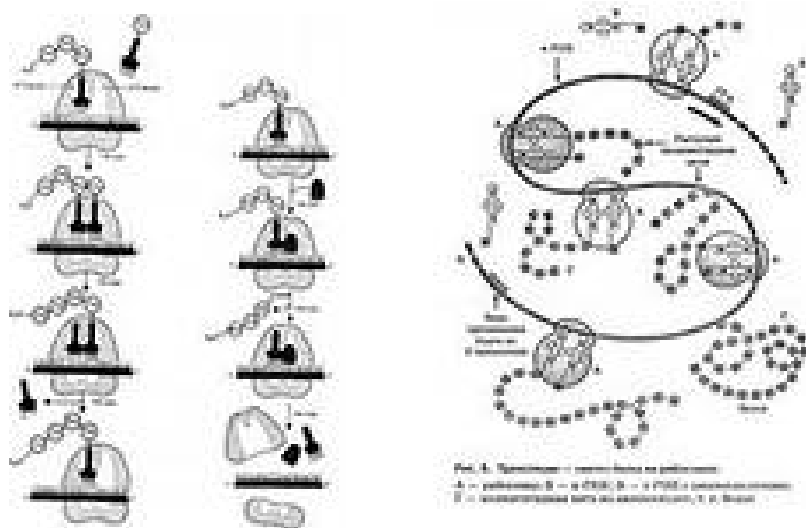


Рис. 31. Схема переміщення 40S субодиниць рибосоми по іРНК

У клітинах є дві тРНК, що розрізняються за структурою та розпізнають кодон AUG. Кодон, що ініціює, розпізнає тРНК_{імет}, проте триплети мРНК, що кодують включення метіоніну до внутрішніх ділянок білку, прочитуються іншою тРНК_{імет}.

Елонгація

Після закінчення ініціації рибосома розташовується на мРНК таким чином, що в Р-центрі знаходиться кодон AUG, що ініціює, з приєднаною до нього Мет-тРНК_{імет}, а в А-центрі – триплет, що кодує включення першої амінокислоти білку, що синтезується. Далі починається найтриваліший етап білкового синтезу – елонгація (рис. 32), в процесі якого рибосома за допомогою *aa*-тРНК послідовно "читає" мРНК у вигляді триплетів нуклеотидів, що йдуть за кодоном, що ініціює, в напрямі від 5' до 3'-кінця, нарощуючи поліпептидний ланцюжок за рахунок послідовного приєднання амінокислот.

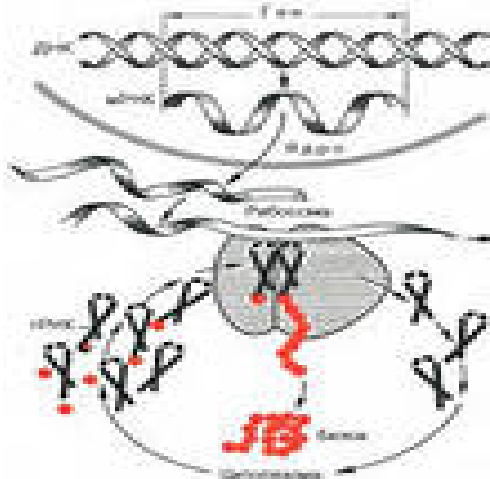


Рис. 32. Схема елонгації процесу біосинтеза білка

Включення кожної амінокислоти у білок відбувається в три стадії, за яких:

- ⇒ *aa*-тРНК кожної амінокислоти, що входить у білок, зв'язується з А-центром рибосоми;
- ⇒ пептид від пептидил-тРНК, що знаходиться в Р-центрі, приєднується до α -NH₂-групи аміноацільного залишку *aa*-тРНК А-центра з утворенням нового пептидного зв'язку;
- ⇒ подовжена на один амінокислотний залишок пептидил-тРНК переміщається з А-центра в Р-центр у результаті транслокації рибосоми.

Зв'язування аміноаціль-тРНК в А-центрі

Кодон мРНК, розташований в А-центрі поряд з кодоном, що ініціює, визначає природу *aa'*-тРНК_{*aa'*}, яка буде включена в А-центр (рис. 33). *aa'*-тРНК_{*aa'*} взаємодіє з рибосомою у вигляді потрійного комплексу, що складається з чинника елонгації EF-1, *aa'*-

тРНК $_{aa'}$ і ГТФ. Комплекс ефективно взаємодіє з рибосомою лише у тому випадку, якщо антикодон aa' -тРНК $_{aa'}$, комплементарний і антипаральний кодону мРНК в А-центрі.

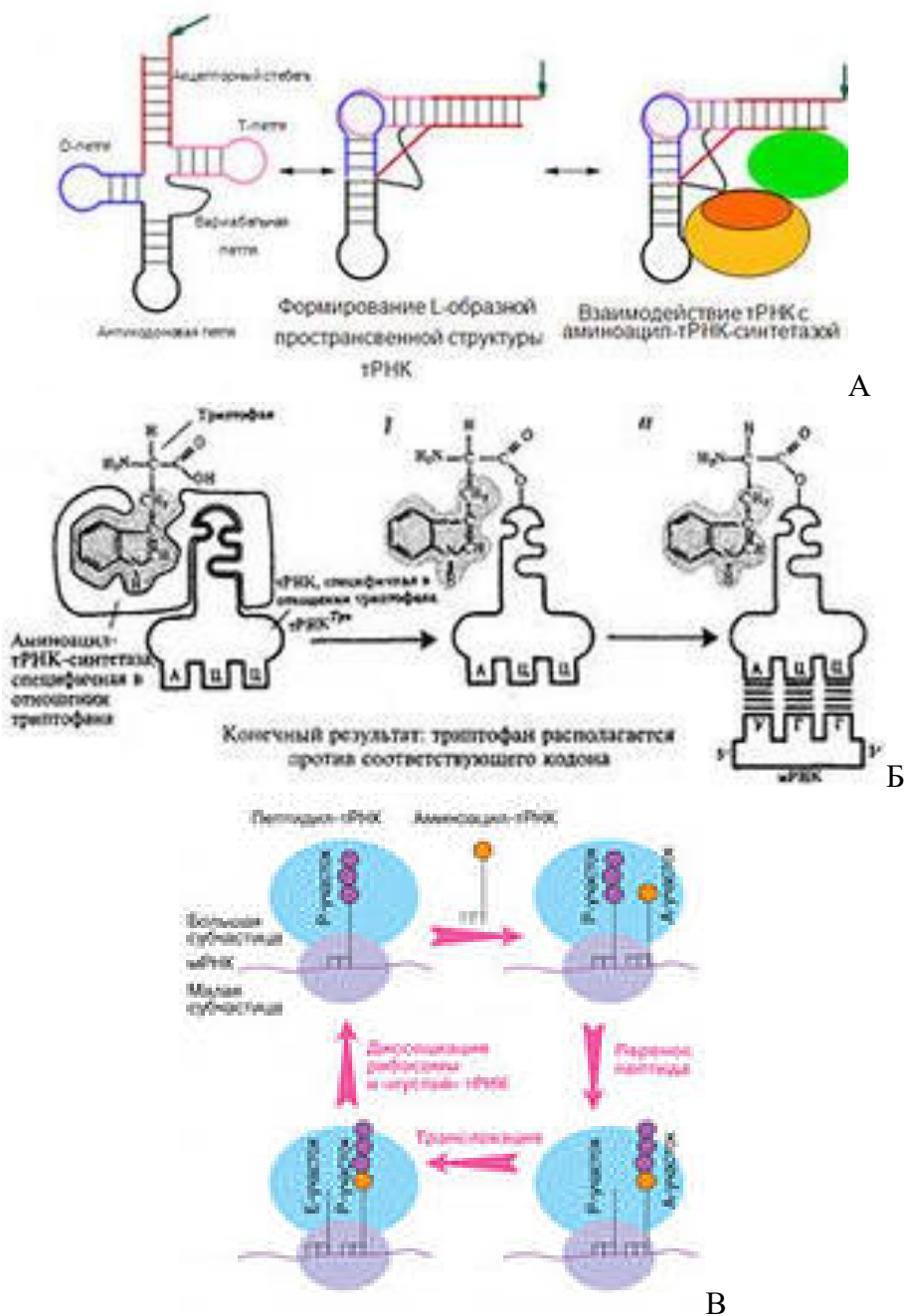


Рис. 33. Схема активзації (А) та зв'язування (Б) аміноацил-тРНК та роботи рибосоми (В)

Включення aa' -тРНК $_{aa'}$ до рибосоми відбувається за рахунок енергії гідролізу ГТФ до ГДФ і неорганічного фосфату.

Утворення пептидного зв'язку відбувається відразу ж після відщеплення комплексу EF-1 і ГДФ від рибосоми. Ця стадія процесу дістала назву *реакції транспептидації*.

Під час цієї реакції залишок метіоніну aa' -тРНК $_{aa'}$, зв'язується з α -аміногрупою першої амінокислоти, приєднаної до тРНК $_{aa'}$ і розташованої в А-центрі, утворюється перший пептидний зв'язок. Встановлено, що пептидилтрансферазна вирішує активність великої субодиниці рибосоми, якій характерно 28S рРНК. До теперішнього часу виявлена ціла група РНК, що має властивості ферментів. Ці каталітично активні РНК дістали назву рибозимів. Вважають, що рибозіми можна вважати "реліктами" раннього періоду еволюції, коли білки ще не набули такого значення, як в наступні періоди.

Транслокація – третя стадія елонгації. До рибосоми приєднується чинник елонгації EF-2 і за рахунок енергії ГТФ просуває рибосому по мРНК на один кодон до 3'-кінця. В результаті діпептидил-тРНК, яка не змінює свого положення відносно мРНК, з А-центру переміщається до Р-центру. Вільна від метіоніну тРНК_{aa'}, покидає рибосому, а до ділянки А-центру потрапляє наступний кодон.

Після закінчення третьої стадії елонгації рибосома в Р-центрі має діпептидил-тРНК, а до А-центру потрапляє триплет, що кодує включення в поліпептидний ланцюг іншої амінокислоти. Починається наступний цикл стадії елонгації, протягом якого на рибосомі знову проходять вищеописані події. Повторення таких циклів по числу смислових кодонів мРНК завершує увесь етап елонгації.

Термінація

Термінація трансляції настає у тому випадку, коли до А-центру рибосоми потрапляє один із стоп-кодонів: UAG, UAA або UGA (рис. 34). Для стоп-кодонів немає відповідних тРНК. Замість цього до рибосоми приєднуються два білкових чинника RF (від англ., releasing factor), що вивільняють (або чинника термінації). Один з них за допомогою пептидилтрансферазного центру каталізує гідролітичне відщеплення синтезованого пептиду від тРНК. Інший за рахунок енергії гідролізу ГТФ викликає дисоціацію рибосом на субодиниці.

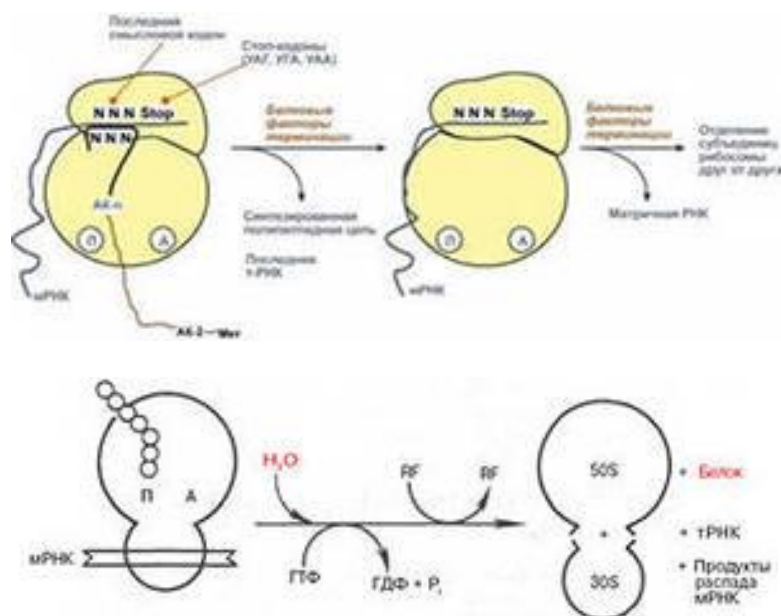


Рис. 34. Схема термінації біосинтезу поліпептиду

Цікаво зазначити, що чинники трансляції, що реалізують ефекти за рахунок гідролізу ГТФ, є членами суперсімейства G-білків, до якого входять G-білки (що беруть участь в трансдукції сигналів гормонів і інших біологічно активних речовин) і Ras-білки (що функціонують як чинники зростання). Усі G-білки зв'язують і гідролізують ГТФ. Коли вони пов'язані з ГТФ, то активні і беруть участь у відповідних метаболічних процесах, а коли в активному центрі в результаті гідролізу ГТФ перетворюється на ГДФ – ці білки набувають неактивну конформацію.

Таким чином, матрична природа процесу трансляції проявляється в тому, що послідовність надходження аміноацил-тРНК рибосомі для синтезу білку суворо детермінована мРНК, тобто порядок розташування кодонів уздовж ланцюга мРНК однозначно задає структуру білку, що синтезується. Рибосома сканує ланцюг мРНК у вигляді триплетів і послідовно відбирає з довкілля "потрібні" aa-тРНК, звільняючи в ході елонгації деацильовані тРНК.

Полірибосоми

Мала і велика субодиниці рибосоми у процесі трансляції виконують різні функції: мала субодиниця приєднує мРНК й декодує інформацію за допомогою тРНК механізмом транслокації, а велика субодиниця – відповідальна за утворення пептидних зв'язків.

У процесі синтезу білку рибосома приєднується до 5'-кінця мРНК і переміщається у напрямі 3'-конця. При цьому 5'-кінець мРНК звільняється, і до нього може приєднатися нова рибосома, на якій починається зростання ще одного поліпептидного ланцюга. Як правило багато рибосом одночасно бере участь у синтезі білку на одній і тій же мРНК, утворюючи комплекс, який називають *полірибосомою*, або *полісомою* (рис. 35).

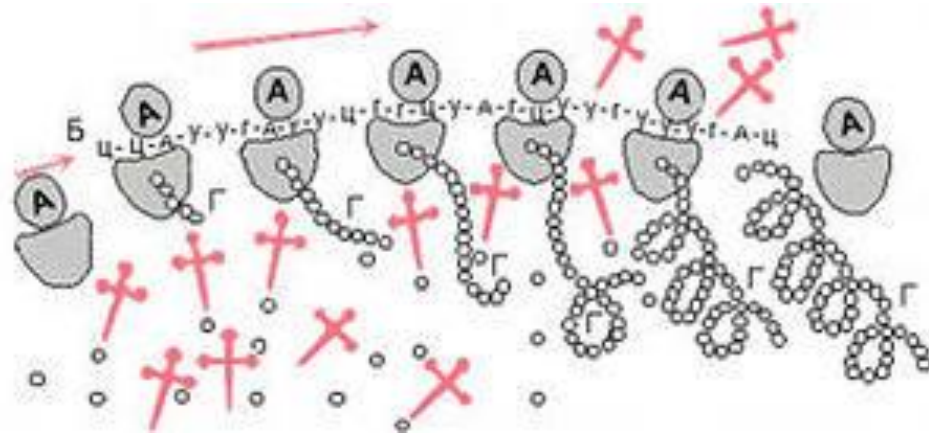


Рис. 35. Принципова схема діяльності полірибосом

Кожна рибосома займає на мРНК ділянку завдовжки близько 80 нуклеотидів, тому рибосоми розташовуються на мРНК з інтервалом близько в 100 нуклеотидів. Чим довше поліпептидний ланцюжок білку, що синтезується, тим більше рибосом може одночасно здійснювати синтез цього білку, значно збільшуючи таким чином ефективність використання матриці.

Кожна рибосома здатна каталізувати утворення близько 100 пептидних зв'язків за хвилину. Полірибосоми можуть існувати у вигляді часток, плаваючих в цитоплазмі клітин, або можуть бути пов'язані з ЕР. Вільні цитоплазматичні полірибосомні частки відповідальні за синтез білків, що виконують внутрішньоклітинні функції. Полірибосоми, що асоціюються з ЕР, під електронним мікроскопом мають вигляд "шорсткої" поверхні. Білки, що синтезуються "шорстким" ЕР, повинні транспортуватися через мембрану для того, щоб вони досягли місця остаточної локалізації. Для них характерна присутність на N-кінці лінійної, або сигнальної послідовності завдовжки від 15 до 30 амінокислотних залишків, яка містить багато амінокислот з гідрофобними радикалами і забезпечує проходження білку через ліпідний бішар мембран. Деякі з цих білків для подальшого транспорту упаковуються апаратом Гольджі в секреторні гранули.

Транспорт синтезованих білків через мембрани

Окрім використання білків для потреб самої клітини, багато так званих білків, що експортуються (які функціонують поза клітиною) піддаються перенесенню через клітинну мембрану за допомогою особливих низькомолекулярних пептидів (від 15 до 30 амінокислот), що дістали назву тих, що лідирують, або *сигнальних пептидів*. Особливістю їх складу – переважний вміст гідрофобних радикалів, що дозволяє їм легко проникати через бішарну ліпідну мембрану або вбудовуватися до мембрани (рис. 36). Ці сигнальні послідовності в рибосомах утворюються першими з N-кінця при синтезі білку за програмою сигнальних кодонів, розташованих відразу після ініціаторного кодону, і легко пізнаються рецепторними ділянками мембрани ендоплазматичної мережі. При цьому утворюється комплекс між мРНК, рибосомою і мембранними рецепторними білками, формуючи своєрідний канал у мембрані, через який сигнальний пептид проникає

всередину цистерни ендоплазматичної мережі, захоплюючи і протягаючи за собою молекулу секреторного білку, що синтезується і зростає. В процесі проходження або після проникнення поліпептиду в цистерни N-кінцева сигнальна послідовність відщеплюється під дією особливої лідируючої (сигнальної) пептидази, а зрілий білок через пластинчатий комплекс (апарат Гольджі) може покинути клітину у формі секреторної бульбашки. Слід вказати на можливість активної участі в транспорті білків і інших полімерних молекул через мембрани, окрім сигнальних пептидів, також особливих білків, що отримали найменування *поринів*; хімічна природа і механізм їх дії з'ясовані доки недостатньо.

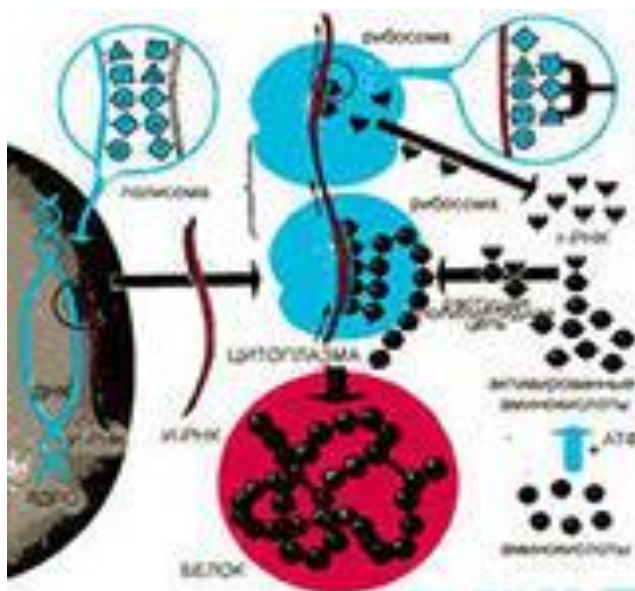


Рис. 36. Схема транспорту речовин скрізь каріоболонку і роль сигнальних пептидів

Синтез мітохондріальних білків

У мітохондріях клітин вищих організмів міститься до 2 % клітинної ДНК, що відрізняється від ДНК ядра. Мітохондрії містять увесь апарат, включаючи рибосоми, тРНК і мРНК, необхідний для синтезу певних білків. Білки, що синтезуються в мітохондріях, головним чином відносяться до нерозчинних білків, що беруть участь в організації структури цих органел, у той час як джерелом синтезу розчинних мітохондріальних білків є рибосоми цитоплазми, звідки вони потім транспортуються до мітохондрій. Рибосоми в мітохондріях мають менший розмір чим 80S рибосом в цитоплазмі. Цікаво відмітити, що як амінокислота, що ініціює, при синтезі білку в мітохондріях еукаріот може брати участь N-формілметіонин, а не вільний метіонін, як у цитоплазмі. Ця обставина свідчить про те, що мітохондріальний синтез білку (рис. 37) за своїм механізмом, очевидно, близький до синтезу білку у прокаріот.

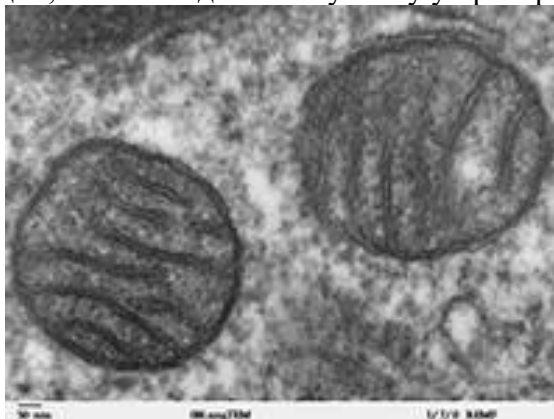


Рис. 37. Мітохондріальний синтез білку

Посттрансляційні модифікації поліпептидного ланцюга

Поліпептидні ланцюги можуть піддаватися структурним модифікаціям, або будучи ще пов'язаними з рибосомами, або після завершення синтезу. Ці конформаційні і структурні зміни поліпептидних ланцюгів дістали назву *посттрансляційних змін*. Вони включають видалення частини поліпептидного ланцюга, ковалентне приєднання одного або декількох низькомолекулярних лігандів, придбання білком нативної конформації.

Багато модифікацій здійснюються в ЕР?. Тут відбуваються фолдінг поліпептидних ланцюгів і формування унікальної третинної або четвертинної структури білків. Причому для підтримки нативної конформації молекул величезне значення має правильне формування дисульфідних зв'язків.

Частковий протеоліз

Багато білків, що секретуються з клітин, спочатку синтезуються у вигляді молекул-попередників, функціонально неактивних. Видалення частини поліпептидного ланцюга специфічними ендопротеазами приводить до утворення активних молекул. Деякі білки-попередники розщеплюються (рис. 38) в ЕР або апараті Гольджі, інші – після секреції. Так, неактивні попередники ферментів, що секретуються – *зімогени* – утворюють активний фермент після розщеплювання по певних ділянках молекули: зімоген панкреатичної залози тріпсіноген перетворюється на активний тріпсін після секреції в тонкий кишківник.

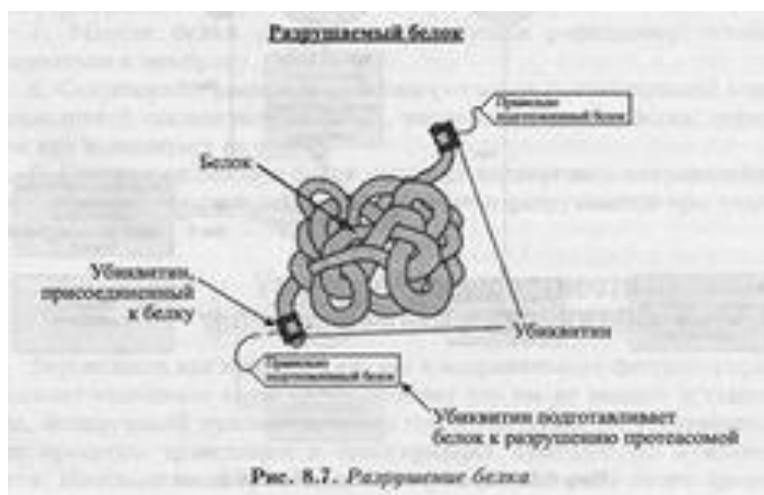


Рис. 38. Схема руйнації білка

Наочним прикладом послідовного двохстадійного протеолізу служить утворення активних форм пептидних гормонів (наприклад, інсуліну або глюкагону) з препогормонів. Спочатку N-кінцевий сигнальний пептид молекули-попередника віддається в ЕР у процесі синтезу білку і утворюється неактивний прогормон. Потім прогормон у секреторних гранулах, що формуються в апараті Гольджі піддається дії ендо- і/або екзопротеаз і перетворюється на активний гормон.

Ковалентні модифікації

Структурні білки і ферменти можуть активуватися або інактивуватися в результаті приєднання різних хімічних груп фосфатних, ацильних, металних, олігосахаридних і деяких інших. Фосфорілювання білків здійснюється по гідроксильних групах серіну, треоніну і, рідше, тірозіну ферментами з групи протеїнкіназ, проте як дефосфорілювання каталізує гідролітичні ферменти фосфопротеїнфосфатази.

Глікозилювання

Білки, що входять до складу плазматичних мембран або секретуються з клітин, піддаються глікозилюванню. Вуглеводні ланцюги приєднуються до гідроксильних груп

серину або треоніну (О-глікозилювання) або аспарагіну (N-глікозилювання). Послідовне нарощування вуглеводного фрагменту відбувається в ЕР і апараті Гольджи.

Численним модифікаціям піддаються бічні радикали деяких амінокислот: в тиреоглобуліні йодуються залишки тирозину; у чинниках згортання крові карбоксилуються залишки глутамату; у ЕР фібробластів гідроксильються залишки проліну і лізину в ланцюгах тропоколагену.

Регуляція синтезу білку

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

Клітини живих організмів мають здатність синтезувати величезну кількість різноманітних білків. Проте вони ніколи не синтезують усі білки. Кількість і різноманітність білків, зокрема ферментів, визначаються мірою їх участі в метаболізмі. Більше того, інтенсивність обміну регулюється швидкістю синтезу білку і паралельно контролюється *алостеричним* шляхом. Таким чином, синтез білку регулюється зовнішніми і внутрішніми умовами, які диктують клітині синтез такої кількості білку і таких білків, які потрібні для виконання фізіологічних функцій. Усе це свідчить про дуже складний, тонкий і доцільний механізм регуляції синтезу білку в клітині.

Загальну теорію регуляції синтезу білку розробили Ф. Жакоб і Ж. Моно. Суть цієї теорії зводиться до "виключення" або "включення" генів як функціонуючих одиниць, до можливості або неможливості прояву їх здатності передавати закодовану в структурних генах ДНК генетичну інформацію для синтезу специфічних білків. Ця теорія, доведена в дослідках на бактеріях, отримала широке визнання, хоча в еукаріотичних клітинах механізм регуляції синтезу білку ймовірно складніший. У бактерій доведена *індукція ферментів* (тобто синтез ферментів *de novo*) при додаванні в поживне середовище субстратів цих ферментів. Додавання кінцевих продуктів реакції, утворення яких каталізується цими ж ферментами, навпаки, викликає зменшення кількості ферментів, що синтезуються. Це останнє явище дістало назву *репресії синтезу ферментів*. Обидва явища – індукція і репресія – взаємозв'язані.

Згідно теорії Ф. Жакоба і Ж. Моно в біосинтезі білку у бактерій беруть участь принаймні три типи генів: структурні гени, ген-регулювальник і ген-оператор (рис. 39). *Структурні гени* визначають первинну структуру білку, що синтезується. Саме ці гени в ланцюзі ДНК є основою для біосинтезу мРНК, яка потім поступає в рибосому і, як було вказано вище, служить матрицею для біосинтезу білку.

Синтез мРНК на структурних генах молекули ДНК безпосередньо контролюється певною ділянкою, званою *геном-оператором*. Він служить як би пусковим механізмом для функціонування структурних генів. Ген-оператор локалізований на крайньому відрізку структурного гена або структурних генів, регульованих ним. "Прочитування" генетичного коду, тобто формування мРНК, починається з *промотора* – ділянки ДНК, що є точкою ініціації для синтезу мРНК, і далі поширюється послідовно уздовж оператора і структурних генів. Координований одним оператором поодинокий ген або група структурних генів утворює *оперон*.

У свою чергу діяльність оперону перебуває під контролюючим впливом іншої ділянки ланцюга ДНК – *гена-регулювальника*. Оскільки структурні гени і ген-регулювальник знаходяться в різних ділянках ланцюга ДНК, зв'язок між ними, як припускають Ф. Жакоб і Ж. Моно, здійснюється за допомогою речовини-посередника, що виявився білком і названого *репресором*. Утворення репресора відбувається в рибосомах

ядра на матриці специфічної мРНК, синтезованої на гені-регулювальнику. Репресор має спорідненість до гена-оператора і зворотно з'єднується з ним у комплекс. Утворення такого комплексу призводить до блокування синтезу мРНК і, отже, синтезу білку, тобто функція гена-регулювальника полягає в тому, щоб через білок-репресор припинити діяльність структурних генів, що синтезують мРНК. Репресор, окрім того, має здатність суворо специфічно зв'язуватися з певними низькомолекулярними речовинами, званими *індукторами*, або *ефекторами*. Коли такий індуктор з'єднується з репресором, останній втрачає здатність зв'язуватися з геном-оператором, який таким чином виходить з-під контролю гена-регулювальника, і починається синтез мРНК.

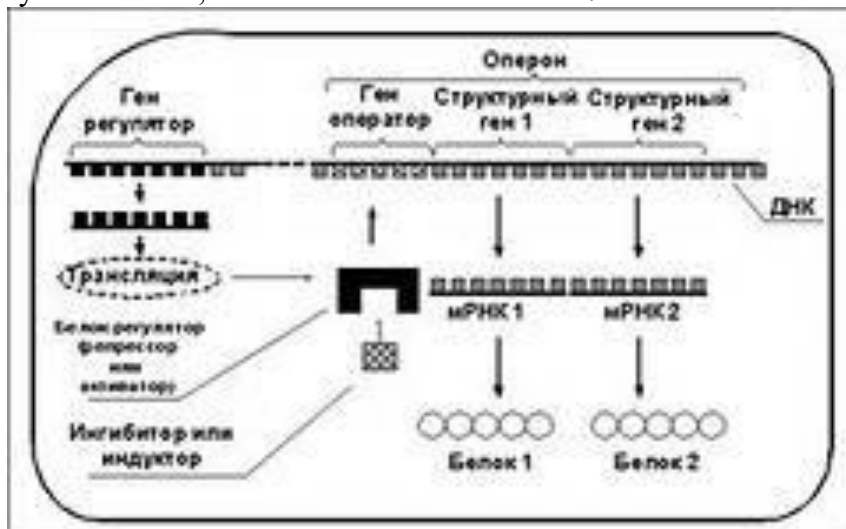


Рис. 39. Схема регуляції активності генів за Ф. Жакобом та Ж. Моно

Це типовий приклад негативної форми контролю, коли індуктор, з'єднуючись з білком-репресором, викликає зміни його третинної структури настільки, що репресор втрачає здатність зв'язуватися з геном-оператором. Цей процес аналогічний взаєминам алостеричного центру ферменту з ефектором, під впливом якого змінюється третинна структура ферменту і він втрачає здатність зв'язуватися зі своїм субстратом.

Механізм описаної регуляції синтезу білку і взаємовідношення репресора із структурними генами були доведені в дослідях на *E.coli*, на прикладі синтезу *p*-галактозидози (лактази) – ферменту, що гідролізує молочий цукор на глюкозу і галактозу. Дикий штам *E.coli*, зазвичай зростаючий на глюкозі, не може розмножуватися, якщо замість глюкози в поживне середовище додати лактозу (нове джерело енергії і вуглецю) до тих пір, поки не будуть синтезовані відповідні ферменти (адаптивний синтез). При попаданні до клітини лактози (індуктора) молекули її зв'язуються з білком-репресором і блокують зв'язок між репресором і геном-оператором. При цьому ген-оператор і структурні гени починають знову функціонувати і синтезувати необхідну мРНК, яка "дає команду" рибосомам синтезувати *p*-галактозидазу. Одночасно, ген-регулювальник продовжує виробляти репресор, але він блокується новими молекулами лактози, тому синтез ферменту триває. Як тільки молекули лактози будуть повністю розщеплені, репресор звільняється і, поступивши в ДНК, зв'язує ген-оператор і блокує синтез мРНК, а отже, синтез *p*-галактозидози в рибосомах.

Таким чином, біосинтез мРНК, що контролює синтез білку в рибосомах залежить від функціонального стану репресора (рис. 40). Якщо репресор, який є білком, побудованим з 4 субодиниць із загальною молекулярною масою близько 150000 та знаходиться в активному стані, не пов'язаний з індуктором, то він блокує ген-оператор і синтез мРНК не відбувається. При попаданні метаболіта-індуктора до клітини його молекули зв'язують репресор, перетворюючи його на неактивну форму (чи, можливо, знижуючи його спорідненість до гена-оператора). Структурні гени виходять з-під заборонного контролю і починають синтезувати потрібну мРНК.



Рис. 40. Схема залежності активності структурних генів від функціонального стану репресора

Вище було вказано, що концентрація ряду ферментів у клітинах різко знижується при збільшенні концентрації віддалених кінцевих продуктів, що утворюються в ланцюзі послідовних ферментативних реакцій. Такий ефект, що дістав назву *репресії ферментів*, часто спостерігається при реакціях біосинтезу. У цих випадках виявилось, що молекули репресора, ядра, що також утворюється в рибосомах, по "команді" гена-регулювальника є неактивними і самі по собі не мають здатності пригнічувати діяльність гена-оператора і, отже, усього оперону, але набувають такої здатності після утворення комплексу з кінцевим або одним з кінцевих продуктів біосинтетичного процесу.

Кінцевий продукт виступає, таким чином, як *корепресор*. Є дані, що показують, що як корепресор під час синтезу ферментів обміну амінокислот виступає не вільна амінокислота як кінцевий продукт біосинтетичної реакції, а комплекс її з тРНК – *aa*-тРНК.

У регуляції експресії структурних генів специфічну участь приймає особливий білок, що дістав назву *катаболітний ген-активуєчий білок* (від англ., catabolite gene activation protein, скорочено – *CAP*); цей білок взаємодіє з цАМФ, утворюючи комплекс, що сприяє прикріпленню РНК-полімерази до промоторної ділянки генома. У присутності комплексу *CAP*-цАМФ фермент може почати транскрипцію оперону, включаючи структурні гени, тобто у клітинах є ще один, додатковий *CAP*-цАМФ регулювальник, діючий швидше за все як позитивний регулювальник, оскільки його присутність необхідна для початку експресії гена. Таким чином, концепції Ф. Жакоба і Ж. Моно про механізм прояву активності генів визнана одним з блискучих досягнень молекулярної біології. Вона стала логічним розвитком численних досліджень, проведених генетиками і біохіміками в попередні десятиліття.

Розглянемо питання про регуляцію процесів диференціювання клітин вищих організмів. ДНК, присутня в усіх соматичних клітинах, найімовірніше, має однакову первинну структуру всього організму і відповідно має в розпорядженні інформацію для синтезу будь-якого або усіх білків тіла. Проте клітини печінки, наприклад, синтезують сироваткові білки, а клітини молочної залози – білки молока. Немає сумніву в тому, що в диференційованих клітинах, очевидно, існує тонкий механізм контролю діяльності ДНК в різних тканинах, що забезпечує синтез різноманіття білків.

Механізми, що лежать в основі цієї регуляції, поки невідомі. Для пояснення їх є ряд гіпотез. Передбачається, що контроль здійснюється на рівні транскрипції за аналогією з індукцією ферментів у бактерій і що в цьому випадку в клітинах тварин повинні

функціонувати аналогічні репресори. Оскільки з молекулою ДНК в еукаріот пов'язані гістони, вважається, що саме вони виконують роль репресорів. Проте прямі докази їх ролі як репресорів відсутні, як і точні дані про існування і природу яких-небудь репресорів у клітинах еукаріот. Висловлено припущення, що в ядрі синтезується гігантська молекула мРНК, що містить інформацію для синтезу широкої різноманітності білків, але в цитоплазмі, як було показано вище, потрапляє тільки невелика частина зрілої мРНК, а основна частина розпадається. Незрозумілим є, проте, біологічний сенс і призначення цього механізму виборчого розпаду і, відповідно, витрати величезної частини молекули мРНК.

Існує ще одне припущення, що на ДНК клітини синтезуються усі можливі мРНК, які поступають в цитоплазму, і процес трансляції регулюється шляхом специфічної і виборчої взаємодії з певними молекулами мРНК.

Інгібітори синтезу білку

Одним з шляхів з'ясування механізмів синтезу нуклеїнових кислот і білків в клітинах є використання таких лікарських препаратів, які могли б вибірково гальмувати ці процеси у бактерій, не чинячи впливу на організм людини (рис. 41). Деякі препарати дійсно мають таку дію, проте багато хто з них виявляється токсичним і для людини. Нині в медичній практиці застосовуються багато антибіотиків, частина з яких буде розглянута нижче з метою з'ясування механізму їх дії на ключові хімічні реакції синтезу білку і нуклеїнових кислот.

Одним з потужних інгібіторів білкового синтезу є *пуроміцин*. У результаті структурної схожості з кінцевим залишком АМФ в аміноацил-тРНК він легко взаємодіє з А-ділянкою пептидил-тРНК з утворенням пептидил-пуроміцину.

Оскільки пептидил-пуроміцин не несе на собі триплета антикодону, він тим самим гальмує елонгацію пептидного ланцюга, викликаючи обрив реакції. За допомогою пуроміцину було доведено, наприклад, що гормональний ефект у ряді випадків залежить від синтезу білку *de novo*. Вкажемо також, що пуроміцин гальмує синтез білку як у прокаріот, так і в еукаріот.

Білковий синтез гальмується актиноміцином D, що володіє протипухлинним ефектом, який внаслідок високої токсичності застосовується рідко. Він чинить гальмівний вплив на синтез усіх типів клітинної РНК, особливо мРНК. Ця властивість викликана гальмівним впливом актиноміцину D на ДНК-залежну РНК-полімеразу, оскільки він зв'язується із залишками дезоксигуанозину ланцюга ДНК, вимикаючи матричну функцію останньої. Можна вважати, що актиноміцин D інгібує транскрипцію ДНК.

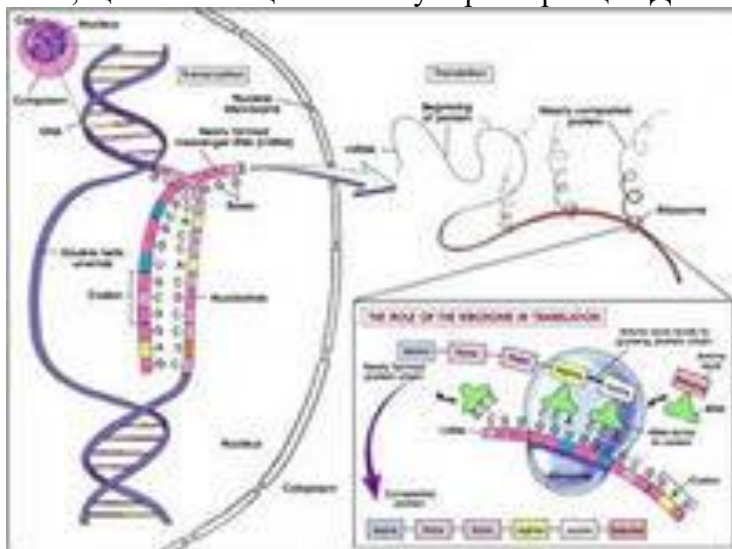


Рис. 41. Принципова схема інгібування синтезу білку лікарськими речовинами

Іншим антибіотиком, що також гальмує синтез клітинної РНК, є використовуваний при лікуванні туберкульозу *рифаміцин*. Цей препарат гальмує ДНК-залежну РНК-полімеразу шляхом зв'язування з ферментом. Найбільш чутлива до нього бактеріальна РНК-полімераза. На організм тварин цей антибіотик чинить незначний вплив. За механізмом дії він різко відрізняється від актіноміцину. Слід вказати на нещодавно відкриту протівірусну дію рифаміцину, зокрема, він успішно використовується при лікуванні трахоми, яка викликається ДНК-вмісним вірусом. Мабуть, цей антибіотик знайде застосування в лікуванні пухлин, що викликаються вірусами.

З'ясовані механізми дії ряду інших антибіотиків, вживаних при лікуванні тифозних інфекцій. Так, *хлорамфенікол* чинить інгібуючий вплив на пептидилтрансферазну реакцію (на стадії елонгації) синтезу білку в 70S рибосомі бактерій. На цей процес у 80S рибосомі він не діє. Протилежна гальмівна дія на синтез білку в 80S (без поразки процесу в 70S рибосомі) робить *циклогексимід*, що є інгібітором транслокази.

Дуже цікавий молекулярний механізм дії *дифтерійного токсину*. Він виявився наділений здатністю каталізувати реакцію АДФ-рибозилування чинника елонгації (трансляційний фактор-2, TF-2), вимикаючи тим самим його з участі в синтезі білку. Резистентність багатьох тварин до дифтерійного токсину зумовлена важкістю проникнення токсину через мембрану клітин.

Протитуберкульозні і антибактеріальні антибіотики, зокрема *стрептоміцин* і *неоміцин*, діють на білоксинтезуючий апарат чутливих до них – штамів бактерій. Висловлено припущення, що ці антибіотики викликають помилки в трансляції мРНК, відповідності між кодонами і амінокислотами, що включаються, що призводять до порушення; наприклад, кодон УУУ замість фенілаланіну починає кодувати лейцин – в результаті утворюється аномальний білок, що призводить до загибелі бактерій.

Широко вживаний в клініці *тетрациклін* (рис. 42), також, виявився інгібітором синтезу білку в 70S рибосомі (менше гальмується синтез у 80S рибосомі). Вони легко проникають через клітинну мембрану. Вважається, що тетрациклін гальмує зв'язування аміноацил-тРНК з аміноацильным центром у 50S субодиниці рибосоми. Можливо, що тетрациклін хімічно зв'язується з цим центром, вимикаючи тим самим одну з провідних стадій процесу трансляції.

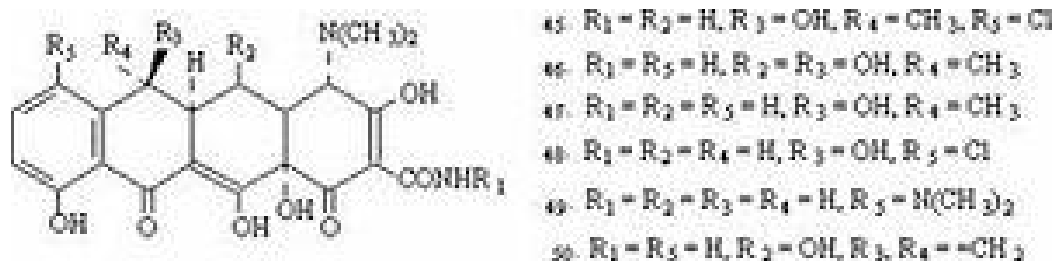


Рис. 42. Хімічна будова тетрацикліну

Пеніциліни не є істинними інгібіторами синтезу білку, проте їх антибактеріальний ефект пов'язаний з гальмуванням синтезу гексапептидів, що входять до складу клітинної оболонки. Механізм їх синтезу відрізняється від рибосомального механізму синтезу білку. Еритроміцин і олеандоміцин гальмують активність транслокази в процесі трансляції, подібно циклогексиміду, виключно у 80S рибосомах, тобто гальмують синтез білку в тваринних клітинах.

Слід ще раз підкреслити, що порушення або випадання будь-якої ланки, що бере участь в синтезі білку, майже завжди призводить до розвитку патології, причому клінічні прояви хвороби визначатимуться природою і функцією білку, синтез якого виявляється порушеним (структурний або функціональний білок). Іноді синтезуються так звані *аномальні білки* як результат дії мутагенних чинників і, відповідно, зміни генетичного коду (наприклад, гемоглобін при серповидно-клітинній анемії). Наслідки цих порушень

можуть виражатися в розвитку найрізноманітніших синдромів або закінчуватися летально. Слід зазначити, що організм має в розпорядженні потужні механізми захисту: подібні зміни генетичного апарату швидко розпізнаються специфічними ферментами – *рестриктазами*, а змінені послідовності вирізаються і знову заміщаються відповідними нуклеотидами за участю *полімераз* і *лігаз*.

Питання для самоперевірки знань:

1. Яка існує кількість комбінацій кодонів; яка з них кодує амінокислоти?
2. Які існують відхилення від стандартного генетичного коду?
3. Вкажіть основні властивості генетичного коду?
4. Які дві функції здійснює рибосома в процесі синтезу білку?
5. Які існують сайти зв'язування тРНК і в чому полягають їх функції?
6. У чому полягає різниця транскрипції і трансляції у про- і еукаріот?
7. Вкажіть дві стадії активації амінокислот.
8. У чому полягає суть процесів претрансферного і посттрансферного редагування?
9. Які функції виконують фактори ініціації, що входять до складу ініціального комплексу?
10. Вкажіть стадії елонгації трансляції у прокаріот.
11. Вкажіть, з чим пов'язаний процес термінації трансляції у прокаріот?
12. Що розуміють під «реініціацією» трансляції у прокаріот?
13. Вкажіть особливості здійснення трансляції в мітохондріях.
14. Вкажіть фактори елонгації трансляції в мітохондріях.
15. Які три групи посттрансляційної модифікації білків існують?
16. У чому полягає особливість селенопротеїнів?
17. Що розуміють під поняттям «фолдинг поліпептидних ланцюгів»?
18. Яку функцію виконує комплекс NAC у процесі синтезу поліпептидних ланцюгів рибосомами?
19. У чому полягає особливість сплайсингу білків?
20. Що розуміють під поняттям «епімеризація» L-амінокислотних залишків білків?

Матеріали самостійного опрацювання:

1. Моноцистронні та поліцистронні мРНК
2. Специфіка трансляції у прокаріот та еукаріот

6. РЕПАРАЦІЯ ДНК ВІД ПОШКОДЖЕНЬ

Репарація ДНК

Одноланцюгове і дволанцюгове ушкодження ДНК

Початок вивчення репарації покладено роботами А. Келнера (США), який в 1948 виявив явище *фотореактивації* (ФР) – зменшення ушкодження біологічних об'єктів, що викликається ультрафіолетовими (УФ) променями, при наступній дії яскравим видимим світлом (світлова репарація; рис. 61).

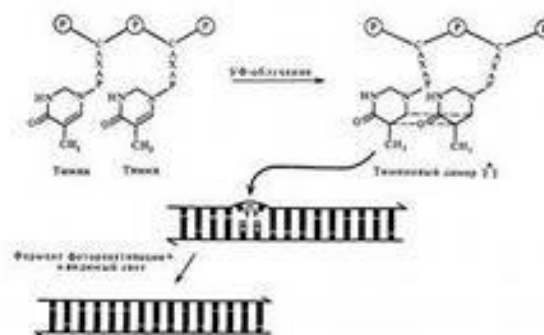


Рис. 61. Світлова репарація ДНК

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

Пізніше при вивченні генетичного контролю чутливості бактерій до УФ-світла і іонізуючих випромінювань була виявлена *темнова репарація* (рис. 62) – властивість клітин ліквідувати ушкодження в ДНК без участі видимого світла. Механізм темної репарації опромінених УФ-світлом бактерійних клітин був передбачений А. П. Говард-Фландерсом і експериментально підтверджений в 1964 Ф. Ханавальтом і Д. Петіджоном (США). Було показано, що у бактерій після опромінення відбувається вирізування пошкоджених ділянок ДНК із зміненими нуклеотидами і ресинтез ДНК у пропусках, що утворилися.

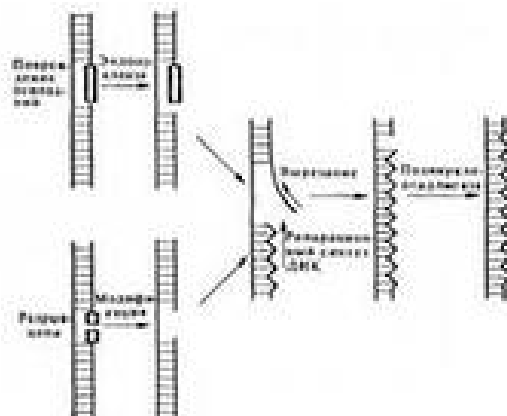


Рис. 62. Темнова репарація ДНК

Системи репарації існують не лише у мікроорганізмів, але також у клітинах тварин і людини, у яких вони вивчаються на культурах тканин. Відома спадкова хвороба людини – пігментна ксеродерма, при якому порушена репарація.

Джерела ушкодження ДНК:

- ☛ УФ випромінювання,
- ☛ радіація,
- ☛ хімічні речовини,
- ☛ помилки реплікації ДНК.

Апурінізація – відщеплення азотистих основ від сахарофосфатного остову.

Дезамінування – відщеплення аміногрупи від азотистої основи.

Основні типи ушкодження ДНК:

- ☞ ушкодження поодиноких нуклеотидів,
- ☞ ушкодження пари нуклеотидів,
- ☞ розриви ланцюгу ДНК,
- ☞ утворення поперечних зшивань між підставами одного ланцюга або різних ланцюгів ДНК

ДНК-лігаза – це фермент, що здійснює репарацію ДНК.

Пристрій системи репарації (рис. 63)

Кожна з систем репарації включає наступні компоненти:

- ◆ фермент, що "дізнається" хімічно змінені ділянки в ланцюги ДНК і здійснює розрив ланцюга поблизу від ушкодження;
- ◆ фермент, що видаляє пошкоджену ділянку;
- ◆ фермент (ДНК-полімераза), що синтезує відповідну ділянку ланцюга ДНК замість видаленої;
- ◆ фермент (ДНК-лігаза), що замикає останній зв'язок у полімерному ланцюзі і тим самим поновлює її безперервність (рис. 64).

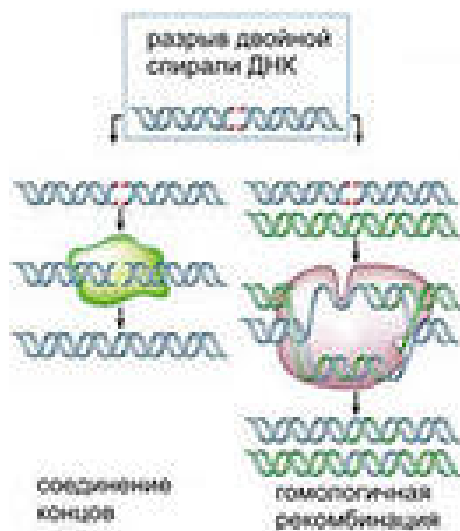


Рис. 63. Пристрій системи репарації

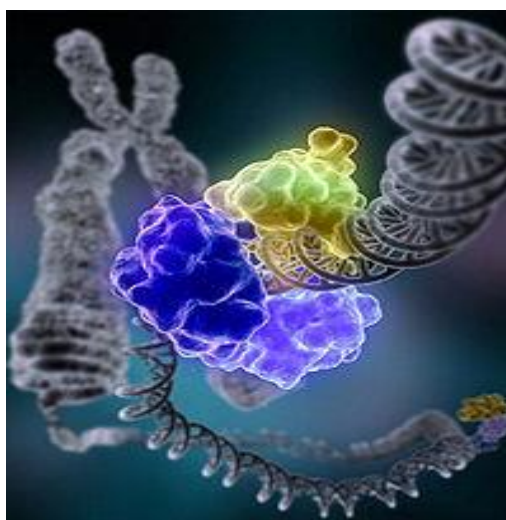


Рис. 64. ДНК-лігаза, що здійснює репарацію ДНК

Типи репарації

У бактерій є принаймні 3 ферментних системи, що виконують репарацію – пряма, ексцизійна і постреплікативна.

Пряма репарація. Пряма репарація (рис. 65) найбільш простий шлях усунення ушкоджень у ДНК, в якому зазвичай задіяні специфічні ферменти, здатні швидко (як правило, в одну стадію) усувати відповідне ушкодження, відновлюючи початкову структуру нуклеотидів. Так діє, наприклад, O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза, яка знімає метильну групу з азотистої основи на один з власних залишків цистеїну.

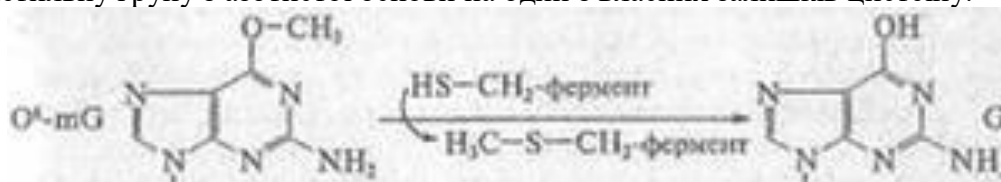


Рис. 65. Пряма репарація

Ексцизійна репарація. Ексцизійна репарація (англ. excision – вирізання; рис. 66) включає видалення пошкоджених азотистих основ із ДНК і наступне відновлення нормальної структури молекули.

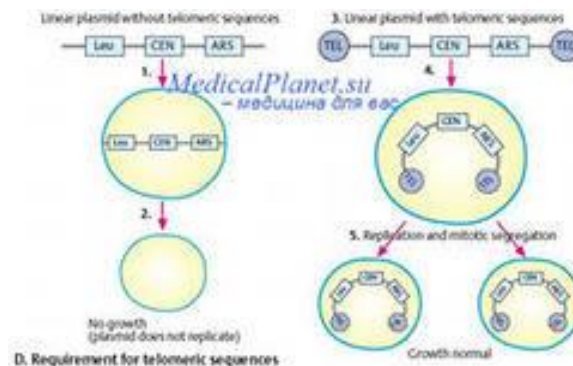
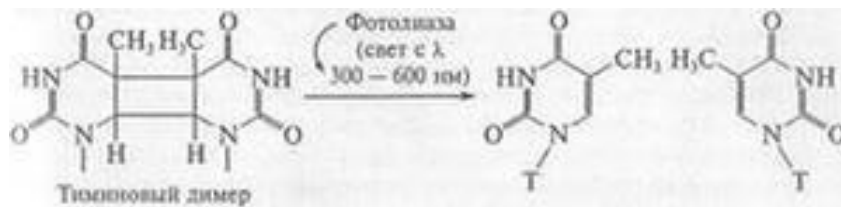


Рис. 66. Експізіційна репарація

Постреплікативна репарація. Тип репарації, що має місце в тих випадках, коли процес експізіційної репарації недостатній для повного виправлення ушкодження: після реплікації з утворенням ДНК, що містить пошкоджені ділянки, утворюються одноланцюгові проломи, що заповнюються в процесі гомологічної рекомбінації за допомогою білку *RecA*.

Постреплікативна репарація була відкрита в клітинах *E. coli*, не здатних вищеплювати тимінові димери. Це єдиний тип репарації, що не має етапу пізнання ушкодження.

Вважають, що від 80 % до 90 % усіх ракових захворювань пов'язано з відсутністю репарації ДНК. Ушкодження ДНК (рис. 67) у хромосомах (рис. 68) під впливом чинників довкілля, а також нормальних метаболічних процесів, що характерні клітині, відбувається з частотою від декількох сотень до 1000 випадків у кожній клітині, кожену годину.

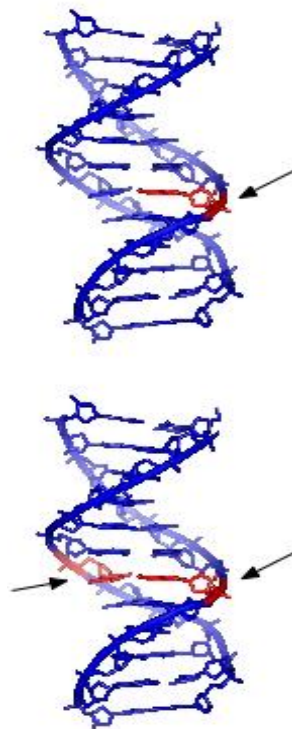


Рис. 67. Одноланцюгові та дволанцюгові ушкодження ДНК



Рис. 68. Пошкоджені хромосоми

Системи репарації ДНК забезпечують точність відтворення і збереження генетичної інформації. Репаративні механізми, які використовує клітина для підтримки стабільності інформації, закладеної в ДНК універсальні – функціональна, а іноді і структурна гомологія елементів, що утворюють ці механізми, простежується від бактерій до людини. Чим складніше клітина, тим більша кількість структурних і регуляторних генів і їх продуктів беруть участь у процесах репарації ДНК, хоча принципова схема конкретного процесу, як правило, залишається незмінною. Репаративні механізми утворюють складну мережу, сплетену функціональними зв'язками або запозиченнями структурних елементів, яка забезпечує баланс між стабільністю інформації в ДНК і її еволюційною мінливістю.

Точність відтворення ДНК і передачі інформації, в ній закладеною, забезпечується двома матричними процесами – реплікацією і транскрипцією ДНК. Хоча ДНК-полімераза має активність, що коригує, реплікація не абсолютно точна, і, якщо виникають неспарені підстави, то системи корекції основ виправляють помилку.

Якщо в ДНК з'являються одно- і двониткові розриви, то в дію вступає гомологічна рекомбінація, яка за рахунок сестринських обмінів точно відновлює цілісність ДНК. Проте рекомбінація – це "важка артилерія", і призначена вона понад усе для мінливості. При вступі в клітину ДНК, яка лише частково гомологічна ДНК клітини, вірогідна її інтеграція в геном за допомогою гомологічної рекомбінації. На варті точності цього процесу стоїть система корекції неспарених основ з довгою ділянкою яка ресинтизується (ДКНО або довга корекція неспарених основ), яка перериває рекомбінацію, якщо гомологія взаємодіючих молекул ДНК надмірно недосконала. Більше того, ДКНО ліквідує більшість рекомбінаційних забудов на рівні онДНК, якщо вони порушують комплементарне спаровування нуклеотидів. Тим самим ДКНО знижує частоту рекомбінаційних обмінів кДНК. Так система ДКНО відстоює стабільність генома і його видоспецифічність. Спадкові порушення клітинних репаративних систем у людини призводять до важких природжених аномалій і/або схильності до розвитку ракових захворювань.

Репарація ДНК: основні механізми

Два типи порушень структури ДНК призводять до мутацій. Це, по-перше, включення нормальних нуклеотидів в аномальне оточення з послідовностей нуклеотидів, що призводять до утворення неправильно спарених основ і петель різних розмірів. По-друге, поява ушкоджень ДНК у вигляді аномальних нуклеотидів у правильних послідовностях ДНК. У цьому випадку йдеться про різні хімічні модифікації нуклеотидів, включаючи їх руйнування і утворення поперечних зшивань. Ушкодження ДНК можуть призводити до затримки і блокування реплікації і транскрипції.

При дослідженні механізмів репарації ДНК важливі результати було отримано на клітинах, опромінених УФ-світлом з довжинами хвиль 240-280 нм. УФ-опромінення клітин часто супроводжується їх загибеллю, утворенням мутацій і злоякісною трансформацією. Серед первинних ушкоджень найчастіше зустрічаються безпіримідинові фотопродукти: піримідинові димери циклобутанового типу, сполучені зв'язком 6-4.

Як про-, так і еукаріоти мають декілька ферментних систем, які розділяють піримідинові димери або відновлюють початкову структуру азотистих основ. До таких репаративних систем відноситься, передусім, система ексцизійної репарації ДНК (NER), що здійснює вирізування пошкоджених нуклеотидів (NER – nucleotide excision repair) або азотистих основ (BER – base excision repair). Система ферментативної фотореактивації ДНК (PHR – photoreactivation), основним компонентом якої є *ДНК-фотоліаза*, розділяє піримідинові димери, перетворюючи їх на нормальні піримідинові основи. Крім того, пошкоджені УФ-світлом молекули ДНК можуть репаруватися за участю систем рекомбінації і в процесі постреплікативного синтезу ДНК. Дія систем репарації пошкодженої ДНК поширюється не лише на фотопродукти, але і на інші модифіковані основи, що утворюються під дією хімічних мутагенів. Окремо слід згадати систему, що розпізнає неправильно спарені основи в подвійній спіралі ДНК, що виникає в результаті помилок реплікації.

Більшість досліджених організмів мають системи репарації ДНК у різних комбінаціях. Так, клітини *E. coli* для видалення фотопродуктів використовують системи NER і PHR, проте як у людини піримідинові димери циклобутанового типу видаляються виключно системою NER.

Корекція неспарених основ (КНО) у ДНК: введення

Неспарені основи в ДНК можуть виникати в результаті трьох подій:

- 1) прямого ушкодження основ ДНК або їх попередників продуктами клітинного метаболізму;
- 2) помилкової підстановки основи некомплементу ДНК-полімеразою в ході реплікації;
- 3) рекомбінаційних інтеграції одноланцюгової ділянки ДНК у неабсолютно ідентичну ДНК, партнера по рекомбінації.

Усі події приведуть до утворення гетеродуплексної ДНК, яка і стає субстратом для ферментів, що коригують неправильні пари основ.

Процес репарації ДНК при виявленні ферментами неканонічної пари в дуплексі ДНК проходить через ряд реакцій. Зазвичай такий ланцюг реакцій, як описує Kornberg E.A. (1982) і також Краевский Е.А. (1986) починається з виявлення і видалення одного з нуклеїнових основ неканонічної пари в ДНК, каталізованої відповідним ферментом групи AP-ендонуклеаз типу II (апуринових/апіримідинових ендонуклеаз).

У подальшому відбувається гідролітичне розщеплювання 3'-фосфоефірного зв'язку, причому фосфат залишається в 5'-положенні ланцюга ДНК, що йде. Далі з 3'-кінцем у місці розщеплювання ланцюга зв'язується ДНК-полімераза бета, що призводить до утворення Шиффа між ферментом і 3'-ланцюгом ДНК, що каталізує гідролітичне видалення дезоксирибозілфосфатного залишку, таким чином звільняючи 3'-кінець для включення відповідної канонічної пари нуклеотиду.

Хімічний механізм реакції гідролітичного видалення включає утворення основи Шиффа між залишком Lys72 і альдегідною групою 3'-глікозидного залишку. Далі, після включення в положення відповідного нуклеотидного залишку, що звільнився, ДНК-лігаза возз'єднує безперервний ланцюг ДНК.

Разом з описаним варіантом репарації відомі і репараційні процеси, що поновлюють ушкодження одного з ланцюгів ДНК, яке виникає в результаті мутагенного, променевого і інших дій. При цьому, мабуть, в усіх випадках завершальні стадії заповнення малих проломів каталізуються ДНК-полімеразою β .

Рентгеноструктурний аналіз комплексів [дДНК + ДНК-полімераза] і [дДНК + ДНК-полімераза+dNTP] у дослідженнях Beard та ін. (1998) показує, що конформація ДНК-

полімерази β в них сильно розрізняється. При цьому стадією, що лімітує швидкість процесу елонгації являється конформаційна зміна, що перетворює непродуктивний комплекс на продуктивний. Більше того, таке перетворення ефективно відбувається лише при утворенні комплементарної канонічної пари, що викликає конформаційну зміну за рахунок аллостеричного впливу. Саме цей механізм головним чином забезпечує точність синтезу, що каталізується ДНК-полімеразою β .

Як інший приклад ДНК-полімераз слід назвати зворотні транскриптази ретровірусів і, ймовірно, вірусу гепатиту В.

Прийнято розрізняти дві системи КНО:

- ♦ з довгим ресинтезуємим трактом (ДКНО, LPMR, long patch mismatch repair) і
- ♦ дуже коротким трактом (ОККНО, VSPMR, very short patch mismatch repair).

КНО у бактерій

ДКНО найдетальніше вивчена в *E. coli*, процес корекції ДНК в якій, за даними Modrich P. (1993) був реконструйований *in vitro*. ДКНО включає наступний ланцюг реакцій:

- 1) Пізнання неспареної основи продуктом гена *mutS*.
- 2) Утворення комплексу *MutS-MutL*, білку *MutS*, що стабілізує зв'язування, з неспареною основою, що супроводжується активуванням білка *MutH*, який здійснює ендонуклеазну атаку найближчого до цієї основи напівметильованого (тобто метильованого лише в одній нитці ДНК) сайту GATC, локалізованого з будь-якого боку від основи. "Спрямованість" корекції (вибір нитки ДНК) визначається тим, що одноланцюговий розрив вноситься у неметильовану нитку (наприклад, в що знову синтезується при реплікації метилазою *Dam*, метилоуючу 5-метиладенін у сайті GATC). Ця особливість ДКНО у *E. coli* підкреслює головну біологічну функцію системи – точність відтворення ДНК при реплікації. З меншою вірогідністю ДКНО здатне дізнаватися і неметильовані в обох нитках або, навпаки, метильовані в обох нитках сайти GATC, забезпечуючи неспрямовану корекцію комплементарних основ, що встановили Kolodner R. (1995), Kolodner R.D., Alani E. (1994) та Fishel R. й Kolodner R.D. (1995).

3) Експізія сегменту онДНК у місці розриву, що вимагає участі ДНК-гелікази II (продукту гена *mutU* = *uvrD* = *uvrE* = *recL*) і однієї з онДНК-екзонуклеаз : *EcoI* (3'-екзо), *Eco VIII* (3'- або 5'-екзо) або *Rec J* (5'-екзо). Останнє залежить від напрямку деградації у бік неспареної основи.

4) Ресинтез видаленої ділянки ДНК завдовжки до декількох тисяч основ, здійснюваний голоензімом *Pol III*, білком *SSB* (онДНК-зв'язуючий білок, який захищає онДНК від атаки ендонуклеазою і перешкоджає виникненню вторинних структур у неї) і ДНК-лігазою. Така коректувальна система *MutHLSU* у грамнегативних бактерій *E. coli*.

Подібна, хоча і неідентична, система *HexAB* описана Fishel R. та Kolodner R.D., (1995) у грампозитивних бактерій *Streptococcus pneumoniae*. Гени *hexA* і *hexB* є гомологами генів *mutS* і *mutL* відповідно. Проте ані аналога гена *mutH*, ні спрямованості корекції за рахунок визначуваної метилуванням ДНК в системі *HexAB* не виявлено. Залишається припустити, що розриви або кінці новосинтезованої нитки ДНК стають ділянками, на яких ініціюється експізія сегменту з неправильною основою. Ресинтезуєма ділянка і в цьому випадку включає, як встановили Friedberg E.C. та Walker G.C. з ін. (1991) до 5 т. н.

Система ДКНО у *E. coli* не має суворої специфічності. Вона впізнає і коригує усі неспарені основи (хоча транзиція репарується ефективніше, ніж трансверсії) за винятком одного -С-С.

На відміну від цього система ОККНО (оліго корекція коротких неспарених основ) у *E.coli* суворо специфічна. Вона репарує тільки неправильні пари G-Т, в яких Т з'являється в результаті дезамінування 5-метилцітозину, а останній утворюється в ході модифікації цитозинів у ДНК з допомогою метилази *Dmc*. Як і в системі ДКНО, неправильні основи дізнаються білки *MutS* і *MutL*, що стимулюють специфічну ендонуклеазу *Vsr*, щоб

розрізати ДНК з 5'-кінця від Т. Ексізія і наступний ресинтез вимагають присутності *PolI* і ДНК-лігази.

КНО у прокариот: функції

Біологічні функції систем КНО у прокариот полягають в наступному:

1) Антимутаційна: точне відтворення геному при реплікації і підтримка його початкової структури.

2) Антирекомбінаційна (ДКНО). Рекомбінація у бактерій або відбувається через утворення гетеродуплексів (при бактерійній трансформації і "однонитовій кон'югації"), або супроводжується утворенням гетеродуплексів (при кон'югації і трансдукції), що встановив Ланцов В.А. (1986). Якщо корекція пострекомбінаційних гетеродуплексів відбувається по обох нитках ДНК одночасно, то, як стверджують Rayssiguier C., Thaler D.S. та ін. (1989), вона руйнує продукти рекомбінації на стадії ексізії одноланцюгового фрагменту ДНК, що робить неможливою гомологічну рекомбінацію навіть між таксономічно близькими видами бактерій. Це призводить до репродуктивної ізоляції виду, що встановили Matic I., Rayssiguier C. і Radman M. (1995).

3) Гіпореконбінаційна (ДКНО): корекція довгих гетеродуплексів, за даними Radman M. (1989), знижує частоту рекомбінаційних обмінів на одиницю довжини ДНК, приводячи гібридну по складу ДНК до складу ДНК одного з партнерів.

4) Гіперрекомбінаційна (ОККНО): коротка ресинтезуєма ділянка, коригуючи G-T до G:C, в довгому рекомбінантному гетеродуплексі, як наполягає Radman M. (1989), імітує два додаткові рекомбінаційні обміни. Цю властивість повинні мати і інші спеціалізовані системи ексізіонної репарації основ (ЕРО) у ДНК.

ДКНО в еукаріот

За результатами досліджень Vogelstein B., Kinzler K.W. (1993), Modrich P. (1993), Fang W.-H., Modrich P. (1993) та Mordrich P. (1994) в еукаріот генетичних і біохімічних даних є наявність системи ДКНО (рис. 69), здатної пізнавати і коригувати як окремі основи, так і протяжні вставки і делеції в репараційній реакції, віднайдені Fishel R.A., Ewel A. та ін. (1994), Alani E., Chi N.-W., та ін. (1995), що направляється розривом в одній з ниток ДНК, описаної в роботі Fang W.-H. і Modrich P. (1993). Пошук гомологічних генів привів до виявлення щонайменше подвійного набору гомологів генів *mutS* і *mutL* у *S. cerevisiae* і людини, що лягло в основу припущення про гетеродимерну структуру гомологів білків *MutS* і *MutL* в еукаріот. При цьому функції *MutS*- і *MutL*-подібних гетеродимерних комплексів аналогічні описаним для бактеріальної системи *MutHSLU*.

Особливістю комплексу *MutS* у *S. cerevisiae* (*Msh2* + *Msh6*) є його асиметрія – наявність головної і додаткової складової. Дійсно, мутації *msh6* на відміну від *msh2* показують, як встановив Kolodner R. (1995), як слабкий мутаторний фенотип, так і слабе пригнічення репарації інсерційно-делеційного типу. Це не унеможливило існування комплексів білка *Msh2* з іншими складовими.

Система ДКНО у вищих еукаріот, за даними Umar A. та ін. (1996), ускладнюється і можливою участю в ній білка *PCNA*. Отже, хоча картина репараційних подій в системі ДКНО в еукаріот подібна до тієї, яка була виявлена у прокариот, але за кількістю структурних і регуляторних елементів, вона може виявитися істотно складнішою. Це підтверджують численні мутації, ушкоджувальні систему ДКНО у *S. cerevisiae*, роль яких у процесі репарації ще належить досліджувати, про що проголошує Королев В. Г. (1993).

Функціями системи ДКНО в еукаріот також є:

1) Бар'єр для внутрішньохромосомних рекомбінаційних перебудов, які, в принципі, можливі через існування множинних повторів у структурі генома. У клітинах ссавців внутрішньохромосомна рекомбінація, як встановили Radman M. (1989), Waldman A.S., Liskay R.M. (1987) значно чутливіша до досконалості гомології взаємодіючих ділянок ДНК, чим міжхромосомна.

2) Система ДКНО за переконанням Kolodner R. (1995) є складовою частиною системи контролю клітинного циклу, що виявляє певні типи ушкоджень ДНК і що дає сигнал до зупинки клітинного циклу.

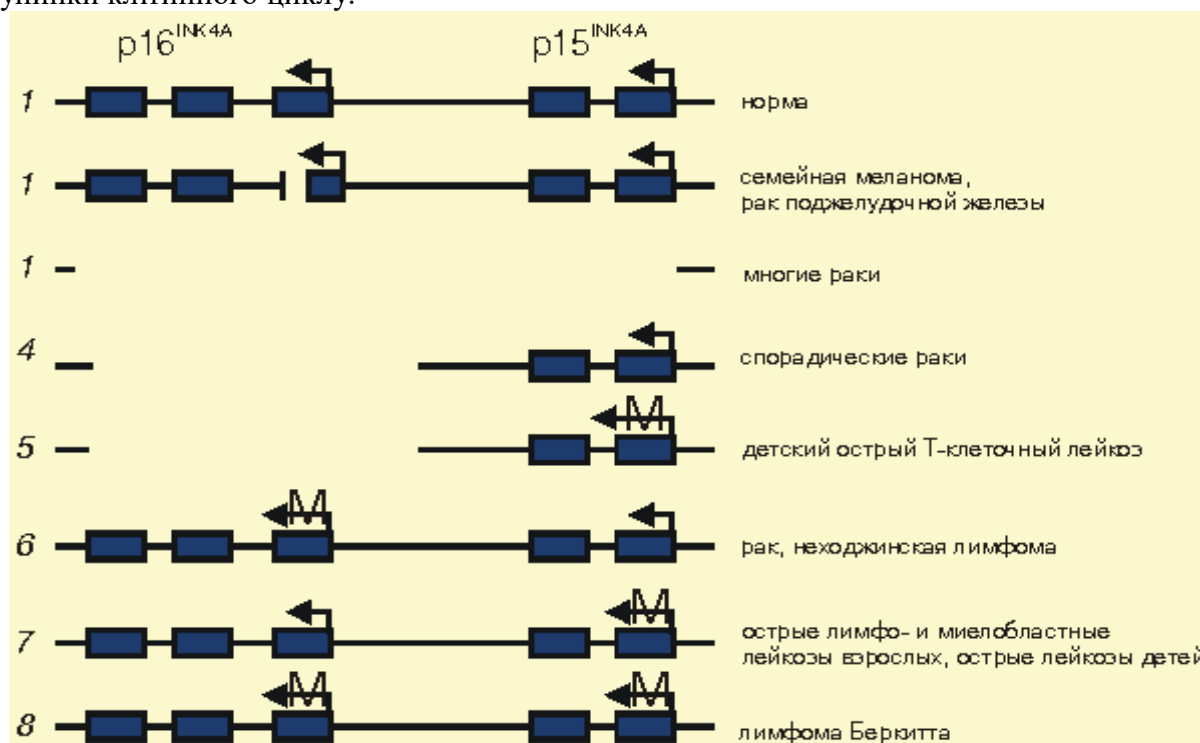


Рис. 69. MutS-подібні комплекси, *hMutSa* (*hMsh2* + *hMsh6*)

ДКНО у людини і канцерогенез

У клітинах людини, виявлено два MutS-подібних комплекси, *hMutSa* (*hMsh2* + *hMsh6*) і *hMutSb* (*hMsh2* + *hMsh3*), причому з різним спектром пізнаваних ушкоджень (див. рис. 69). Перший взаємодіє з поодинокими неспареними основами і вставками, а другий ефективний для петель, що включають 2-3 основи, про що дізналися Palombo F., Iaccarino I. та ін. (1996), а також Arnheim N., Shibata D. (1997).

Гетеродимер утворюється, ймовірно, і в структурі MutL-подібних комплексів еукаріот: *Mlh1* + *Pms1* – у дріжджів і *Mlh1* + *Pms2* у людини. В цьому випадку у людини, як стверджує Nicolaidis N.C. та ін. (1994) виявлений третій гомолог – ген *hPMS1*. Umar A. та ін. (1996) встановили, що система ДКНО у вищих еукаріот ускладнюється і можливою участю в ній білка PCNA.

Порівняльне вивчення системи ДКНО у людини має велике медико-біологічне значення. ННРТК, який складає, за різними оцінками, від 5 до 15 % усіх випадків колоректальних раків, зв'язаний, головним чином, з ушкодженнями трьох генів *hMLH1* (49%), *hMSH2* (45%) і *hPMS2* (6%), про що йдеться у Fishel R., Lescoe M.K. та ін. (1993), Leach F.S., Nicolaidis N.C. та ін. (1993), Kolodner R. (1995), Arnheim N., Shibata D. (1997). До кінця 90-х років виявлене Kolodner R. (1995) до 40 мутацій в кожному з перших двох генів і невелике число в інших, включаючи *hPMS2* і *hPMS1*. Складається також і генетична картина переходу від схильності до захворювання до його розвитку в результаті інактивації обох алелей одного з генів системи ННРТК, про що йдеться у роботах Arnheim N. і Shibata D. (1997).

Серед спорадичних ракових пухлин різної локалізації від 10 до 30 % показують нестабільність структури ДНК мікросателіту в їх клітинах (так званий фенотип *RER#+* (replication error), що є результатом невідправленої помилки реплікації ДНК (мікросателіту), що автоматично має на увазі існування дефекту в системі ДКНО.

Результати досліджень клітинних ліній, що походять із спорадичних ракових клітин із фенотипом *RER+*, показують, що вони несуть, за матеріалами робіт Eshelman J.R., Marcowitz S.D. (1995), мутації в генах *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS2* і *GTPB*.

ОККНО (корекція неспарених основ) в еукаріот

Система ОККНО спеціалізованої корекції G-T до G:C (рис. 70) виявлена Friedberg E.C., Walker G.C., та ін. (1991), Neddermann P., Jiricny J. (1993) в еукаріот. Проте доки немає підстав вважати, що ця система зв'язана з *MutS*- або *MutL*-подібними білками, що, у свою чергу, припускає наявність у ній спеціалізованої глікозилази, видаляючої T у парі G-T. Що стосується біологічних функцій системи ДКНО в еукаріот, вони виявляються ширше за тих, які описані для прокаріот, включаючи дві наступні.

Ексцизійна репарація нуклеотидів: введення

ЕР – ексцизійна репарація ДНК; ЕР-комплекс включає ПАРП, XRCC1, ДНК-лігазу III і ДНК-полімераза β . Ексцизійна репарація нуклеотидів (ЕРН, NER) може здійснюватися двома шляхами. У першому випадку відбувається гідроліз фосфодієфірного зв'язку по 3'- або 5'-кінцю на деякій відстані від помилково спареного (пошкодженого) нуклеотиду, який далі цілком відокремлюється під дією 5'->3'- (чи 3'->5'-) екзонуклеази, ДНК, що гідролізує ланцюг, нуклеотид за нуклеотидом у відповідному напрямі від первинного одноланцюгового розриву в ДНК, що репарується. Пролом, що утворюється, далі заповнюється ДНК-полімеразою. Такий механізм репарації реалізується в *E. coli* і людини для вирізування неушкоджених (немодифікованих) помилково спарених нуклеотидів. Механізм послідовного ендо- і екзонуклеазного розщеплювання ДНК не використовується для видалення пошкоджених (змінених) нуклеотидів. Це пов'язано, мабуть, з тим, що такі нуклеотиди (наприклад, утворені в результаті формування аддуктів з мутагенами) часто є інгібіторами екзонуклеаз.

Другий механізм функціонує в усіх досліджених видів організмів і полягає у використанні ферментної системи, яка вносить одноланцюгові розриви по обидві сторони від пошкодженого нуклеотиду на деякій відстані від нього з наступним видаленням одноланцюгового фрагменту ДНК, що містить змінений нуклеотид.

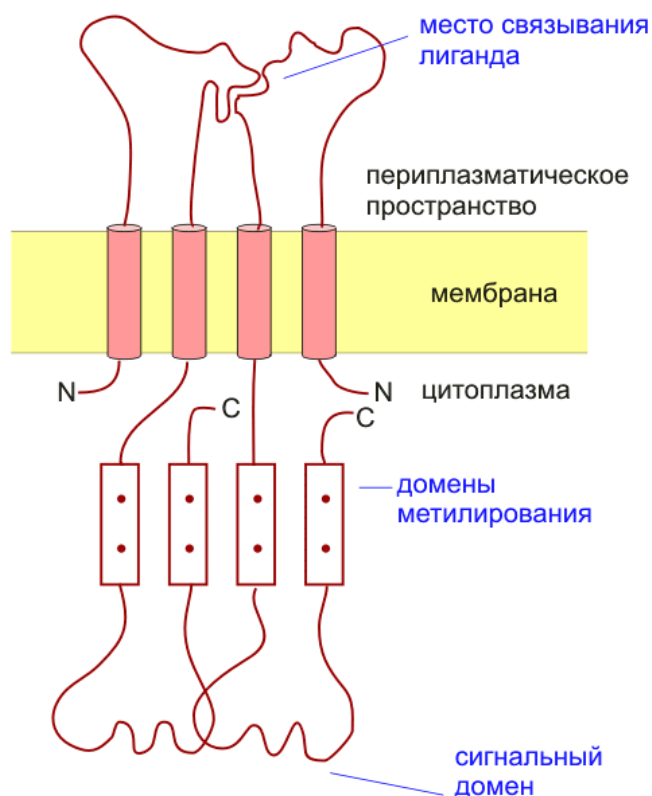


Рис. 70. Система ОККНО спеціалізованої корекції G-T до G:C в еукаріот

В універсальному механізмі ексцизійної репарації як прокаріоти, так і еукаріоти гідролізують 3-5-й фосфодієфірний зв'язок з 3'-кінця від ушкодження (рис. 71). При цьому прокаріоти гідролізують, також, 8-й зв'язок від 5'-кінця зміненого нуклеотиду, проте як у еукаріотичних організмів відбувається одноланцюговий розрив на відстані 21-25 нуклеотидів від ушкодження з боку його 5'-кінця. Таким чином, прокаріоти видаляють змінений нуклеотид у складі 12-13-членових олігомерів, у той час як еукаріоти – у складі одноланцюгових фрагментів ДНК завдовжки в 27-29 нуклеотидів. Ферментна система, що вносить такі подвійні одноланцюгові розриви, дістала назву *ексцизійної нуклеази* (*ексцизунуклеази*), що утворює в молекулі ДНК, що репарується одноланцюговий пролом і далі заповнюється за допомогою ДНК-полімерази, а фосфодієфірний зв'язок в одноланцюговому розриві, що залишається, відновлюється ДНК-лігазою.

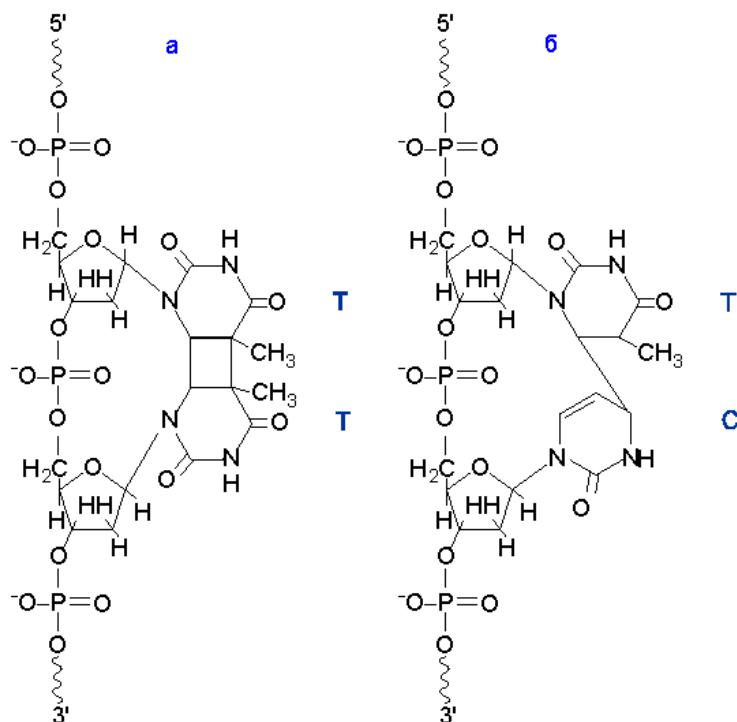


Рис. 71. Ділянка ДНК з основними ушкодженнями, що викликаються УФ-світлом (а – тимідиновий димер циклобутанового типу, б – піримідиновий димер із 6-4 зв'язком)

На відміну від ЕРО і прямих реверсій, що специфічні до досить вузького кола ушкоджень ДНК, система ЕРН, хоча і з різною ефективністю, видаляє усі можливі ушкодження, і тому роль її в підтримці стабільності генома велика. ЕРН детально вивчена у *E. coli* Lehmann A.R. (1995), Friedberg E.C., Walker G.C. та ін. (1991) і активно вивчається в клітинах дріжджів і людини, причому в останніх завдяки розкриттю генетичної природи таких захворювань, як пігментна ксеродерма (XP), синдром Кокейна (CS) і захворювання тріхотіодистрофія (TTD). Стратегія ЕРН в усіх випадках, від бактерії до людини, виявилася за даними Lehmann A.R. (1995) однаковою, хоча в міру ускладнення об'єкту кількість задіяних у реакції генів і їх продуктів зростає від 6-8 у *E. coli* до 30 у людини.

Цікавою особливістю ЕРН з'явилася, також, наявність особливої зв'язаної з транскрипцією її гілки, яка здійснює репарацію в найбільш важливих для клітини ділянках геному, що транскрибується. Дійсно, якщо ушкодження в нитці ДНК, що транскрибується (матричної), затримує просування РНК-полімерази, то спеціальний білковий чинник *TRCF* (transcription-repair coupling factor) зіштовхує РНК-полімеразу і зв'язує з цим місцем комплекс ферментів репарації. Чи діють усі ферменти системи ЕРН у складі єдиної "репаросоми" або ЕРН – це координований ансамбль окремих репараційних ферментів, поки не зрозуміло, проте безперечно існування складного ферментного комплексу, який прийнято називати "ексцизунуклеазою" і який здійснює перші три з

чотирьох основних стадій процесу ЕРН. У системі ексцизійної репарації ДНК шляхом видалення нуклеотидів пошкоджені азотисті основи вирізуються у складі олігонуклеотидів.

Ексцизійна репарація нуклеотидів (ЕРН) *E.coli*

В *E.coli* ексцинуклаза формується в результаті димеризації двох молекул білка *UvrA* за присутності АТР і зв'язування з однією молекулою *UvrB*. Гетеротример *UvrA2B* зв'язується з ДНК і за допомогою 5'-3'-ДНК-геліказної активності переміщається уздовж ДНК у пошуках ушкодження. Така передбачувана картина пізнання ексцинуклазою *UvrABC* неспецифічного ушкодження в ДНК встановлена Hoesjmakers J. (1993). Результатом пізнання ушкодження цим комплексом стане впровадження субодиниці *UvrB* у ДНК, що супроводжується конформаційними змінами ДНК у сайті впровадження (злами, локальна денатурація), дисоціація обох субодиниць *UvrA* з комплексу і наступне зв'язування з ним молекул *UvrD* і *UvrC*. Гетеродимер *UvrBC* із складу нового комплексу виконує два розриви в пошкодженій нитці ДНК на відстані 8 н. з 5'-кінця від ушкодження і 5 н. з 3'-кінця, каталізованих субодиницями *UvrC* і *UvrB* відповідно, що призводить до появи 12-13-мірного олігонуклеотиду, що витісняється з комплексу за допомогою гелікази *UvrD*. Пролом, що утворюється при цьому, заповнюється ДНК-полімеразою I, що синтезує ДНК по неушкодженій матриці, і зшивається ДНК-лігазою. Описаний процес залежить від АТР. Дійсно, АТР стимулює димеризацію молекул *UvrA*, а гідроліз АТР необхідний для утворення комплексу *UvrA2B* і прояву його геліказної активності. АТР, як встановили Friedberg E.C., Walker G.C. та ін. (1991), необхідна для формування комплексу *UvrB*-ДНК і, нарешті, для описаної вище бімодальної інцизії ДНК. В *E. coli* залежну для транскрипції гілку ЕРН (ТЕРН) здійснює продукт гена *mfd* (mutation frequency decline). Цей ген був відкритий за 35 років до того, як його продукт визнали чинником *TRCF*. Останній сприяє дисоціації РНК-полімерази від дефектної нитки ДНК, що транскрибується, і зв'язується з субодиницею *UvrA* ексцинуклазного комплексу. Іншими словами, саме білок *Mfd* відшукує ушкодження на нитці, що транскрибується, і направляє ТЕРН на цю мішень. Згідно з недавніми спостереженнями Melon I., Champl G.N. (1996), два головні білки системи ДКНО – *MutL*- і *MutS*-потрібні для ТЕРН. Причина такого взаємозв'язку систем ДКНО і ТЕРН або запозичення білків *MutL* і *MutS* для виконання схожих функцій доки залишається загадковою, хоча сам факт встановлений Sweder K.S., та ін. (1996), безперечний і знайшов підтвердження також і для білків *Msh2*, *Mlh1*, *Pms1* і *Msh3* у *S. cerevisiae*.

Ексцизійна репарація нуклеотидів (ЕРН) у людини

Великому прогресу в розкритті механізму ЕРН в еукаріот ми зобов'язані спадковому захворюванню людини – пігментній ксеродермі.

Вивчення молекулярних основ цього захворювання виявили їх зв'язаність з дефектами системи ЕРН, результатом чого і з'явилося розкриття генетичного контролю ЕРН. Комплементатійний аналіз, за даними Friedberg E.C., Walker G.C. та ін. (1991), різних клітинних ліній *XP* визначив 8 комплементатійних груп (7 від *XPA* до *XPG* і одна "варіантна форма" *XPV*), а комплементатійна корекція можливих ліній мутантів клітин китайського хом'яка, чутливих до УФ-світла, сприяла виявленню додаткових генів системи ЕРН. Останні дістали назву гени *ERCC* (excision repair cross-complimenting), і тому в назві генів і білків ЕРН використовуються обидві аббревіатури. Хоча деталі процесу ЕРН у людини не зрозумілі, оскільки не визначена роль цілого ряду генів, про що наполягають Lehmann A.R. (1995), Lindahl T. та ін. (1997), Hoesjmakers J. (1993). Білок *XPA* в комплексі з онДНК-зв'язуючим білком *RPA* (реплікаційним білком А), що транслokuється уздовж онДНК, пізнає конформаційні ушкодження. Взаємодіючи через іншу ділянку білка *XPA* з базальним чинником транскрипції *TFIIH* (дві з субодиниць якого, білки *XPB* і *XPD*, мають геліказну активність з протилежною орієнтацією розкручування онДНК), вони утворюють комплекс, який розплітає ДНК навколо ушкодження (до складу цього комплексу входить і білок *XPC* з незрозумілими

функціями). Через третю ділянку білка *XPA* до комплексу примикає гетеродімер *ERCC1-XPF*, який вносить одноланцюгові розриви в ДНК з 5'-кінця на відстані 16-25 н. від ушкодження, проте як білок *XPG*, що входить до комплексу білків ексцинуклеази через взаємодію з білком *RPA*, робить надріз з 3'-кінця на відстані 2-9 н. (у розрізанні бере участь і білок *XPC*, а білок *XPE* активує реакцію). У результаті бімодальної інцизії ділянка ДНК розміром близько 29 н. вивільняється, а пролом ресинтезується, що утворює за допомогою ДНК-полімерази епсилон, або ДНК-полімерази Δ , супутньої реплікації чинника *PCNA*, реплікаційного чинника *C-RFC* і ДНК-лігази I.

Представлена картина, описана Wood R.D. (1994), багато в чому заснована на реконструюванні процесу у відкритій системі за участю 10 добре очищених білків. Як помітно, еукаріотична система ЕРН лише функціонально подібна прокаріотичній. У ній задіяно значно більше білків, число яких повинне ще зрости за рахунок білків, що здійснюють розбирання і зборку хроматину. Розкриття природи ТЕРН у людини також зв'язують з розумінням молекулярного дефекту, що призводить до розвитку двох мультисистемних генетичних захворювань – синдрому Кокейна (CS) і трихотіодистрофії (TTD). При обох захворюваннях соматичні клітини хворих виявилися нездатні до ТЕРН. Класичні випадки CS виявилися пов'язаними з ушкодженнями в двох генах, *CSA* і *CSB*, а рідкісні змішані форми *CS+XP* (*CS* з додатковими симптомами *XP*), з ушкодженнями в генах *XPB*, *XPD* і *XPG*. При TTD, як віднайшли Lehmann A.R. (1995), Lindahl T. та ін (1997), дефекти були виявлені також в генах *XPB* і *XPD* і в новому доки не клонованому гені *TTDA*, продукт якого є частиною корового домену чинника транскрипції *TFIIH*.

Чинник *TFIIH* складається з 6 субодиниць, дві з яких – білки *XPB* і *XPD*. Зв'язуючись з білками РНК-полімеразного комплексу, кор *TFIIH* бере участь в ініціації транскрипції [Buratowski S., 1994], а у купі з білками репараційного комплексу кор цього чинника бере участь в ЕРН. Якщо припустити, що білки *CSA* і *CSB* сприяють перетворенню комплексу транскрипції на репараційний, що зробили Lindahl T. та ін. (1997), Bregman D.B. (1996), то наслідком ушкодження цих білків може стати дефектність у ТЕРН. Таким чином, або прямими діями на коровий домен чинника *TFIIH* (мутації в генах *XPB*, *XPD* і *TTDA*), або непрямыми (через гени *CSA* і *CSB*) можна модифікувати здатність цього чинника до дисоціації з РНК-полімеразним комплексом для участі в ТЕРН. Що стосується білку *XPG*, то він на думку Bregman D.B. (1996), подібно до свого гомолога з *S. cerevisiae* – білку *Rad2*, здатний взаємодіяти з *TFIIH*, що допускає можливість його дії на *TFIIH* для участі в ТЕРН. Такі гіпотетичні пояснення взаємозв'язку молекулярних дефектів при *CS* і *TTD* з порушеннями ТЕРН, що можуть бути корисними для розкриття механізму ТЕРН в еукаріот. Зв'язок же між молекулярними дефектами і клінічними проявами даних спадкових захворювань за ствердженням Kolodner R. (1995) доки не має навіть спрощених тлумачень.

Так сталося, що вивчення молекулярних механізмів ЕРН і ТЕРН на клітинах людини розвивалися паралельно, або навіть випереджаючи дослідження на популярній еукаріотичній моделі дріжджів *S. cerevisiae*. У таблиці 3 представлені відомі функціональні аналоги системи ЕРН у дріжджів. Поза сумнівом, проте, що при дослідженні детального механізму ЕРН саме ця модельна система гратиме провідну роль. Наприклад, важливою особливістю системи ЕРН в *E. coli* є її зв'язок з SOS-функціями клітини. Дійсно, центральні гени системи ЕРН, *uvrA* і *uvrB*, що віднайшли Friedberg E.C., Walker G.C. та ін. (1991), знаходяться під контролем SOS-регулону. Системи, подібною SOS, в еукаріот доки не виявлено. Проте цілий ряд генів системи ЕРН у дріжджів, таких, як *RAD2*, *RAD7*, *RAD23*, *CDC8* і *CDC9*, індукується при ушкодженні ДНК, а останні на думку Friedberg E.C., Walker G.C. та ін. (1991) два гени додатково регулюються клітинним циклом.

ЕРН (NER): генетика

Гени NER *E. coli*, *uvrA*, *uvrB* і *uvrC* не виявляють гомології з відповідними генами людини. Гени NER дріжджів і людини високогомологічні і ензімологія ексцизійної

репарації також має велику схожість. Принаймні, три захворювання у людини викликаються генетичними порушеннями системи ексцизійної репарації: пігментна ксеродерма, синдром Кокейна і тріхотіодистрофія.

Шкіра хворих пігментною ксеродермою має підвищену чутливість до денного світла, що проявляється у вигляді фотодерматозів, включаючи рак шкіри. У ряді випадків відмічено аномалії нервової системи, причиною яких є мутації в одному з семи генів: *XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPB*, *XPD*, *XPE*, *XPB*, *XPB*. Проте описані хворі з класичними симптомами пігментної ксеродерми, але з непорушеною системою *NER*. Для клітин цих хворих характерні зміни в так званій постреплікативній репарації.

Хворим з синдромом Кокейна властиві порушення зростання, розумова відсталість, катаракти, підвищена чутливість до світла з супутніми дерматозами. Виявлено мутації в двох групах генів, що призводять до цього захворювання. У хворих з генами мутантів *CS-A* або *CS-B* клітини здатні нормально репарувати УФ-ушкодження ДНК. В іншій групі хворих виявлено мутації в генах *XPB*, *XPD* або *XPB*.

У хворих тріхотіодистрофією із змішаними симптомами виявлені мутації в генах *XPB* або *XPD*. Класичні симптоми цього захворювання, мабуть, є наслідком мутації в гені чинника транскрипції *TFIIH*.

Отримання мутантів із зміненою *NER* у гризунів дозволило розбити такі гени на 11 груп комплементатії, більшість з яких відповідає групам комплементатії *XP* і *CS* людини. Частина відповідних генів людини вдалося клонувати, використовуючи їх здатність виправляти (комплементувати) генетичні дефекти в культивованих клітинах мутантів гризунів. Ці гени дістали назву крос-комплементуючих генів ексцизійної репарації (*ERCC* – excision repair cross complementing). Серед них гени *XPE* і *ERCC6-ERCC11* не були потрібні для проходження основних реакцій ексцизійної репарації, і їх функція невідома.

Таблиця 3

Білки тварин, що приймають участь у *NER*

Білкова система	Білки системи	Ферментативна активність	Функція у репарації
<i>XPA</i>	<i>XPA</i> (p31)	зв'язування ДНК	розпізнавання ушкодження
<i>RPA</i>	p70 p34 p11	зв'язування ДНК	розпізнавання ушкодження
<i>TFIIH</i>	<i>XPB/ERCC3</i> (p89) <i>XPD/ERCC2</i> (p80) p62 p44 <i>Cdk7</i> (p41) <i>CycH</i> (p38) p34	ДНК-залежна АТРаза, локальне рзплітання ДНК, фактор транскрипції, кіназа, що активує Cdk	утворення преініціального комплексу, поєднання й узгодження траскрипції й репарації
<i>XPC</i>	<i>XPC</i> (p125)/ <i>HHR23B</i> (p112)	зв'язування ДНК	?
<i>XPB</i>	<i>XPB/ERCC4</i> (p112) <i>ERCC1</i> (p33)	ендонуклеаза	5-кінцеве надрізання ДНК
<i>XPB</i>	<i>XPB/ERCC5</i> (p135)	ендонуклеаза	3-кінцеве надрізання ДНК

NER: структура і функції білків

У таблиці 3 підсумовані властивості білків тварин, що беруть участь у *NER*. Більшість цих білків існують *in vivo* у вигляді комплексів, тому ферментативні активності, такі, що виявляються в окремих білків в очищеному стані, можуть не мати прямого відношення до їх функцій в системі *NER*.

XPA – білок з молекулярною масою 31 кДа, має домен типу "цинкові пальці", бере участь у розпізнаванні пошкодженої ділянки ДНК, взаємодіє з іншими компонентами

системи і може функціонувати як чинник нуклеації для екзонуклеази. *XPA* взаємодіє своїм N-кінцевим доменом з гетеродимером *ERCC1-XPF*, а C-кінцевим доменом – з *TFIIH*.

Білок *RPA (HSSB)* утворює комплекс з *XPA* і посилює його специфічність відносно пошкодженої ДНК. *RPA (HSSB)* – тример, що складається з білкових субодиниць *p70*, *p34* і *p11*, необхідний для реплікації ДНК і репаративного синтезу, а також для проходження етапу подвійного надрізу ДНК під час ексцизійної репарації. Він має помірну спорідненість до пошкодженої ДНК.

TFIIH – олігомерний комплекс, до складу якого входять білки *p89*, *p80*, *p62*, *p44*, *p41*, *p38* і *p34*. Цей білковий комплекс був відкритий як один з семи основних чинників транскрипції, необхідних для ефективного функціонування РНК-полімерази II. Субодиниця *p89* ідентична білку репаративного комплексу *XPB*. Виявлена відсутність функціональної комплементации між безклітинними екстрактами клітин із білками мутантів *XPB* і *XPB*, визначальною по відновленню репаруючої активності в змішаних екстрактах. Комплекс *TFIIH* є чинником репаративної системи. Білки *XPB* і *XPB* є ДНК-залежними АТРазами, мають геліказні домени і можуть (як і сам чинник *TFIIH*) викликати дисоціацію гібридів, утворених між короткими фрагментами ДНК і одноланцюговою ДНК.

XPC – білок з молекулярною масою близько 125 кДа, існує у вигляді гетеродимеру в комплексі з білком *p58*, який є гомологом білку *Rad23* дріжджів (*HHR23B*). *XPC* слабо зв'язується з *TFIIH* і дуже міцно – з одноланцюговою ДНК.

ERCC1/XPF – міцний білковий комплекс, з яким взаємодіє білок *XPA*, що має ендонуклеазну активність, специфічну відносно одноланцюгової ДНК.

XPB – білковий комплекс, що має ендонуклеазну активність, специфічну відносно одноланцюгової ДНК; залучається до ексцизійного комплексу за допомогою взаємодії з *TFIIH* і *RPA*.

PARP (ПАРП): моделі управління процесом ексцизійної репарації ДНК

ПАРП – один з перших ядерних чинників, що розпізнають ушкодження ДНК, і тому в ідеальному випадку управляє запуском механізму репарації ДНК у живих клітинах з місця ушкодження ДНК. Ця модель підтримується ідентифікацією ЕР-комплексу, включаючого *ПАРП*, *XRCC1*, ДНК-лігазу III і ДНК-полімеразу β . Присутність *ПАРП* у такому мультипротеїновому комплексі доводить, що цей фермент може направляти апарат репарації ДНК до сайтів ушкодження ДНК *in vivo* і полегшує здійснення репарації по цьому шляху.

XRCC1-білок діє як молекулярні "ліси", формуючи ЕР-комплекс шляхом індивідуальної взаємодії з кожним компонентом. Відколи була виявлена можливість полі(АДФ-рібозил)ювання *XRCC1*-білка *in vitro*, можна припустити, що *ПАРП* здатний регулювати активність комплексу шляхом модифікування *XRCC1*-білка *in vivo* і порушувати його здатність взаємодіяти з іншими компонентами комплексу. Було показано, що надекспресія *XRCC1*-білка пригнічує активність *ПАРП* у живих клітинах.

Аналогічно ДНК-лігаза III інгібує активність *ПАРП in vitro*, коли її кількості перевищують кількості *ПАРП*.

ПАРП може також рекрутувати чинники репарації ДНК шляхом модифікації хроматинових білків. Довгі ланцюги *ПАР* дійсно здатні направити ферменти репарації до сайтів розривів ДНК значно швидше, ніж якщо вони шукають ушкодження самі по усьому ядру. Така модель узгоджується з активністю *ПАРП* перед і/або після видалення пошкоджених підстав.

NER: механізм

Процес NER можна розділити на чотири етапи:

- а) розпізнавання пошкодженої ділянки ДНК;
- б) подвійне надрізання (інцизія) ланцюга ДНК по обох сторонах пошкодженої ділянки і його видалення (ексцизія);
- в) заповнення пролomu в процесі репаративного синтезу;

г) лігування одноланцюгового розриву ДНК, що залишився.

NER людини розпізнає і видаляє поодинокі помилково спарені нуклеотиди, а також петлі завдовжки в 1-3 нуклеотиди. NER людини здатна розрізняти ланцюги ДНК у разі розпізнавання пошкоджених нуклеотидів. Показано, що за наявності в ДНК димерів тиміну циклобутанового типу вирізування нуклеотидів походить виключно з пошкодженого ланцюга. Механізм такого розпізнавання нині невідомий, як і молекулярний механізм пізнання самих пошкоджених підстав. Система здатна розпізнавати ушкодження як сильно, так і ДНК, що слабо деформує вторинну структуру. При цьому не виявлена лінійна залежність між коефіцієнтом специфічності нуклеази (kcat/km) і рівнем деформації подвійної спіралі ДНК. Показано, що в процесі розпізнавання беруть участь білкові комплекси *XPA/RPA*, що переважно зв'язуються з пошкодженою ДНК, і *TFIIH*, АТР-залежною і володіючою ДНК-розплетаючою активністю. Останній взаємодіє з пошкодженою ділянкою ДНК і за аналогією з відповідним механізмом у *E. coli* локально розкручує ДНК, створюючи основний преінцізійний комплекс із пошкодженою ДНК.

Встановлено, що три ферменти репарації, що мають вузьку субстратну специфічність: ДНК-фотоліаза (видалення піримідинових димерів), урацилглікозілаза (видалення урацилу з ДНК) і екзонуклеаза III (гідроліз ДНК в AP-сайтах), втягують пошкоджену ділянку з подвійної спіралі в порожнину ферменту, що приводить кофактор або амінокислотні залишки активного центру цих ферментів у безпосередній контакт з розщеплюваними зв'язками ДНК. Не виключено, що система ексцинуклази діє так само.

Основні етапи функціонування NER, що тривають за розпізнаванням пошкодженої ділянки ДНК, представлено на рисунку 72. Після зв'язування комплексу *XPA-RPA* із зміненою ділянкою ДНК, *XPA* взаємодіє з комплексом *TFIIH*, який створює преінцізійний комплекс, що зв'язано з гідролізом АТР. АТР-залежне розплітання ДНК комплексом *TFIIH* готує її до взаємодії з двома *XP*-білками, що мають нуклеазну активність. *XPB* зв'язується з *TFIIH* і вносить одноланцюговий розрив із 3'-кінця ушкодження. Аналогічно комплекс *ERCC1-XPF* взаємодіє з *XPA* у складі преінцізійного комплексу і сприяє одноланцюговому розриву з 5'-кінця ушкодження. Утворення обох розривів є АТР-залежним, і їх розташування на ДНК високоспецифічно. Як правило, відбуваються розриви 5-ою і 24-ою фосфодієфірними зв'язками відповідно від 3'- і 5'-кінців пошкоджених ділянок. Проте розташування точок розривів може варіюватися.

Таким чином, у результаті подібних одноланцюгових надрізів ДНК може звільнятися фрагмент завдовжки 24-32 нуклеотиди з переважанням фрагментів завдовжки 27-29 нуклеотидів. На розташування сайтів одноланцюгових розривів впливають характер ушкодження і послідовності нуклеотидів (контекст), що оточують пошкоджену ділянку. Ту ж саму картину інцизії виявляють *in vivo* в ооцитах *Xenopus* і у *Schizosaccharomyces pombe*. На цій підставі роблять висновок про універсальний механізм ексцизійної репарації в еукаріот.

Репаративний синтез ДНК у людини є PCNA-залежним, тобто може здійснюватися за участю ДНК-полімераз *Pol δ* і *Pol ε*. PCNA зв'язується з системою праймер-матриця під дією чинника реплікації RFC, звідки витікає, що останній також бере участь в репаративному синтезі ДНК. У дослідках з безклітинними системами моноклональними антитілами до *Pol δ* специфічно пригнічують репаративний синтез. Проте виявилось, що в тих же високоочищених безклітинних системах замість *Pol δ* з аналогічним ефектом можуть бути використані *Pol ε* і навіть фрагмент Кленова ДНК-полімерази I *E. coli*. Це означає, що реконструйовані з очищених компонентів безклітинні системи лише в обмеженій мірі імітують біохімічні процеси, що відбуваються в живих клітинах. Вважається, що обидва ДНК-полімерази – *Pol δ* і *Pol ε* беруть участь у репаративному синтезі ДНК у людини.

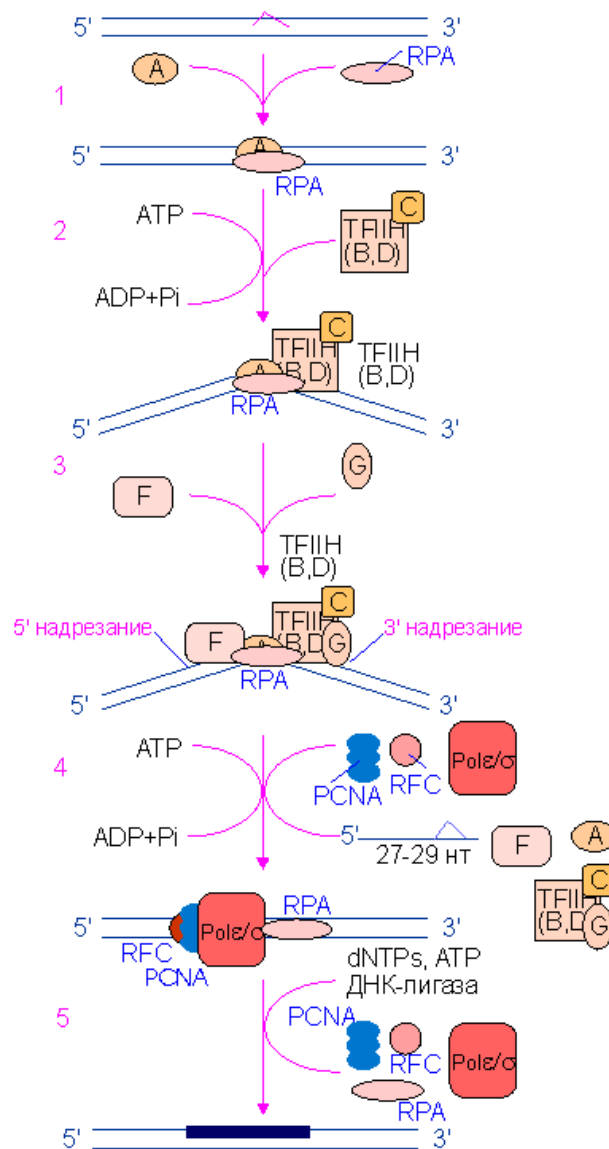


Рис. 72. пат Модель ексцизійної репарації у ссавців
(A-F – продукти генів XPA-XPF)

EPH (NER): сполучення з транскрипцією (ТЕРН)

Послідовності нуклеотидів ДНК, що транскрибуються, особливо в матричному ланцюзі, репаруються з більшою швидкістю, ніж послідовності, що не транскрибуються. У клітинах хворих із синдромом Кокайна не спостерігається такої асиметрії в репарації.

У клітинах *E.coli* білковий чинник, кодований геном *mfd* і що сполучає транскрипцію і репарацію, заміщає молекули РНК-полімерази, що зупинилися перед ушкодженням, що призводить до дисоціації комплексу транскрипції. При цьому він залучає екзонуклеазний репаративний комплекс до пошкодженої ділянки ДНК.

У клітинах тварин ген *CSB* кодує білок з молекулярною масою 160 кДа, який містить геліказний домен і, можливо, виконує ті ж функції, що і білок *Mfd* у *E. coli*. На підставі поведінки клітин з генами мутантів білків *CSA* і *CSB* розроблена модель механізму, за допомогою якого забезпечується асиметрична репарація ланцюгів ДНК. Відповідно до цієї моделі РНК-полімераза II, що зупинилася в процесі транскрипції перед пошкодженою ділянкою ДНК, розпізнається комплексом *CSA-CSB* і переміщається у бік від ушкодження без руйнування четвертинної структури комплексу транскрипції. Одночасно комплекс *CSA-CSB* залучає компоненти репаративної системи *XPA* і *TFIIH* до місця ушкодження ДНК і допомагає зборці ексцизунклеазного комплексу. Нуклеотиди

пошкодженого ланцюга вирізуються, і пролом репарується. Після цього РНК-полімераза у складі комплексу транскрипції продовжує транскрипцію.

NER: регуляція

Для клітин тварин не характерна SOS-відповідь, властива клітинам *E. coli* і що є сумарною реакцією бактерійної клітини на uszkodження ДНК різними агентами, проявляється в посиленні транскрипції генів NER. Посттрансляційні модифікації білків репарації, що відбуваються у відповідь на uszkodження ДНК, не впливають на активність ексцинуклеази людини. Виявлено, що uszkodження ДНК стабілізує білок *p53* – білок-супресор пухлинного зростання, що є регулювальником транскрипції. Є дані про те, що білок *p53* може взаємодіяти з білками *XPB* і *RPA*, необхідними для NER. Проте клітини з інактивованими генами *p53* (*p53*(-/-)), як і клітини дикого типу, ефективно видаляють з пошкодженої ДНК два основні фотопродукти, що виникають під дією УФ-світла, і мають таку ж стійкість до УФ. Тому вважається, що білок *p53* не чинить прямого впливу на NER. Білки *Cdk7* і *циклін H*, які утворюють *Cdk*-активуючу кіназу, входять до складу комплексу *TFIIH*, що дозволяє припускати наявність зв'язку репарації ДНК з фазами клітинного циклу.

BER (ексцизійна репарація видаленням пошкоджених основ)

Ексцизійна репарація ДНК шляхом видалення пошкоджених азотистих основ (BER) викликає захист ДНК генома від uszkodжень алкіліруючими агентами і ендогенними генотоксичними з'єднаннями. Біологічна функція ЕРО полягає у відновленні початкової структури модифікованих основ ДНК. Ця система на думку Lindahl T. (1993), Lindahl T. та ін. (1997) високоспецифічна.

BER починає функціонувати з відщеплення помилково включених або модифікованих основ від дезоксирибози під дією ключового ферменту – ДНК-глікозилази, що має здатність відщепляти велике число модифікованих основ ДНК (рис. 73). До складу системи (BER) входять спеціалізовані ДНК-глікозилази, які пізнають і видаляють пошкоджені підстави; АР-ендонуклеази або АР-ліази, які, відповідно, розщеплюють нитку ДНК з 5'- або 3'-кінця апуринового або апіримідинового (АР) сайту; фосфодіестераз (відповідно 5' або 3'), які вищеплюють дезоксирибофосфатний залишок, і, нарешті, ДНК-полімерази і ДНК-лігази. В процесі BER може відбуватися видалення і інших похідних, що утворюються під дією хімічних мутагенів і вирізування етонопуринових похідних основ, що утворюються під дією вінілхлориду, а також С8-аддуктів амінофлуорену із залишками гуаніну.

АР-дезоксирибоза (apurinic/apyrimidinic deoxyribose), що утворилася в результаті видалення модифікованої азотистої основи апуринового/апіримідинового (АР-) сайту, далі вирізується за допомогою АР-ліази, яка звільняє її 3'-кінець, і АР-ендонуклеази, що гідролізує її 5'-кінцевий фосфодієфірний зв'язок в АР-сайті (рис. 74). Однонуклеотидний пролом у подальшому заповнюється за допомогою ДНК-полімерази, і фосфодієфірний зв'язок відновлюється в реакції лігування. В *E. coli* репаративний синтез ДНК виконує ДНК-полімераза I, у дріжджів – ДНК-полімераза Δ. З трьох ДНК-лігаз, що мають клітини тварин, у BER, мабуть, бере участь ДНК-лігаза III.

Проводяться дослідження механізмів сполучення BER з іншими генетичними процесами: транскрипцією, реплікацією ДНК і регуляцією клітинного циклу. Ушкодження ДНК, пов'язане з появою некодуючих (АР-) ділянок менш небезпечні для клітин, оскільки вони допускають здійснення повноцінної постреплікативної репарації ушкоджень, ніж поява помилково кодуючих основ, що призводять до мутацій. ДНК-глікозилази, що беруть участь у BER, здатні переводити сайти, що містять модифіковані основи (наприклад, ураціл), в некодуючі сегменти одного з ланцюгів ДНК. Урацилглікозилази, що асоціюються з білковими комплексами реплікативних вилок, ефективно діють на одноланцюгові ДНК, і їх активність регулюється під час клітинного циклу.

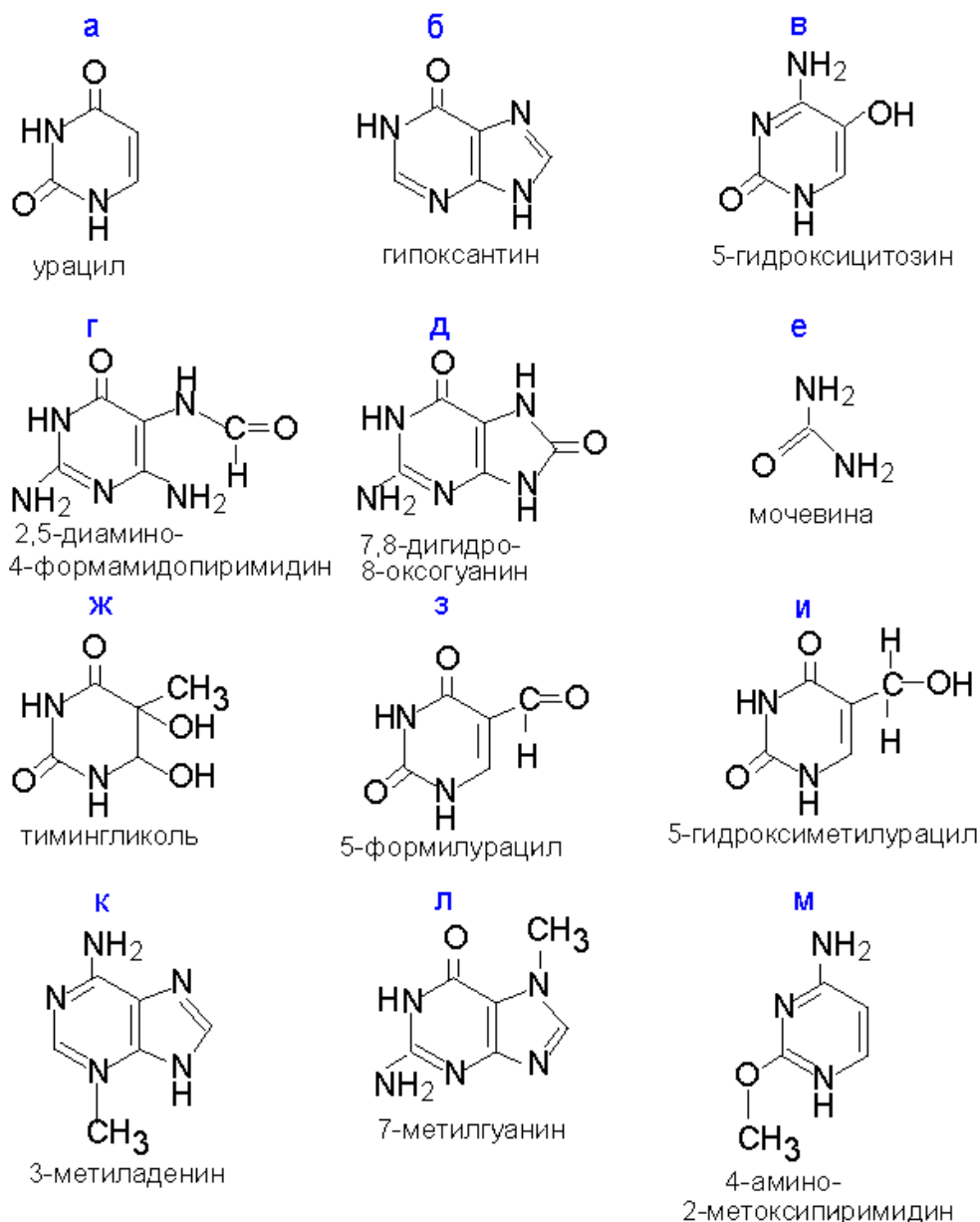


Рис. 73. пат Модифіковані основи ДНК, що видаляються під час BER

До кінця 90-х років з бактерій (*E. coli*, *Micrococcus luteus* та ін.) виділено до 8 різних N-глікозілаз, здатних репарувати усі відомі модифікації основ. Декілька різних активностей за даними Seeberg E., Eide F., Bjoras M. (1995) виявлено в дріжджах-сахароміцетах і в клітинах людини.

Ефективна репарація неспарених основ, про що вказує Kubota Y., et al. (1996) U-G до C:G проведена *in vitro*. Реакція вимагала урацил-ДНК-глікозилази, AP-ендонуклеази, ДНК-полімерази β і лігазної активності, що забезпечується гетеродімером лігаза III/білок XRCC1. Проте пошук генів-гомологів доки не можна визнати успішним. Вони знайдені доки тільки для урацил-ДНК-глікозилази (гени *ung*, *UNG* і *hUDG* у клітинах *E. coli*, *S. cerevisiae* і людини відповідно); індукційною поліфункціональною глікозилази *AlkA* з *E. coli*, репаруючою різноманітні продукти метілування основ, яка виявилася Seeberg E., Eide F., Bjoras M. (1995) гомологічною N-глікозилазі *MAG* з *S. cerevisiae* і аналогічна глікозилазі *MPG* з клітин людини, і формамідопірідину ДНК-глікозилази *Fpg* з *E. coli*, гомолог якої знайдений в клітинах *S. cerevisiae*.

У цілому, система ЕРО – надзвичайно дієвий бар'єр мутаціям основ. Яскравим прикладом цьому є потрійна система захисту ДНК від окислення гуанінів, виявлена

Kolodner R. (1995), Friedberg E.C., Walker G.C. та ін. (1991) у *E. coli*. Як в будь-якій іншій репаративній реакції, в системі ЕРО завершуючим є ресинтетичний етап, поновлюючий правильність спаровування за допомогою ДНК-полімерази І (у *E. coli*) і ДНК-лігази. Природно, що така витончена система спеціалізованого захисту не могла не виявитися універсальною: активності, властиві білкам *MutT*, *MutM* і *MutY*, як і ендонуклеази ІІІ, вже виявлено у *S. cerevisiae* і людини. Проте доки не знайдено гени, що кодують ці і інші N-глікозилази вищих. Не знайдено, також, і генетичні захворювання, пов'язані з порушенням системи ЕРО.

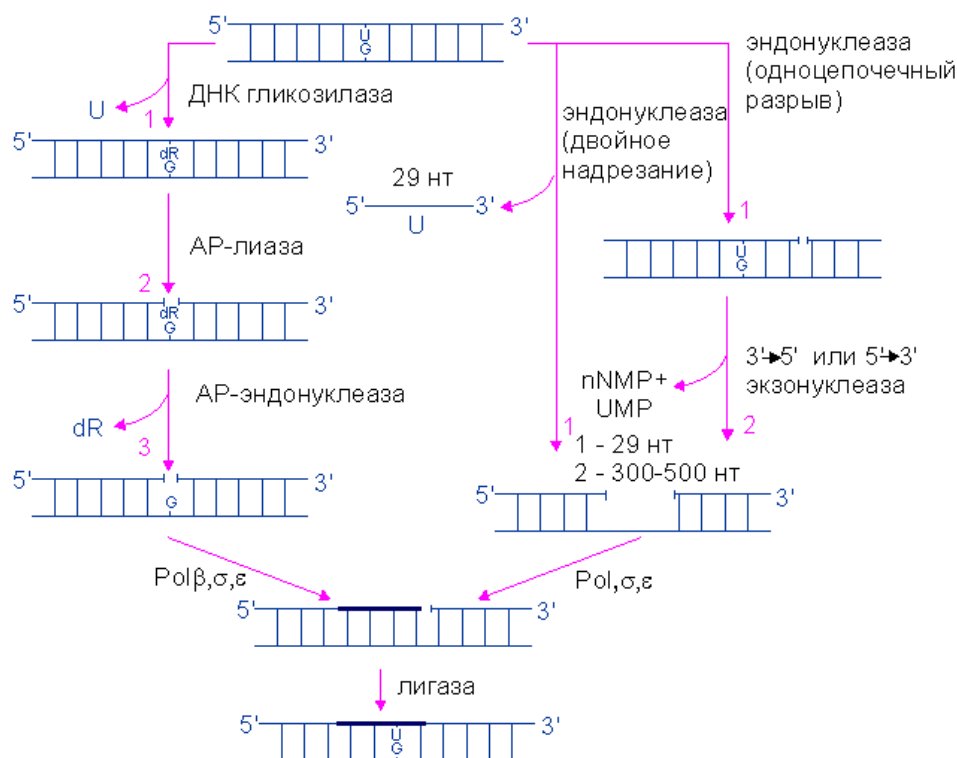


Рис. 74. Ексцизійна репарація у тварин (BER та NER)

RAD50: Репарація двониткового розриву ДНК (DSBR)

Rad50: дослідження ролі в репарації двониткових розривів ДНК

Для з'ясування ключової ролі *Rad50* в репарації двониткових розривів ДНК (DSBR), Hopfner K-P, Karcher A, et al., (2000) біохімічно і структурно охарактеризували АТФ-пов'язаний і вільний від АТФ каталітичний домен *Rad50* (*Rad50cd*) *Pyrococcus furiosus*. *Rad50cd* проявляє АТФазну активність, а також АТФ-пов'язану димерізаційну ДНК-пов'язуючу активність. На кристалічних структурах *Rad50cd* виявлені ділянки потенційної взаємодії з ДНК, а також встановлено елементи вторинної структури, відповідні зв'язки *Rad50* з АВС-переносниками, включаючи Р-глікопротеїни і регулювальника трансмембранної провідності пузирчастого фіброзу. Зв'язування гамма-фосфату АТФ з консервативними мотивами в двох молекулах *Rad50*, що протилежать, сприяє димерізації, пов'язаній, ймовірно, з гідролізом АТФ і вивільненням ДНК. Вказані результати, підтверджені мутаціями, припускають єдиний молекулярний механізм для АТФ-керованої кооперативності і алостеричного контролю АВС-АТФаз при DSBR, мембранного транспорту і конденсації хромосом за допомогою білків SMC.

ДНК: двониткові розриви (DSB)

Двониткові розриви ДНК (DSB) представляють загрозу для стабільності геному і їх репарація (DSBR) є істотною для виживання клітини і запобігання раку (Game, 1993; Zdzienicka, 1996; Petrini та ін., 1997; Camey та ін., 1998; Varon та ін., 1998; Luo та ін., 1999; Stewart та ін., 1999).

DSB індукуються позаклітинними агентами, такими, як іонізуюча радіація і генотоксичні хімічні продукти, що спонтанно виникають у процесі реплікації ДНК і утворюються на нетривалий час у процесі мейозу або рекомбінації *V(D)J* в імунній системі (Ward, 1988; Bieme та ін., 1997; Gellert, 1997; Michel і др. 1997).

ДНК: двониткові розриви: репарація (DSBR)

DSB репаруються за допомогою гомологічної рекомбінації (*HR*) і з'єднанням негомологічних кінців (Leach, 1996). *HR* возз'єднує кінці ДНК без втрати інформації за допомогою матриці сестринської хроматиди (Kadyk і Hartwell, 1992). В протилежність цьому, при *NHEJ* кінці ДНК часто коротшають і цей варіант є потенційно мутагенним (Roth і Wilson, 1988; Phillips і Morgan, 1994). Для обох варіантів репарації DSB (DSBR) необхідним є комплекс *Rad50/Mre11/Nbs1*, що функціонує також при формуванні тіломіри і перевірці ушкоджень ДНК (Haber, 1998).

Роль *Rad50/Mre11/Nbs1* в усіх вказаних явищах з'ясована погано; для її розуміння бракує загального механізму.

Комплекс *Rad50/Mre11/Nbs1* і репарація DSBR

Для репарації двониткових розривів ДНК (DSBR) необхідно комплекс *Rad50/Mre11/Nbs1*, що функціонує також при формуванні тіломіри і перевірці ушкоджень ДНК (Haber, 1998).

Двониткові розриви ДНК: репарація (DSBR). Білок *Rad50*. Gene: [05q31/RAD50] RAD50 (*S. cerevisiae*) homolog

Rad50 і *Mre11*, але не *Nbs1* (чи *Xrs2* дріжджів) виявлено у представників усіх царств живих організмів (Aravind та ін., 1999), що припускає формування *Rad50/Mre11* основи комплексу DSBR.

Rad50 володіє АТФ-залежною ДНК-зв'язуючою і частковою ДНК-розплітаючою активностями (Raymond і Kleckner, 1993; Paull і Gellert, 1999), а для dsДНК-екзонуклеазної активності гомологів *E.coli SbcC/SbcD* необхідно АТФ (Connelly та ін., 1997). Мутації в нуклеотидзв'язуючому мотиві *Rad50* дріжджів мають нульовий фенотип по DSB-репарації і мейозу, що припускає істотність зв'язування АТФ і/або гідролізу *in vivo*, оскільки деякі мутації в районі нуклеотидзв'язуючої ділянки (іменованих для розподілу функцій *rad50S*) призводять до порушень мейотичних, але не мітотичних DSBR (Alani і др, 1990).

Таким чином, розуміння основної ролі *Rad50* у мейозі і DSBR вимагає розгляду АТФ-залежної активності *Rad50*.

Білок *Rad50* масою 150 кДа представляє собою послідовність АТФ-зв'язуючого/каталітичного домена (*Rad50cd*), гептаповтором, що переривається, який володіє завдовжки від 600 до 900 а.о. N-кінцевий мотив Уолкера А і С-кінцевий мотив Уолкера В фланкують повторення (Walker та ін., 1982). Архітектура послідовності характеризує структурну організацію хромосомного сімейства *SMC* (Strunnikov і Jessberger, 1999; Holmes і Cozzarelli, 2000) і припускає, що антипаралельне збирання молекул *Rad50* призводить до створення двох *Rad50cd*, сполучених подвійною спіраллю (Saitoh та ін., 1995; Melby та ін., 1998).

Rad50cd домен

Rad50cd усіх просторових аналогів *Rad50* виявляють гомологію з АТФ-зв'язуючим комплексом (ABC) АТРаз (Aravind та ін., 1999), що має на увазі загальну тривимірну структуру і каталітичний механізм.

Білковий домен ABC АТРаз

Домени ABC АТРаз представляють собою відомі нуклеотидзв'язуючі домени (NBD), що включають ABC-переносників (транспортних АТРаз), що мають важливість в біомедичному відношенні – глікопротеїн *P* і регулювальник мембранної провідності при пухлинному фіброзі (Doige і Ames, 1993; Gadsby і Nairn, 1999; Holland і Blight, 1999; Jones і George, 1999).

ABC-переносники часто виявляють кооперативний гідроліз АТФ, аллостерично регульований зв'язуванням ліганда (Davidson і Nikaido, 1990; Liu і Ames, 1997). Отримання кристалічних структур АТФ-зв'язуючих NBD гістідінпермеази, *HisP* (Hung та ін., 1998) і переносника рібози, *RbsA* (Armstrong та ін., 1998) стали великим досягненням, оскільки були ідентифіковані двочленні АТФ-азні домени.

Rad50: роль зв'язування і гідролізу АТФ при DSBR

Для розшифровки ролі зв'язування і гідролізу АТФ за допомогою *Rad50* при DSBR біохімічно охарактеризовано і визначено за допомогою рентгеноструктурного аналізу структури АМР-РNP-Mg²⁺-пов'язаного (негідролізованого аналога) і АТФ-вільного каталітичного домена ортолога *Rad50 Pyrococcus furiosus* (*Rad50cd*). Також розшифрували структуру *Rad50cd*, пов'язаного з АТФ у відсутності Mg²⁺, що підтвердило спорідненість структур АМР-РNP. Два *Rad50cd* асоціюють у вигляді АТФ-залежної форми для утворення ДНК-подібного зв'язуючого жолобка як взаємодіючої поверхні. Таким чином, *Rad50* здатний регулювати зв'язування ДНК і вивільнятися після успішного процесингу в комплексі з *Mre11*. Мутації *Rad50S* утворюють кластери на поверхні, припускаючи, що причиною виникнення фенотипу *rad50S* є швидше дефект взаємодії мейозоспецифічного білку, ніж порушення АТФ-зв'язування/гідролізу. Порівняння АТФ-вільного і АТФ-зв'язаного станів *Rad50cd* виявляє роль мотиву пізнавання ABC і пропонує молекулярний механізм для взаємодії і аллостеричного контролю гідролізу АТФ у ABC-АТФаз: мотив пізнавання сприяє об'єднанню *Rad50cd* за допомогою зв'язування АТФ протилежної молекули. АТФ-індуковане об'єднання *Rad50cd* було порушене у мутанта за мотивом пізнавання, *S793R*, свідчивши про те, яким чином аналогічна мутація *CFTR* у природних умовах може привести до пухирчастого фіброзу. Разом узяті, ці біохімічні і структурні результати підтримують припущення про існування єдиного структурного механізму функціонування *Rad50*, NBD переносників ABC і білків SMC.

Rad50 Pyrococcus furiosus (pf) у DSBR: дослідження функції і структури

Rad50 Pyrococcus furiosus (pf) утворює комплекс з *pfMre11* із властивостями, подібними до таких як *Rad50/Mre11* людини, так і *SbcC/SbcD E.coli* (Horfner та ін., у пресі). Для дослідження біохімії *Rad50*, а також для перевірки того, чи утворюють N- і C-кінцеві сегменти згаданих послідовностей АТФ-зв'язуючих доменів функціональний домен, було експресовано амінокислотні залишки *pfRad50* з 1-го по 152-й (сегмент N) і з 735-го по 882-й (сегмент C) і вивчено їх збірку і взаємодії з АТФ і ДНК. На всіх стадіях очищення сегмент N і сегмент C, очищені як єдиний комплекс, визначалися як каталітичний домен *Rad50 (Rad50cd)*. Встановлена за допомогою центрифугування і гел'фільтраційної хроматографії молекулярна вага 35 кДа (дані не приведені) відповідає передбаченій молекулярній вазі *Rad50cd* в 35 кДа. Ці результати, а також електронна мікрографія *SbcC/SbcD* (Connolly та ін., 1998) і білків SMC (Melby та ін., 1998) підтримують уявлення про збірку двох антипаралельних поліпептидів *Rad50*, що призводить до виникнення двох "голів" *Rad50cd*, сполучених суперспіраллю, причому ця структура подібна до двоголового змія.

Для встановлення того, чи володіє *Rad50* ферментативною активністю, виміряно міру гідролізу АТФ *Rad50cd* і повнорозмірним комплексом *pfRad50/pfMre11*. Як *Rad50cd*, так і комплекс *pfRad50/pfMre11* розщеплюють АТФ дуже повільно, припускаючи наявність у *Rad50* швидше за функцію перемикача, ніж функції рухової або геліказної. Комплекс *pfRad50/pfMre11* лише удвічі ефективніший від *Rad50cd*, підтверджуючи, що *Rad50cd* – внутрішній каталітичний домен. Гідроліз відповідає діапазону від 0,01 до 0,65 ммоль АТФ/мін/міліграма, позначеного для NBD ABC-переносників (Holland і Blight, 1999) і, таким чином, співвідноситься із загальним механізмом дії ABC, – АТФаз при DSBR і мембранному транспорті (Aravind та ін., 1999).

АТФ-залежна димеризація двох Rad50cd сприяє зв'язуванню ДНК

Вивчено дії АТФ на димеризацію двох *Rad50cd* за допомогою аналітичного центрифугування (AUC) і динамічного розсіювання світла (DLS). Виміряна при AUC маса

— 31 кДа без АТР і 66 кДа – з АТР, що вказує на АТР-залежну димерізацію *Rad50cd*. DLS показало середню молекулярну масу (MW) 33-38 кДа без АТР і 55-60 кДа з АТР, що узгоджується з гомодимерною асоціацією двох елонгованих *Rad50cd*. NBD ABC-переносники гомологічні за послідовностями *Rad50* і, напевно, функціонують як димери (Nikaido Ames, 1999). Електронно-мікроскопічні дослідження і відтворення субодиниці глікопротеїну *P* не виявили наявності контакту між двома NBD (Rosenberg та ін., 1997). Одержані результати можуть пояснити цю невідповідність у тому випадку, якщо димерізація NBD опосередковує АТР і підтримує цикл АТР-залежної асоціації/дисоціації для ABC-переносників (Liu та ін., 1999).

Визначено нуклеотидспецифічність димерізації *Rad50cd* за допомогою DLS. У відсутності нуклеотидів або у присутності АДФ, GTP або ЦТФ MW, що виявляється, складала 35-40 кДа, що відповідає мономеру *Rad50cd*. У присутності АТР, дАТР або негідролізованого аналога АТР АМР-РМР MW складала 60-65 кДа, що відповідало гомодимеру *Rad50cd*. Нуклеотидспецифічність відповідає специфічності нуклеотидзалежного зв'язування ДНК для еукаріотичного *Rad50* (Raymond і Kleckner, 1993). Обидва експерименти показали близьку кореляцію між зв'язуванням АТР і димерізацією, а також між димерізацією і зв'язуванням ДНК *Rad50*.

Для перевірки впливу АТР на зв'язування ДНК *Rad50cd* проведено експерименти зі зрушення електрофоретичної рухливості з використанням dsДНК у присутності і за відсутності АТР. У присутності АТР *Rad50cd* виявляє велику ДНК-зв'язуючу активність. У відсутності АТР зв'язування ДНК було слабким і виникає лише при високих концентраціях білку. Велике збільшення молекулярної маси комплексу ДНК-*Rad50cd* було повністю зворотно при використанні SDS; таким чином, це збільшення не є результатом білок-незалежної агрегації ДНК або ковалентного зв'язування.

Rad50 структура АТРазного домену

Кристали не пов'язаного з АТР *Rad50cd* було піддано дифракційному аналізу з дозволом 1,6 А, експериментальні дані було отримано в результаті множинних ізоморфних заміщень і аномальної дифракції з наступними процедурами модифікації щільності. Високоякісна картина електронної щільності, що утворилася, дозволила простежити поліпептидний ланцюг обох сегментів АТРази. Завершальна модель показує, що амінокислотні залишки Сегменту N з 1 по 149 і такі Сегменту C з 735 по 882 формують міцний комплекс, відповідний отриманим біохімічним результатам. *Rad50cd* має габарити 70×40×25 А, утворений двома сегментами, що складаються в єдиний еліпсоїдний домен з опуклою і увігнутою сторонами. Сегмент I складається переважно зі Сегменту N, подібного альфа/бета-циліндру, утворюваного упаковкою альфаА проти антипаралельного бета-листа (бета-лист-I) із сполученими водневими зв'язками бета-тяжами в наступному порядку: 7, 6, 5, 4, 1, 2. Сегмент II утворений переважно Сегментом C як бета-альфа-бета-сендвіч, сформований упаковкою альфаЕ, альфаF і альфаG між п'ятихтяжевим змішаним бета-листом (бета-листом II, що містить тяжи 11, 12, 3, 13 і 14) і трехтяжевим антипаралельним бета-листом (бета-листом III, що містить тяжи 8, 9 і 10). Два сегменти об'єднано в єдиний домен центральним бета-листом II, що містить як бета-тяжи Сегменту N (бета3), так і такі Сегменту C (бета11, 12, 13, 14). Нуклеотидзв'язуючий сайт, утворений мотивом Уолкера А (Р-петля) розташований в Сегменті I біля місця взаємодії обох сегментів і може сполучати зв'язування/гідроліз АТР із структурними змінами в Сегменті II. Загальна структура, HisP (Hung, що нагадує, та ін., 1998) показує, що *Rad50* належить до сімейства ABC АТРази. Істотна нова деталь структури *Rad50* – утворення єдиного домена ABC-АТРази з двох окремих поліпептидних ланцюгів.

Аналіз послідовності підтверджує, що довга суперспіраль ініціюється альфаD і альфаЕ. Хоча деструктурирована ділянка 6xHis явно перешкоджає утворенню ядра спіралі, гідрофобний жолобок між альфаЕ і альфаF може адаптувати альфаD, в якій відповідні залишки *HisP* утворюють невелику спіраль (Hung та ін., 1998). Ці структурні результати підтверджують, що два домени *Rad50cd* сполучені протяжною, такою, що

становить приблизно 700 А, ділянкою, що спіралізує, співпадаючою з двома змієподібними голівками, що спостерігаються при електронній мікрографії комплексу *Rad50/Mre11*.

Консервативні і функціональні мотиви *Rad50* і NBD *CTFR*

Структурне вирівнювання між ортологами *Rad50* і NBD *CTFR* виявляє мотиви Уолкера А і В. Було також виявлено, що *Rad50* містить "мотив пізнання", ключовий мотив ABC-переносників, чого не можна було укласти на підставі кристалічної структури *HisP* (Hung та ін., 1998). Оскільки *Rad50* має схожі по відношенню до білка *SMC* топологію і характеристики послідовності (Dolganov та ін., 1996; Connelly та ін., 1998; Melby та ін., 1998), порівняно асоційований з хромосомами білок *E* людини (Schmiesing та ін., 1998) із структурним вирівнюванням *Rad50* ABC-АТРаз. Виявлено істотну консервативність елементів, властивих ABC-АТРадам, переважно мотиву пізнання. Ця несподівана консервативність мотиву пізнання дозволяє припустити, що білки *SMC*, *Rad50* і NBD ABC-переносників мають схожий механізм дії і утворюють функціональне надсімейство. Нещодавно встановлено структуру N-кінцевого домена *MukB* (відповідному Сегменту N *Rad50cd*) *SMC*-білка *E.coli*, яка показує структурну схожість його ядра з Сегментом I *Rad50* і *HisP* (Van den Ent та ін., 1999). Хоча для С-кінцевого каталітичного сегменту *SMC*-білків немає структурної інформації, консервативність мотивів послідовності С-кінцевого сегменту *Rad50* і *CTFR* припускає консервативність топології. Таким чином, схожість ABC-АТРазних мотивів пізнання *Rad50* і *SMC* говорить про їх глобальну роль у функціонуванні суперсімейства ABC-АТРаз, наприклад, у зв'язку гідролізу АТР з функціонально важливими конформаційними змінами (Manavalan та ін., 1995).

Rad50: структура АТР-зв'язуючого димеру

Для вивчення структурних змін, що асоціюються із зв'язуванням АТР, кристалізовано *Rad50* спільно з негідролізованим аналогом АТР *AMP-PNP* у присутності іонів Mg^{2+} (кофактора ABC-АТРаз) і з АТР у відсутності іонів Mg^{2+} (для запобігання гідролізу АТР). Визначено структури при дозволах 2,1 А і 2,6 А відповідно за допомогою множинної аномальної дисперсії (MAD) з АТР-селенометіонін-*Rad50*. Як у АТР-, так і в *AMP-PNP*-зв'язаної кристалічних форм, два *Rad50cd* димерізуються в орієнтації "голова до хвоста", при якій кожен Сегмент II взаємозв'язаний із Сегментом I протилежного *Rad50cd*. Загальна форма димера *Rad50cd* нагадує неглибоку еліпсоїдну чашу габаритами 95×60×40 А. Взаємодія димера спрямована діагонально по відношенню осі еліпсоїду і утворює жолобок завглибшки 12 А, 22 А шириною і 65 А завдовжки вдовзж увігнутої сторони димера, що розширюється до кінців. Структура димера АТР-*Rad50cd*, підтверджує, що *AMP-PNP* викликає ті ж конформаційні зміни, що і АТР. Оскільки *Mg-AMP-PNP*-зв'язана структура має великий дозвіл і містить іон Mg^{2+} , що є ключовим, детальний аналіз змін *Rad50cd*, індукованих АТР, фокусується на дозволі комплексу *Mg-AMP-PNP-Rad50cd* при 2,1 А.

Обидві молекули АТР занурено в область взаємодії димерів, сформованому подібно сендвічу між Р-петель (мотив Уолкера А) одного домена *Rad50cd* і консервативним мотивом пізнання *Rad50cd*, що протилежить. Обидві основи, що суперспіралізують, обрамляють жолобок, на відстані ~25 А один від одного, таким чином, що спіралі розташовані майже паралельно одан по відношенню до іншої і перпендикулярно по відношенню до увігнутої сторони "чаши".

Таким чином, у присутності АТР або кожен з гомодимерів *Rad50* масою 300 кДа асоціює з другим гомодимером *Rad50* для утворення подвійної гантелеподібної структури масою 600 кДа, або два домени *Rad50cd* одного гомодимеру *Rad50* масою 300 кДа об'єднуються в структуру, що нагадує за формою навушники. До теперішнього часу у *Rad50* спостерігалися лише відкриті "навушники" (Connelly та ін., 1998), але закриті "навушники" було виявлено на електронних мікрознімках споріднених білків *SMC* (Melby та ін., 1998).

Ці структури *Rad50* вказують на головну роль консервативного мотиву пізнання під час збирання димеру, а також ідентифікують повністю занурений сайт зв'язування АТР, що нагадує приховані сайти зв'язування триплетів інших ферментів. У протилежність цьому, в димера, похідного від *HisP* (Hung та ін., 1998) розташування як АТР-зв'язуючого сайту, так і мотиву пізнання – відкрите і периферійне.

Для незалежного підтвердження взаємодії димеру *Rad50cd* було створено два мутанти *Rad50cd* для розрізнення поверхонь взаємодії димера *HisP* (I74R) та димера *Rad50* (S793R), а також вивчалася їх АТР-залежна димерізація. S793R знаходиться в ділянці взаємодії мотивів пізнання димеру *Rad50* і аналогічна мутації в *CFTR* (S549R), що призводить до пухирчастого фіброзу (Zielenski і Tsui, 1995). За відсутності АТР MW *Rad50cd-I74R* та *-S793R* мають молекулярну масу поодинокого домена дикого типу *Rad50cd* у 35 кДа. У присутності АТР *Rad50cd-I74R* володіє MW у 60 кДа, невідмітну від такої димеру *Rad50cd* дикого типу. В протилежність цьому, *Rad50cd-S793R* володіє MW у 35 кДа навіть у присутності АТР, що вказує на дефект взаємодії. Таким чином, експериментально підтвердженою формою існування димера в розчині є димер з мотивом пізнання *Rad50*, а не похідне димера *HisP*. Неможливість спостереження димера з мотивом пізнання в області взаємодії ABC-АТРаз *HisP* може бути наслідком наявності в *HisP* ділянки 6xHis, стерично що перешкоджає утворенню димера з мотивом пізнання *Rad50cd*.

Rad50cd: ділянки взаємодії з ДНК

Структура димера *Rad50cd* дозволяє припустити механізм АТР-зв'язування ДНК, що активується, шляхом утворення позитивно зарядженого жолобка на поверхні взаємодії димера, вказуючи на потенційну ДНК-зв'язуючу поверхню. Суперспіральні виступи обрамляють жолобок (на відстані ~25Å один від одного) в АТР-зв'язаному *Rad50*. Ця структура співвідноситься з двома можливими моделями зв'язування ДНК. Жолобок може вирівнювати два кінці ДНК (Paull і Gellert, 1998) або навпроти, оскільки жолобок розширюється до кінців, він здатний зв'язувати дві нитки ДНК перпендикулярно по відношенню до поверхні взаємодії димера і зближувати їх (Bressan та ін., 1999). У будь-якій з моделей дисоціація димера розриває жолобок і, таким чином, надає механізм, що легко перевіряється, згідно з яким ДНК, що вивільняється з комплексу *Rad50/Mre11* зв'язана з гідролізом АТР. *Rad50cd* асоційований з *Mre11*, що формує додаткові сайти зв'язування ДНК. Оскільки спільне очищення показало, що *Rad50cd* не утворює комплексів з *Mre11*, але як *Mre11*, так і *Rad50cd* взаємодіють з ДНК; структурні і біохімічні результати підтверджують, що *Mre11* зв'язується з суперспіраллю *Rad50* (що становить основу *Rad50cd*) для ув'язнення ДНК подібно до сендвіча між *Rad50cd* і *Mre11*.

Визначено послідовності *rad50S* мутантів дріжджів, дефектних по мейотичним, але не по мітотичним DSB (Alani та ін., 1990) по відношенню до структури *Rad50cd*. Жоден із залишків, що належать їм, не взаємодіє з АТР. Дві мутації (V63E і Q79K в *scRad50*) локалізовані в передбачуваному районі зв'язування ДНК (жолобку) і можуть впливати на взаємодію *Rad50* із ДНК. Проте, сім з дев'яти мутацій *rad50S*, виявлених Alani та ін. (1990) зібрані в кластер поверхні листа I протилежної стороні P-петлі, але прилеглої до жолобка, що імовірно зв'язує ДНК, формуючи, таким чином, передбачуваний сайт взаємодії з мейозоспецифічним білком (Alani та ін., 1990). Таким білком, можливо, є *Sae2/Com1*, оскільки його ноль-алель призводить до виникнення *rad50S*-подібного фенотипа (McKee і Kleckner, 1997).

Rad50cd: активний центр і функція мотиву пізнання

Обидві молекули АТР розташовані між P-петлями і мотивами пізнання протилежних *Rad50cd*: у *Rad50cd*. Мотив пізнання зв'язується з гамма-фосфатом АТР О через Ser-793 головних ланцюгів О-гамма і Gly 795 головному ланцюгу N, що пояснює консервативність цих залишків у послідовностях ABC-АТРаз. Таким чином, згідно моделі, мотив пізнання є "сенсором" для гамма-фосфату АТР в протилежній молекулі (Jones і George, 1999), і може бути сполучною ланкою між гідролізом АТР і структурними

зміними, а також транспортом лігандів у ABC-переносників (Manavalan та ін., 1995). Мотив пізнавання часто є мутантом у пацієнтів, що страждають пузирчастим фіброзом (Zielenski і Tsui, 1995; Gadsby і Nairn, 1999). При S793R, мутації, створеній в *Rad50cd* для запобігання АТР-залежної димерізації, змінений найбільш консервативний залишок мотиву пізнавання, що аналогічно мутації *CFTR*, S549R.

Таким чином, молекулярна основа виникнення пузирчастого фіброзу у цього виду мутацій мотиву пізнавання може являтися неможливістю димерізації двох NBD *CFTR*. Найбільш поширена мутація *CFTR*, DF508, локалізована в петлі, де у *Rad50* розташована суперспіраль, що узгоджується з розривом DF508 петлі поверхні NBD, що взаємодіє з трансмембранним доменом *CFTR* (Hung та ін., 1998).

Іон Mg^{2+} активного центру зв'язується з бета- і гамма-фосфатами О і з Ser-37 і Gln-140 бічних ланцюгів О у присутності двох молекул води, одна з яких зв'язується з Asp-822 і Glu-823 у мотиві Уолкера В. Молекула води біля гамма-фосфату АТР, розташована майже паралельно зв'язку представляє собою потенційний атакуючий нуклеофіл, сполучений водневими зв'язками з Gln-140 N- і Tyr-827 О-ланцюгами, але, дивним чином, не з Glu823 мотиву Уолкера В, який, можливо, поляризує атакуючу молекулу води в *Hisr* (Hung та ін., 1998). Спостережувана конформація може понизити міру гідролізу в димерізованих NBD, оскільки в основному стані очікування алостеричного сигналу вистачає лише слабого зміщення бічного ланцюга Glu-823 для поляризації потенційно атакуючої молекули води. Консервативний *His-855*, розташований поряд з Glu-823 і молекулою води, можливо, управляє цією активацією (Jones і George, 1999; Nikaido і Ames, 1999).

Кооперативність і алостеричний контроль дії ABC-АТРаз і *Rad50cd*

Порівняння АТР-вільного і АТР-зв'язаного *Rad50cd* виявляє АТР-індуковане обертання Сегменту II відносно Сегменту I, яке може пояснити характерний кооперативний і алостеричний контроль дії ABC-АТРаз (Gadsby і Nairn, 1999; Holland і Blight, 1999; Jones і George, 1999). Основне пересування альфаF призводить до зміщення мотиву пізнавання на 9 А і забезпечує необхідне відхилення для здійснення асоціації димера і зв'язування АТР. Оскільки, ймовірно, обидві молекули АТР підлягають гідролізу до АДФ і фосфату для забезпечення дисоціації димера і заміни АДФ на АТР, структура димера *Rad50* припускає наявність основи для спостережуваної кооперативності гідролізу АТР за допомогою NBD або ABC-переносників (Loo і Clarke, 1995; Davidson і Sharma, 1997; Liu та ін., 1999). Слід також відмітити, що кожна з D-петель (при димерізації) зв'язується з одним іоном активного центру Mg^{2+} (за допомогою взаємодії мотиву Уолкера В з гідратованим іоном Mg^{2+}) і представляє атакуючу молекулу води в іншому активному центрі (через Tyr-827 головного ланцюгу). Оскільки лише три залишки відділяють сегмент Уолкера В від Tyr-827, D-петлі, ймовірно, зв'язують гідроліз АТР в одному *Rad50cd* димера з гідролізом АТР в іншому *Rad50cd* (Nikaido і Ames, 1999). Gln-140 координує дії Mg^{2+} і молекули води і розташований в межах імовірно зв'язуючої ДНК петлі жолобка поблизу основи суперспіралі (чи петлі, що містить *CFTR F508*). Таким чином, Gln-140 зв'язує гідроліз АТР з алостеричними сигналами.

Модуляція гідролізу АТР одним *Rad50cd*, що асоціюється з іншим *Rad50cd*, функціонально аналогічна алостеричній активації малих G-білків G-активатором білків (Sprang, 1997; Tesmer та ін., 1997; Gamblin і Smerdon, 1998; Scheffzek та ін., 1998). У димері *Rad50cd* один з *Rad50cd* зв'язується з іншим *Rad50cd* в положенні, аналогічному зв'язуванню *rhoGAP* з *RhoA* (Rittinger та ін., 1997). Перемикальна петля I *RhoA* зв'язується з гамма-фосфатом GTP і іоном активного центру Mg^{2+} , аналогічно тому, як це відбувається з мотивом пізнавання *Rad50cd* (зв'язування гамма-фосфату) і Q-петель (зв'язування іону Mg^{2+}), припускаючи, що з мотивом пізнавання пов'язано перетворення енергії і необхідні для функціонування структурні зміни. Перемикач *RhoA* II представляє атакуючу молекулу води, порівнянну з D-петлями димеру *Rad50cd*. Нарешті, *rhoGAP* простягає аргінін бічного ланцюга до активного центру, зв'язуючого GTP-фосфатази в

перехідному стані (Rittinger та ін., 1997; Zhang та ін., 1999). У димері *Rad50cd* положення, відповідне цьому залишку аргініну *rhoGAP* зайнято мотивом пізнавання, а позитивний заряд забезпечується, ймовірно, диполем спіралі альфаF (Hol, 1985). Будучи зіставленими, ці результати виявляють функціональні аналогії між ABC-АТРазами і малими G-білками.

Білки SMC і конденсація хромосом

Засноване на структурі вирівнювання послідовностей припущення дозволяє віднести білки SMC до надсімейства ABC-АТРаз, зважаючи на АТР-керовану димерізацію каталітичних доменів SMC-білка, конденсації хромосом (Kimura та ін., 1999; Sawitzke і Austin, 2000), що співвідносяться з двома сучасними моделями. У першій моделі, згідно якої білки SMC збираються уздовж ДНК і індують загальне скручування (Kimura та ін., 1999), отримані на *Rad50* результати свідчать про АТР-керовану асоціацію двох каталітичних доменів сусідніх молекул. У другій моделі, згідно якої білки SMC концентруються навколо свого головного домена (Kimura та ін., 1999), отримані на *Rad50* результати припускають, що АТР сприяє збранню двох каталітичних доменів однієї молекули. Таким чином, ці дані забезпечують детально розроблену базу для перевірки механізмів управління конденсацією хромосом за допомогою білків SMC.

Механізм АТР-керованої конформаційної механіки *Rad50*

Певні результати дозволяють припустити, що АТР управляє функцією *Rad50* при DSBР шляхом циклу димерізації/дисоціації. АТР-керовані конформаційні зміни і нуклеотидний обмін також спостерігалися при витончених дослідженнях по репараційній системі ДНК, включаючи кристалографічні дослідження *MutL* (Ban і Yang, 1998; Ban та ін., 1999) і біохімічний аналіз *MSH2/6* (Gradia та ін., 1997; Gradia та ін., 1999).

Їх функціональна схожість дивна, оскільки *MutL* є представником іншого сімейства АТРаз, що не має гомології по первинній послідовності з ABC-АТРазами, проте як домени *MSH2/6* гомологічні ABC-АТРадам. Проте, оскільки як *MutL*, так і *MSH2/6* можуть функціонувати як молекулярні перемикачі під час репарації невідповідності, припускається, що АТР-керовані кооперативність і димерізація, характеризуючі *Rad50cd*, можуть представляти загальний механізм, що лежить в основі DSBР, репарації невідповідності і інших процесів репарації ДНК при більшості ушкоджень. Хоча для детального розуміння механізму дії *Rad50* при DSBР необхідно здійснити розгляд структури ДНК-зв'язаного *Rad50*, існуючі результати встановили ключову роль АТР-керованої кооперативності і алостеричного контролю димерізації при DSBР і, можливо, загальну функцію усіх представників надсімейства ABC-АТРаз.

Рак: мутаційне походження

Нині загальноприйнятою є концепція про те, що рак є генетичною хворобою, в основі якої лежать зміни в геномі клітини. У переважній більшості випадків злоякісні новоутворення розвиваються з однієї пухлинної клітини, і моноклональне походження – надійна ознака, що дозволяє відрізнити новоутворення від гіперплазії.

Одним з досягнень молекулярної медицини 90-х рр. став доказ того факту, що рак є генетичним мультифакторним захворюванням. Мутаційна теорія виникнення раку була запропонована Т. Бовері ще в 1914 р. і ґрунтувалася на цитогенетичних дослідженнях порушення хромосомного апарату пухлинних клітин (Boveri Т., 1914). Відтоді накопичена величезна кількість нових фактів, що підтверджують мутаційну природу раку. Передусім, це мутагенність практично усіх відомих фізичних і хімічних канцерогенів (Ауэрбах Ш., 1978).

Існуюча близькість величин темпів спонтанного виникнення свідомо генних мутацій і окремих ознак злоякісної трансформації також говорить про мутаційне походження останніх (Varshaver N.B. et al., 1983; Леликова Г.П. та ін., 1985; Bellett A., Younghusband Н., 1979). Показано перенесення трансформованого фенотипу за допомогою ДНК від злоякісних клітин (спонтанно і хімічно трансформованих) і пухлин в нормальні (Shih С. et al., 1979; Shih С. et al., 1981; Cooper G.M. et al., 1980; Krontiris T.G., Cooper G.M., 1981; Perucho M. et al., 1981). Прямим доказом мутаційної природи раку

можна вважати відкриття протоонкогенів і генів-супресорів, зміна структури і експресії яких за рахунок різних мутаційних подій, у тому числі і крапкових мутацій, призводить до злоякісної трансформації (Rayter S.I. et al., 1989).

За сучасними уявленнями, від трьох до шести додаткових генетичних ушкоджень (залежно від природи початкової або привертаючої мутації, яка може зумовити шлях розвитку захворювання (Kinzler K.W., Vogelstein B., 1997) вимагаються для того, щоб завершити процес неоплазії (Vogelstein B, Kinzler K.W., 1993), що почалася. Дані епідеміологічних, клінічних, експериментальних (на культурах трансформованих клітин і на трансгенних тваринах) і молекулярно-генетичних досліджень добре узгоджуються з цими уявленнями.

Дійсно, розвиток ракової пухлини багатостадійний, і, в першому наближенні, може бути описано як трансформація соматичної клітини (іморталізація і втрата контактного інгібування) в дезорганізовану групу клітин – пухлину; зростання цієї пухлини і її малігнізація, тобто набуття злоякісного характеру, що полягає в здатності до інвазії в сусідні тканини і метастазування. Кожна стадія неоплазії зв'язана з набуттям клітиною однієї або двох нових мутацій, регуляторного або структурного характеру, які, відповідно, активують онкогени, або інактивують супресорні гени. При цьому з кожною новою мутацією відбувається як би послідовне "клонування" трансформованих клітин з нарощуванням потенціалу їх канцерогенності. Усе це приводить нас до наступних уявлень.

Рак – неминучий супутник довгоживучого організму: вірогідність накопичення соматичною клітиною критичного числа мутацій прямо пропорційна часу життя організму. Швидкість розвитку цього генетичного захворювання залежить як від спадкових, так і від зовнішніх чинників (останні включають такі чинники забруднення місця існування як радіація, біологічно активні речовини, канцерогени і так далі); нарешті, вона прямо залежить від захисних властивостей організму, включаючи такі функції, як гуморальний і клітинний імунітет, але, головним чином, репаративні функції клітини, що забезпечують точність відтворення і збереження її генетичного матеріалу.

Рак і системи репарації: введення

1993 р. виявився дуже плідним для виявлення взаємозв'язку між репарацією ДНК і канцерогенезом. Незалежні дослідження двох груп (Fishel R., Lescoe M.K., et al. 1993; Leach F.S., Nicolaides N.C., et al., 1993; Parson R., Li G.-M., et al., 1993; Aaltonen L.A., Peltomäki P., et al., 1993), одну з яких очолили Р. Колоднер і Р. Фішель, а іншу – А. Делашапелі і Б. Фогельштейн, привели до відкриття ряду генів, відповідальних за так званий спадковий неполіпозний рак товстої кишки (ННРТК) у людини. Як виявилось, ці гени контролюють систему корекції неспарених основ (КНО) ДНК у людини. Разом з відкриттям причини виникнення пігментної ксеродерми (підвищеній чутливості шкіри людини, до дії УФ-опромінення, здатного привести до раку шкіри) як наслідки ушкодження системи експіційної репарації нуклеотидів (ЕРН) в ДНК, дані про роль КНО остаточно підтвердили припущення про те, що ослаблена репарація ДНК може прискорити розвиток ракового захворювання.

Додаткова інформація є у ряді оглядів, що аналізують як системи репарації ДНК на різних рівнях організації генетичного матеріалу (Seeberg E., Eide F., Bjoras M., 1995; Kolodner R., 1995; Lehmann A.R., 1959; Walker G., 1995; Friedberg E.C., Walker G.C., et al., 1991), так і їх взаємозв'язок з генетичними захворюваннями (Lehmann A.R., 1995; Friedberg E.C., Walker G.C., et al., 1991; Knudson A.G., 1991; Barnes D.E., Lindahl T., et al., 1993; Cleaver J.E., 1994).

Ушкодження систем репарації призводить до різкого збільшення частот мутацій. Наприклад, клітини раку товстої кишки проявляють високу міру мікросателітної нестабільності. При цьому в них також в сотні разів підвищується частота інших мутацій, вони мають мутаторний фенотип. Принаймні в одному з видів пухлин, (пухлина товстої кишки) в якій мутовано ген, відповідальний за репарацію *hMSH2*, мутації якраз і

накопичуються в період сильно зниженої проліферації. При цьому швидкість їх накопичення в декілька десятків і навіть тисяч разів вище, ніж в нормальних клітинах.

Зміни систем репарації характерні, мабуть, для відносно невеликої частини новоутворень. Проте під час розвитку деяких форм пухлин вони можуть грати роль засновника. Так, природжені дефекти генів, продукти яких відповідальні за ексцизійну репарацію ДНК, викликають пігментну ксеродерму-синдром, що характеризується розвитком множинних пухлин шкіри в місцях, що піддаються сонячному опроміненню (Cleaver, et al., 1968). Цікаво, що, незважаючи на участь ексцизійної репарації у виправленні дефектів, викликаних не лише УФ-опроміненням, але і самими різними мутагенами/канцерогенами (Bol, et al., 1998; De Vries, et al., 1997), частота виникнення інших форм пухлин при пігментній ксеродермі майже не збільшується. При цьому у трансгенних мишей з аналогічними дефектами системи ексцизійної репарації відзначається підвищення частоти індукції хімічними канцерогенами пухлин внутрішніх органів (De Vries, et al., 1997). Переважне виникнення у пацієнтів з пігментною ксеродермою пухлин шкіри може вказувати на незначну роль хімічних чинників, що забруднюють довкілля, в розвитку новоутворень у людини (Lengauer, et al., 1997).

Природжені дефекти іншої репараційної системи, що виправляє помилки реплікації ДНК, яка призводить до неспарених основами ("mismatch repair"), викликає синдром Лінча. Головною рисою цього синдрому є розвиток пухлин товстого кишечника (так званий "спадковий неполіпозний колоректальний рак") і/або пухлин яєчника (Lengauer, et al., 1997; Lynch, et al., 1997). Переважне виникнення саме пухлин кишечника при дефектах цієї системи репарації, можливо, пов'язане з найвищим проліферативним потенціалом клітин на дні кишкових крипт, що, природно, веде і до частішої появи помилок реплікації.) Ідентифіковані чотири гени – *MSH2*, *MLH1*, *PMS1* і *PMS2*, інактивуючі мутації в яких призводять до цього стану (Lynch, et al., 1997; Lynch, et al., 1997; Angioli, et al., 1998). Маркером інактивації будь-якого з цих генів є нестабільність послідовностей мікросателітів ДНК (Lengauer, et al., 1997; Kolodner, et al., 1996), що легко виявляється. Порушень в системі репарації неспарених основ характерні і для деяких форм спорадичних (неспадкових) пухлин: вони виявляються в 13-15% пухлин товстої кишки, раків шлунку і ендометрія, але значно рідше (менше 2%) в інших новоутвореннях (Lengauer, et al., 1997).

Передбачається, що порушення в системі репарації двониткових розривів ДНК, здійснюваної шляхом гомологічної рекомбінації, також можуть призводити до розвитку певних форм пухлин. На це вказує той факт, що супресорні білки *BRCA1* і *BRCA2*, гермінальні мутації яких відповідальні за спадкові форми раку молочної залози і раку яєчників (Lynch, et al., 1997; Angioli, et al., 1998; Blackwood, et al., 1998), мають здатність утворювати комплекс з білком *RAD51* – гомологом бактеріального білка *RecA*, відповідальним за гомологічну рекомбінацію, а інактивація ("нокаут") генів *BRCA1* і *BRCA2* призводить до різкого підвищення чутливості до g-опромінення (Bertwistle, et al., 1998; Marmorstein, et al., 1998; Zhang, et al., 1998). Проте доки остаточно незрозуміло, чи дійсно канцерогенез при порушеннях функції *BRCA1* і *BRCA2* обумовлений саме цими, а не якимись іншими їх активностями. Зокрема, слід зауважити, що репарація двониткових розривів ДНК відбувається в певні періоди клітинного циклу, зупинка в яких різко збільшує ефективність процесу. Не виключено, що здатність білка *BRCA1* підвищувати експресію *p21WAF1/CIP1* через *p53*-залежні і незалежні механізми (Ouchi, et al., 1998; Zhang, et al., 1998) і, навпаки, пригнічувати трансактиваційну здатність білка *Myс* (Wang, et al., 1998) спрямовану саме на зупинку клітинного циклу в пошкоджених клітинах.

Якщо порушення репараційних систем і пов'язана з ними "нуклеотидна нестабільність" причетні до розвитку відносно невеликого числа певних форм пухлин, то "хромосомна нестабільність", витікаюча з порушень нормальної регуляції клітинного циклу, характерна, певно, для переважної більшості солідних пухлин.

Питання для самоперевірки знань:

1. Вкажіть рівні, на яких здійснюється захист генетичної інформації від мутаційних ушкоджень.
2. На які групи розподіляють основні типи пошкоджень ДНК?
3. Вкажіть, які групи репарації пошкоджень ДНК розрізняють.
4. У чому полягає сутність процесу фотореактивації ДНК?
5. У чому полягає корегувальний механізм аутокорекції ДНК-полімеразами?
6. За рахунок якого ферменту і як здійснюється репарація AP-сайтів?
7. У чому полягає особливість репарації пошкоджень, викликаних алкільними групами, за допомогою алкілтрансфераз?
8. Вкажіть ДНК-полімерази еукаріот, які володіють AP-ліазною активністю.
9. Опишіть етапи другого механізму ексцизійної репарації ДНК.
10. Вкажіть етапи механізму репарації дволанцюгових розривів ДНК.
11. Який чином працює *MutHLS*-система при репарації помилково спарених нуклеотидів?

Матеріали самостійного опрацювання:

1. Інструменти репарації для біологічних процесів.
2. Сучасні індуковані репараційні процеси у представників флори та фауни.

Список використаної літератури

1. Генетика : підручник для студентів вищих навчальних закладів. Ужгород : Гражда, 2013. 506 с.
2. Генетика з біометрією. Практикум : навч. посіб. / М. Г. Повод, Т. І. Нежлукченко, Н. С. Папакіна та ін. ; за ред. Т. І. Нежлукченко. Херсон : Олді-Плюс, 2015. 380 с.
3. Генетика з основами селекції / С. І. Стрельчук, С. В. Демідов, Г. Д. Бердишев, Д. М. Голда. Київ : Фітосоціоцентр, 2000. 291 с.
4. Генетика популяцій / О. Л. Трофименко, М. І. Гиль, О. Ю. Сметана ; за ред. професора М.І. Гиль. Миколаїв : МНАУ, 2017. 278 с.
5. Генетика сільськогосподарських тварин / В. С. Коновалов, В. П. Коваленко, М. М. Недвига та ін. Київ : Урожай, 1996. 432 с.
6. Екологічна біотехнологія та біоінженерія : підручник. Частина 2: Клітинні технології / О. Л. Кляченко, Ю. В. Коломієць, Л. А. Янсе, В. О. Постоєнко. Київ : Аграрна наука, 2021. 276 с.
7. Загальна і молекулярна генетика: Практикум / С. В. Демідов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. 239 с.
8. Загальна та молекулярна генетика : метод. реком. для виконання лабораторних робіт з цитогенетичних основ спадковості для здобувачів вищої освіти освітньої спеціальності 162 "Біотехнології та біоінженерія" ступеня вищої освіти "бакалавр" / уклад. М. І. Гиль. Миколаїв : МНАУ, 2018. 59 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/5108>
9. Коваленко В. П., Горбатенко І. Ю. Біотехнологія у тваринництві й генетиці. Київ : Урожай, 1992. 150 с.
10. Кравців Р. Й., Колотницький А. Г., Буцяк В. І. Генетична інженерія : навч. посіб. / Львівська національна академія ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького. Львів, 2007. 214 с.
11. Молекулярна генетика та технології дослідження геному : навч. посіб. / М. І. Гиль, О. Ю. Сметана, О. І. Юлевич та ін. ; за ред. професора М. І. Гиль. Миколаїв : МНАУ, 2014. 280 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/3796>
12. Ніколайчук В. І., Горбатенко І. Ю. Генетична інженерія : підруч. Ужгород, 1999. 182 с.
13. Трофименко О. Л., Гиль М. І., Сметана О. Ю. Генетика популяцій : підручник / за ред. професора М. І. Гиль ; МНАУ. Миколаїв : Видавничий дім «Гельветика», 2018. 254 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/3504>

Навчальне видання

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

(Модуль: Молекулярно-біологічні основи генетичної інженерії)

методичні рекомендації

Укладач: **Гиль** Михайло Іванович

Формат 64×84 1/8. Ум. друк. арк. 9,7

Тираж 120 прим. Зам. № _____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54008, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

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