

Міністерство освіти і науки України  
Міністерство охорони здоров'я України  
Сумський державний університет

**Н. М. Іншина**

# **Основи молекулярної біології**

Навчальний посібник

Рекомендовано вченою радою Сумського державного університету



Суми  
Сумський державний університет  
2019

УДК 577.2(075.8)

I-74

Рецензенти:

*В. Ю. Гарбузова* – доктор біологічних наук, професор (Сумський державний університет);

*В. М. Торяник* – кандидат біологічних наук, доцент (Сумський державний педагогічний університет імені А. С. Макаренка)

*Рекомендовано до видання  
вченою радою Сумського державного університету  
як навчальний посібник  
(протокол № 6 від 15 листопада 2018 року)*

**Іншина Н. М.**

I-74 Основи молекулярної біології : навчальний посібник / Н. М. Іншина. – Суми : Сумський державний університет, 2019. – 121 с.

ISBN 978-966-657-756-9

У навчальному посібнику викладено сучасні уявлення про молекулярні основи життєдіяльності клітини. Висвітлено питання структурної організації нуклеїнових кислот, біосинтезу ДНК, РНК та білків. Розглянуто особливості регуляції експресії генів у про- та еукаріотів, механізми репарації ДНК. Описано методи генної інженерії, що є основою діагностики і терапії генетичних захворювань.

Для студентів медичних закладів вищої освіти III–IV рівнів акредитації.

**УДК 577.2(075.8)**

ISBN 978-966-657-756-9

© Іншина Н. М., 2019

© Сумський державний університет, 2019

## Зміст

	<b>С.</b>
<b>Вступ .....</b>	<b>4</b>
<b>Розділ 1. Структура і властивості нуклеїнових кислот..6</b>	
1.1. Структурні компоненти нуклеїнових кислот .....	6
1.2. Рівні структурної організації ДНК .....	10
1.3. Типи РНК, їх структура і функції .....	18
1.4. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот .....	23
<b>Розділ 2. Синтез нуклеїнових кислот та білків .....</b>	<b>26</b>
2.1. Реплікація .....	27
2.2. Транскрипція .....	39
2.3. Трансляція .....	55
2.4. Посттрансляційна модифікація білків .....	68
<b>Розділ 3. Регуляція експресії генів. Репарація ДНК ...</b>	<b>73</b>
3.1. Регуляція транскрипції у прокаріотів .....	74
3.2. Особливості регуляції експресії генів у еукаріотів ...	79
3.3. Репарація ДНК .....	87
<b>Розділ 4. Генна інженерія .....</b>	<b>96</b>
4.1. Технологія рекомбінантної ДНК .....	97
4.2. Клонування генів. Клонотеки генів .....	99
4.3. Полімеразна ланцюгова реакція .....	101
4.4. Генна діагностика .....	103
4.5. Генна терапія .....	106
<b>Словник термінів .....</b>	<b>112</b>
<b>Список використаної літератури .....</b>	<b>119</b>

## Вступ

**Молекулярна біологія** – наука, що вивчає молекулярні основи життєдіяльності клітини, механізми зберігання, передавання та реалізації генетичної інформації. Молекулярна біологія є галуззю біохімії.

Відкриття в галузі молекулярної біології дозволяють зрозуміти природу генетичних захворювань. Завдяки технології рекомбінатних ДНК природні або модифіковані гени можна вводити в інші клітини. Ці відкриття є визначними для діагностики і лікування раку, діабету, захворювань серця і генетичних дефектів.

Основними носіями генетичної інформації є нуклеїнові кислоти – ДНК та РНК, відкриті наприкінці XIX ст. У 1868 р. швейцарський учений Іоган Мішер уперше виділив нуклеїнові кислоти з лейкоцитів. У 1928 р. Фредерік Гріффін експериментально довів, що саме ДНК є основою генетичного матеріалу клітини.

Однак бурхливий розвиток біохімії нуклеїнових кислот відбувся лише наприкінці 40-х – на початку 50-х рр. XX ст. У 1944 р. Евері, Мак-Леод і Мак-Карті встановили, що ДНК є носієм генетичної інформації. У 1953 р. Ф. Крік, Д. Уотсон та М. Уїлкінс дослідили просторову структуру ДНК методом рентгено-структурного аналізу. Упродовж другої половини XX ст. були розроблені численні методи дослідження структури і властивостей ДНК, що обумовили розвиток генної інженерії.

У 2003 р. був завершений міжнародний проект «Геном людини», метою якого було секвенування ДНК – визначення послідовності нуклеотидів. ДНК людини містить 3,5 млрд. п. н. у складі 21–30 тис. генів.

За результатами проекту було встановлено, що лише 2 % генів людини кодують білки.

У 2012 р. в рамках досліджень міжнародного проекту Енциклопедія елементів ДНК ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) було з'ясовано, що 80 % геному людини активні і виконують важливі біохімічні функції [5]. Було виявлено 4 млн сайтів – регуляторів експресії генів. На сьогодні триває робота над секвенуванням геномів 147 типів клітин людини [17].

Сучасні досягнення молекулярної біології широко використовуються у медицині, зокрема у створенні генної діагностики та терапії.

Навчальний посібник «Основи молекулярної біології» спрямований на висвітлення структури та функцій нуклеїнових кислот, їх ролі в реалізації генетичної інформації, регуляції експресії генів. Матеріал посібника допоможе майбутнім фахівцям у галузі медицини зрозуміти базові принципи, що є основою методів діагностики генетичних захворювань.

# Розділ 1

## Структура і властивості нуклеїнових кислот

### 1.1. Структурні компоненти нуклеїнових кислот

Біологічна роль нуклеїнових кислот полягає в зберіганні, передаванні та реалізації генетичної інформації.

**Нуклеїнові кислоти** – це біополімери, побудовані з мононуклеотидів.

Нуклеотиди складаються з 3 компонентів:

- азотистої основи;
- пентози (рибози в РНК, дезоксирибози в ДНК);
- залишку фосфатної кислоти.

Азотисті основи залежно від хімічної будови поділяють на 2 класи:

- 1) пуринові – аденін (А), гуанін (Г);
  - 2) піримідинові – цитозин (Ц), тимін (Т), урацил (У)
- (рис. 1.1).

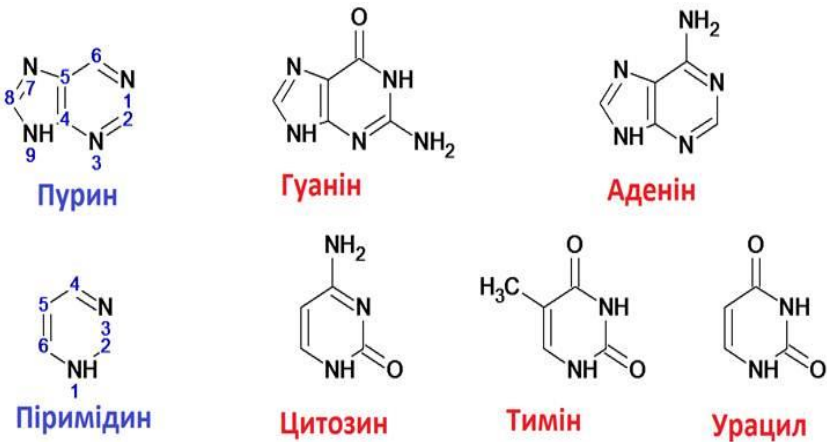
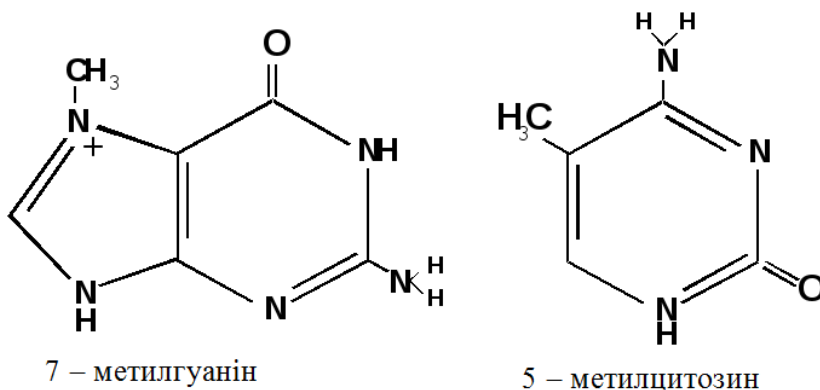


Рисунок 1.1 – Структурні формули азотистих основ

До складу ДНК входять А, Г, Ц, Т, до складу РНК – А, Г, Ц, У.

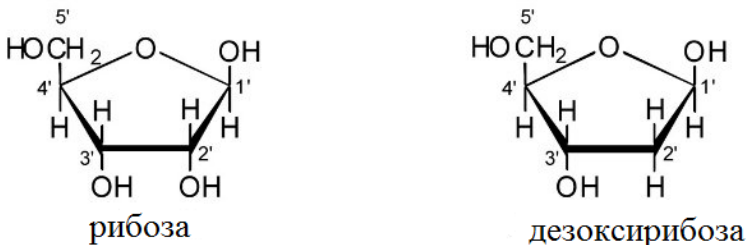
У невеликій кількості до складу нуклеїнових кислот також входять модифіковані азотисті основи, що одержали назву мінорних азотистих основ: 1-метиладенін, 7-метилгуанін, 4-, 5-дигідроурацил, 3-метилурацил, 5-метилцитозин та ін. (рис. 1.2).



*Рисунок 1.2 – Структурні формули мінорних азотистих основ*

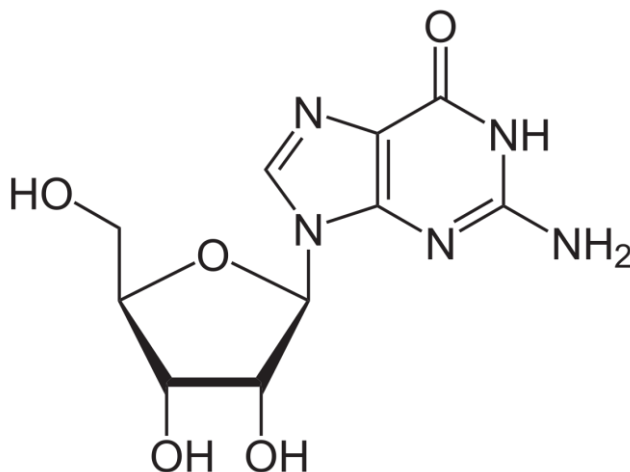
Відомо більше ніж 60 мінорних азотистих основ. Найвищий вміст мінорних азотистих основ (25 %) виявлено в тРНК.

Пентози у складі нуклеїнових кислот представлені рибозою та дезоксирибозою (рис. 1.3).



*Рисунок 1.3 – Структурні формули пентоз*

Сполука азотистої основи та пентози називається **нуклеозидом**. У складі нуклеозидів азотиста основа з'єднується з пентозою глікозидним зв'язком (рис. 1.4).



*Рисунок 1.4 – Структурна формула нуклеозиду*

Назви нуклеозидів утворюються з назв відповідних азотистих основ. Рибоза утворює такі нуклеозиди: аденозин, гуанозин, цитидин, уридин.

У назві нуклеозидів, до складу яких входить дезоксирибоза, з'являється префікс дезокси-, що позначається літерою d.

Унаслідок приєднання до складу нуклеозиду залишку фосфатної кислоти утворюються нуклеотиди (рис. 1.5).

**Нуклеотиди** – це фосфатні ефіри нуклеозидів.

Розрізняють нуклеотиди, що містять 1, 2 або 3 залишки фосфатної кислоти.

Назва нуклеотиду формується з назви відповідного нуклеозиду та інформації про кількість фосфатних залишків у його складі. Наприклад, АТФ – аденозинтрифосфат, АМФ – аденозинмонофосфат.



До складу нуклеїнових кислот входять лише нуклеотиди, що містять один фосфатний залишок.

До складу РНК входять АМФ, ГМФ, ЦМФ, УМФ, до складу ДНК – dАМФ, dГМФ, dЦМФ, dТМФ.

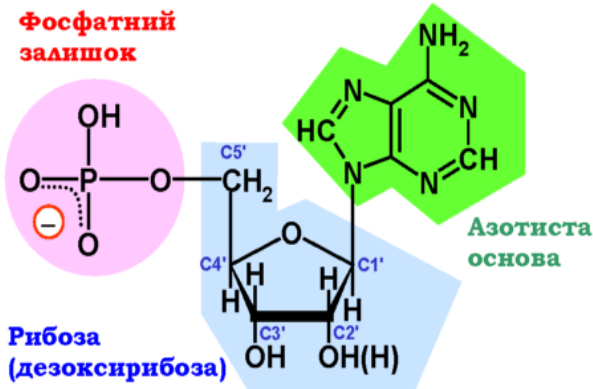


Рисунок 1.5 – Структурна формула АМФ [3]

### Біохімічні функції нуклеотидів:

1. Структурні компоненти нуклеїнових кислот.
2. Макроергічні сполуки (АТФ, АДФ, ГТФ, ГДФ).
3. Специфічні сигнальні молекули (цАМФ, цГМФ).
4. Коферменти в метаболічних реакціях:
  - біологічного окиснення (НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФАД, ФМН);
  - біосинтезу глікогену (УТФ, УДФ);
  - біосинтезу гліцерофосфоліпідів (ЦТФ, ЦДФ).

## 1.2. Рівні структурної організації ДНК

Молекула ДНК має 3 рівні структурної організації: первинну, вторинну і третинну структури.

**Первинна структура нуклеїнових кислот** – послідовність розміщення нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюгу.

До складу молекули ДНК входять 4 типи мономерів: dAMФ, dГМФ, dЦМФ, dТМФ.

У ланцюгу ДНК нуклеотиди з'єднані між собою 3', 5'-фосфодієфірними зв'язками (рис. 1.6). В утворенні 3', 5'-фосфодієфірного зв'язку беруть участь ОН-групи 3'-пентози одного нуклеотиду і 5'-пентози – іншого. Довжина зв'язку становить 0,6 нм.

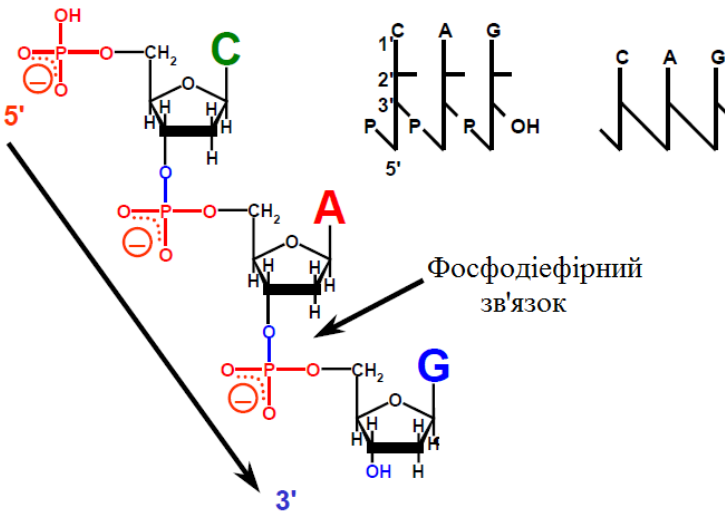
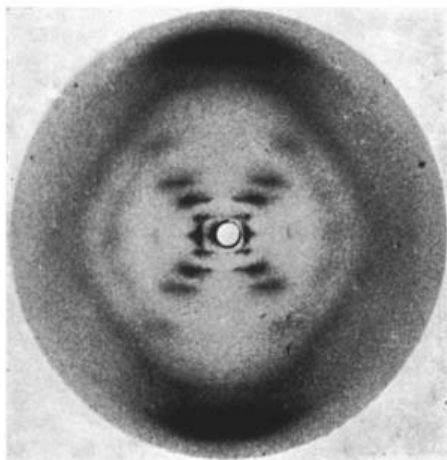


Рисунок 1.6 – Полінуклеотидний ланцюг [8]

Молекула ДНК людини містить 3,5 млрд пар нуклеотидів (п. н.) і має молекулярну масу  $10^{11}$ .

У 1953 р. Френсіс Крік і Джеймс Уотсон отримали Нобелівську премію за відкриття вторинної структури

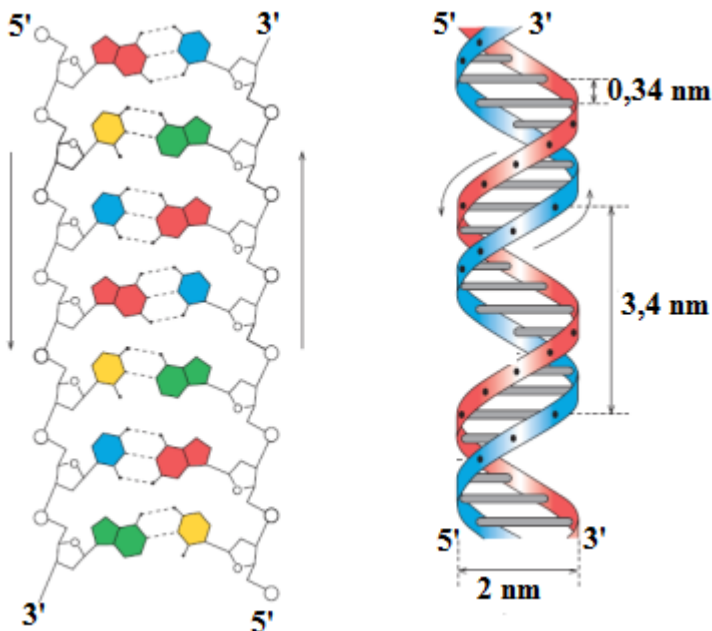
ДНК [9]. Вчені використали дані рентгеноструктурного аналізу, одержані Морісом Вілкінсом і Розаліндою Франклін (рис. 1.7).



*Рисунок 1.7 – Дифракційна картина з ниток ДНК, отримана Р. Франклін [2]*

**Вторинна структура ДНК** являє собою подвійну спіраль, утворену антипаралельними полінуклеотидними ланцюгами (рис. 1.8).

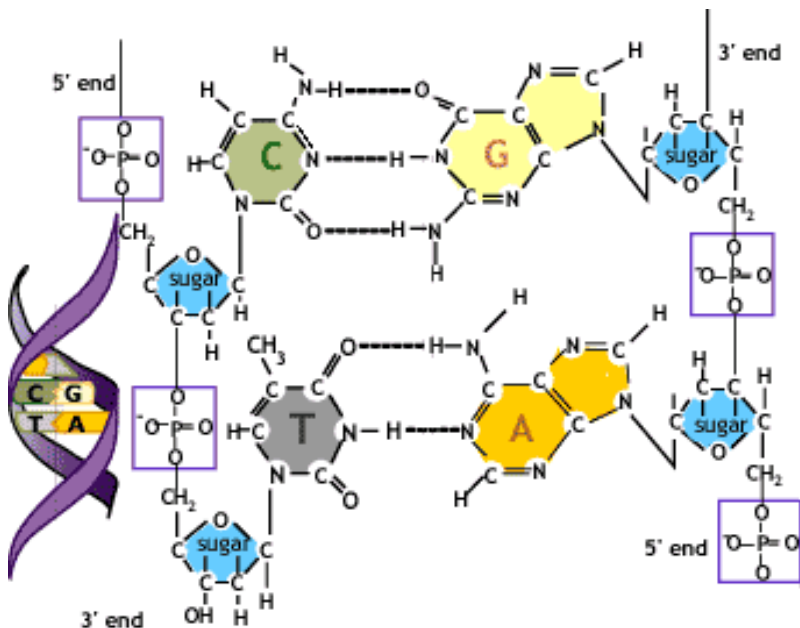
Ланцюги ДНК з'єднуються між собою за рахунок утворення водневих хімічних зв'язків між комплементарними парами азотистих основ. Між аденіном та гуаніном виникають 2 водневі зв'язки, між цитозином і гуаніном – 3 (рис. 1.9). Всередині спіралі розміщені гідрофобні азотисті основи, ззовні – гідрофільні пентози та фосфатні залишки. Між азотистими основами у складі спіралі формуються гідрофобні взаємодії, що сприяють стабілізації вторинної структури ДНК. Таким чином, формування вторинної структури ДНК здійснюється за рахунок утворення водневих хімічних зв'язків та гідрофобних взаємодій.



*Рисунок 1.8 – Схематична будова хеліксу за моделлю Уотсона – Кріка [2]*

Спіраль ДНК правозакручена. В одному витку спіралі розміщується приблизно 10 пар нуклеотидів (п. н.), довжина витка становить 3,4 нм. Ці характеристики відповідають В-формі ДНК. Відомі інші види спіралі ДНК: А-форма та Z-форма. Z-форма – це єдина лівозакручена спіраль. Один виток спіралі А-форми вміщує 11 п. н., В-форми – 10 п. н., Z-форми – 12 п. н [4].

ДНК може змінювати свою конфігурацію залежно від умов. Відомо, що при зниженні вологості в спорах бактерій ДНК знаходиться в А-формі. Було встановлено, що А-ДНК приблизно в 10 разів стійкіша до пошкоджувального впливу ультрафіолету, ніж В-ДНК. Таким чином, структура ДНК динамічна і може мати різноманітні форми.



*Рисунок 1.9 – Комплементарні пари основ у складі ДНК з водневими зв'язками між основами*

У 2012 р. вчені з італійського Інституту технології в Генуї за допомогою електронного мікроскопа вперше отримали фотографію подвійної спіралі ДНК (рис. 1.10).

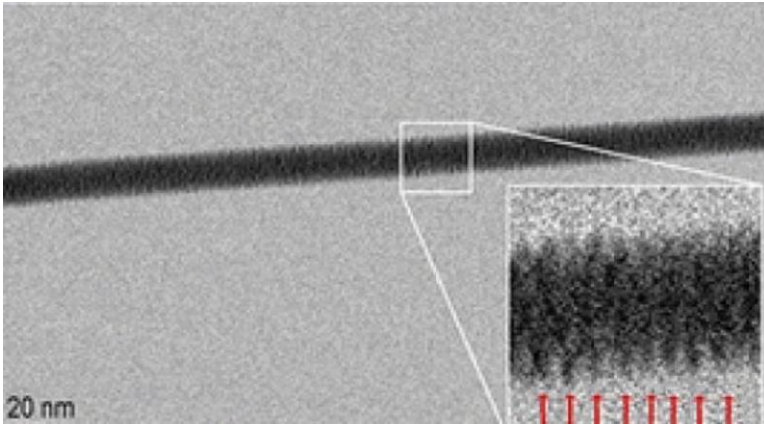
Вміст пуринових і піримідинових азотистих основ у молекулі ДНК підпорядковується чітким закономірностям, встановленим Е. Чаргаффом.

#### **Правила Чаргаффа:**

- сума пуринових азотистих основ у молекулі ДНК дорівнює сумі піримідинових:  $(A + G) = (C + T)$ ;
- кількість азотистих основ з аміногрупою дорівнює кількості основ із кетогрупою:  $(A + C) = (G + T)$ ;
- вміст аденіну в молекулі ДНК дорівнює вмісту тиміну, вміст гуаніну – вмісту цитозину:  $A = T$ ,  $G = C$ ;

**Коефіцієнт специфічності =  $G + C / A + T$ .**

Коефіцієнт специфічності є сталою величиною для кожного виду організмів.



*Рисунок 1.10 – Фотографія ДНК (Енцо ді Фабриціо, Інститут технології, Генуя, Італія)[5]*

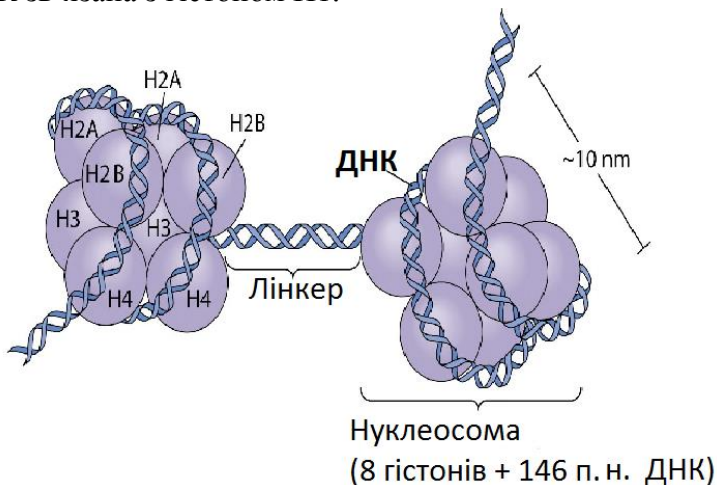
**Третинна структура ДНК** являє собою суперспіраль (в еукаріотів) або кільцеву форму (в прокаріотів).

Формування суперспіралі здійснюється за рахунок зв'язування ДНК зі специфічними білками. У складі хроматину розрізняють білки-гістони та негістонові білки. Гістони – основні білки з високим вмістом аргініну та лізіну. Завдяки наявності «+» заряду гістони утворюють іонні зв'язки з «-»-зарядженими фосфатними залишками ДНК. Залежно від співвідношення вмісту аргініну та лізіну розрізняють 5 фракцій гістонів: Н1, Н2А, Н2В, Н3, Н4.

Процес суперспіралізації ДНК можна зобразити схемою: подвійна спіраль → нуклеосома → соленоїд → петлі → суперспіраль.

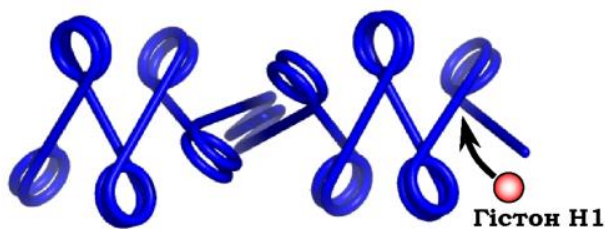
На першому етапі суперспіралізації ДНК формується октамер – частинка з 8 молекул гістонів (Н2А, Н2В, Н3, Н4 – по 2 молекули кожного). Навколо октамера

молекула ДНК робить приблизно 2 оберти – утворюється **нуклеосома** (рис. 1.11). Лінійні ділянки ДНК між нуклеосомами називаються лінкери. У лінкерних ділянках ДНК зв'язана з гістоном Н1.



*Рисунок 1.11 – Нуклеосоми*

На другому етапі суперспіралізації ДНК формується соленоїд – нитка з декількох нуклеосом довжиною 30 нм (рис. 1.12).



*Рисунок 1.12. – Зигзагоподібна конфігурація полінуклеосомної нитки [3]*

На третьому етапі суперспіралізації ДНК з ниток формуються петлі довжиною декілька тисяч нуклеосом.

Петлі прикріплюються до центральної структури – негістонового білка (рис. 1.13).



*Рисунок 1.13 – Схема петельної організації хроматину [8]*

Із петель формується суперспіраль ДНК (рис. 1.14). Унаслідок суперспіралізації лінійна молекула ДНК зменшує свою довжину в 100 тисяч разів. Суперспіралізація ДНК дає можливість упаковувати великі довгі молекули ДНК в малі об'єми (максимальна довжина ДНК хромосоми досягає 8 см, а в суперспіральному стані – 5 нм). Суперспіральна конформація ДНК характерна для хромосом вищих організмів. Вона стабілізується ковалентними зв'язками з амінокислотними залишками білків.

У прокариотів ДНК перебуває у вільному від білків стані та має кільцеву структуру. Кільцеву структуру має також мітохондріальна ДНК. Вона містить 37 генів і кодує 2 рРНК, 22 тРНК і 13 білків. Мітохондріальна ДНК кодує білки, що забезпечують процеси тканинного дихання й окисного фосфорилування.



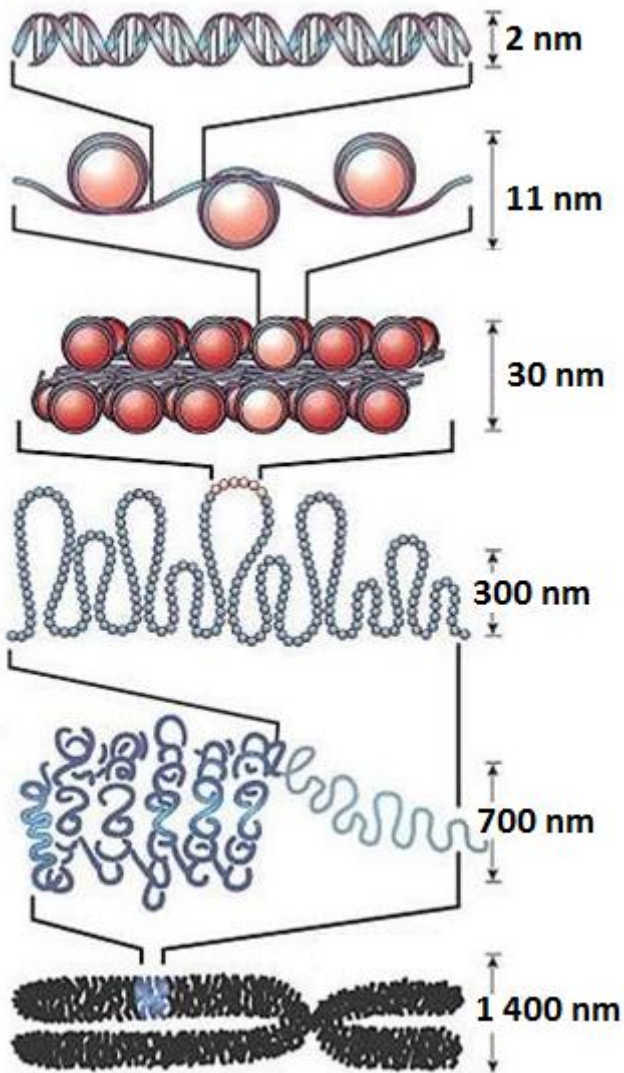


Рисунок 1.14 – Схема конденсації ДНК хроматину до хромосоми [2]

### 1.3. Типи РНК, їх структура і функції

РНК забезпечує біосинтез білків згідно з інформацією про їх первинну структуру в ДНК.

Вміст РНК у клітині в 5–10 разів вищий, ніж ДНК.

На рисунку 1.15 зображені функції основних типів РНК: рРНК, мРНК, тРНК.

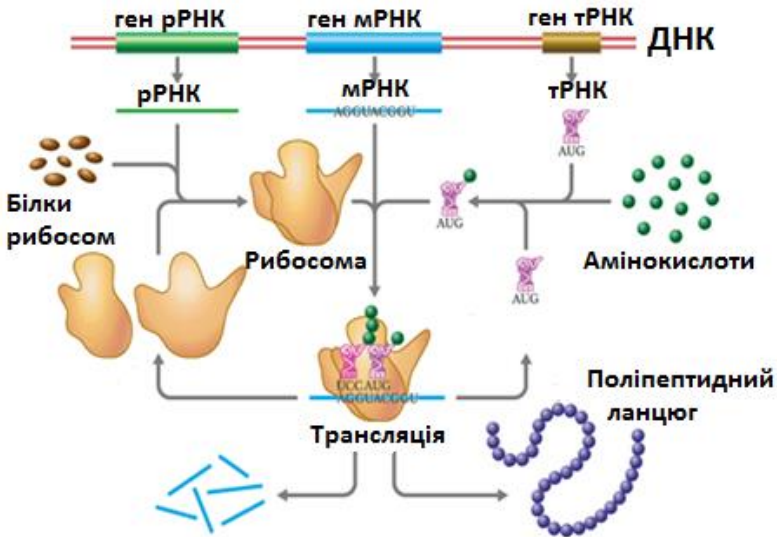


Рисунок 1.15 – Функції рРНК, мРНК, тРНК [2]

**Рибосомна РНК (рРНК)** є структурним компонентом рибосом – органел, що здійснюють біосинтез білків (рис. 1.16). Вміст рРНК становить 85 % від загальної РНК в клітині. Залежно від величини коефіцієнта седиментації (S) у прокаріотів розрізняють 3 типи рРНК: 23S, 16S і 5S рРНК, в еукаріотів – 4 типи: 28S, 18S, 5,8S та 5S рРНК.

**Транспортна РНК (тРНК)** здійснює транспорт амінокислот до рибосом. Вміст тРНК становить 10–15 % від загальної РНК в клітині. У клітині *E.coli* міститься 45 різних тРНК, у клітинах еукаріотів – 65 тРНК. У бактерій тРНК кодують 48 генів, у дріжджів – 400, у дрозофіли – 750, у людини – 1 300.

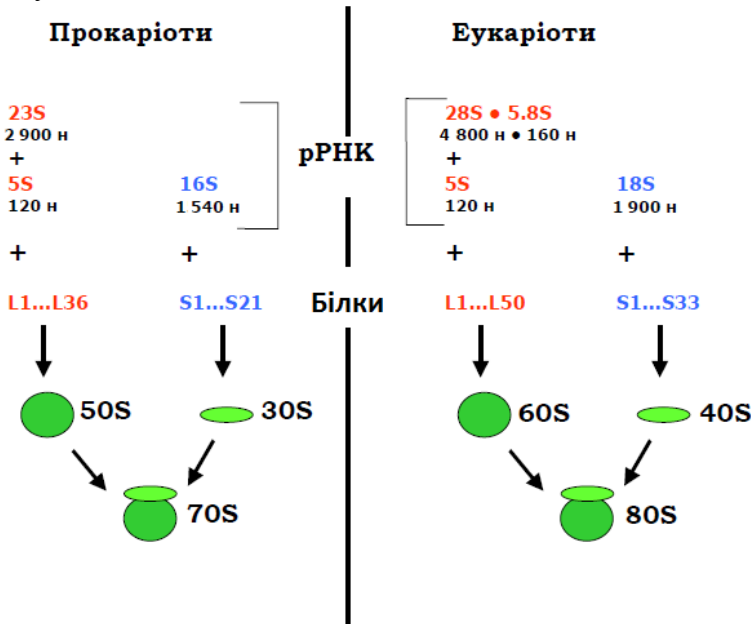


Рисунок 1.16 – Склад рибосом прокаріотів та еукаріотів [8]

**Матрична РНК (мРНК) або інформаційна (іРНК)** синтезується на основі ДНК у процесі транскрипції і містить інформацію про первинну структуру білка. Вміст мРНК становить 3–5 % від загальної РНК в клітині. Недозріла мРНК або пре-мРНК називається гетерогенною ядерною РНК – гЯРНК.

У 1993 р. вперше була відкрита мікроРНК – клас некодуючих молекул РНК, що беруть участь у регуляції трансляції та деградації мРНК [10].

МікроРНК, що об'єднує такі типи:

- мцРНК – мала цитоплазматична;
- мяРНК – мала ядерна;
- мяцРНК – мала ядерцева;
- мхРНК – мітохондріальна;
- міРНК – мала інтерферуюча.

За даними проекту Енциклопедії елементів ДНК (ENCODE), 60 % генів людини регулюються за допомогою мікроРНК [17]. Один тип мікроРНК може регулювати трансляцію мРНК більше ніж 100 генів.

Молекула РНК має 3 рівні структурної організації: первинну, вторинну і третинну структури.

**Первинна структура РНК** – полінуклеотидний ланцюг, побудований із рибонуклеотидів, з'єднаних 3', 5'-фосфодієфірними зв'язками.

Молекула РНК є одноланцюговою, хоча в деяких вірусів трапляються дволанцюгові РНК.

Уперше нуклеотидна послідовність молекули тРНК – аланінової тРНК дріжджів – була розшифрована у 1965 р. в лабораторії Р. Холлі. Полінуклеотидний ланцюг тРНК містить у своєму складі приблизно 74–95 нуклеотидів. Особливістю первинної структури тРНК є високий вміст мінорних азотистих основ (до 25 %).

**Вторинна структура РНК** – просторова конфігурація полінуклеотидного ланцюга, що формується за рахунок утворення водневих хімічних зв'язків.

У складі молекули РНК комплементарними парами азотистих основ є А-У (2 водневі зв'язки) та Г-Ц (3 водневі зв'язки).

У 1974 р. за допомогою рентгеноструктурного аналізу була досліджена просторова структура аланінової тРНК дріжджів. Вторинна структура тРНК має форму листка конюшини (рис. 1.17).

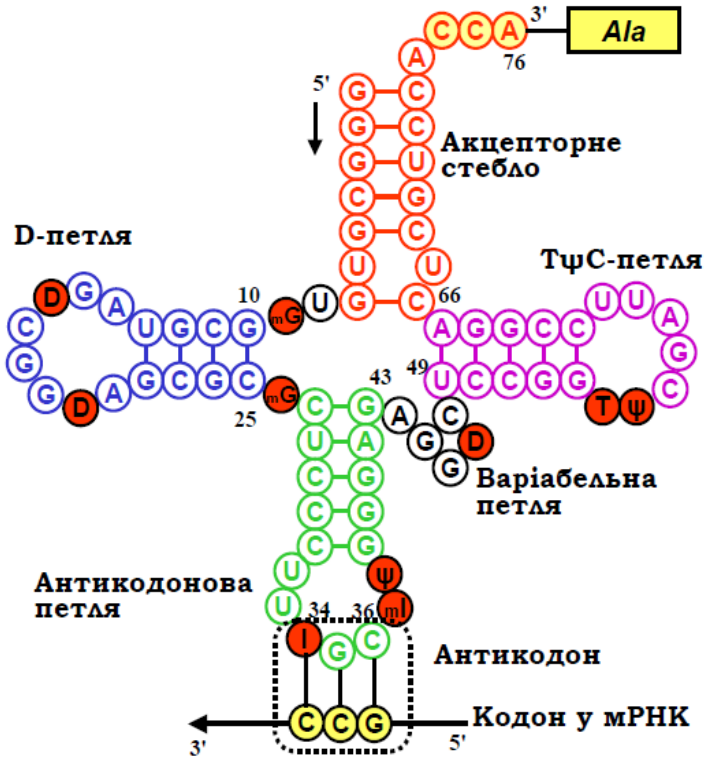


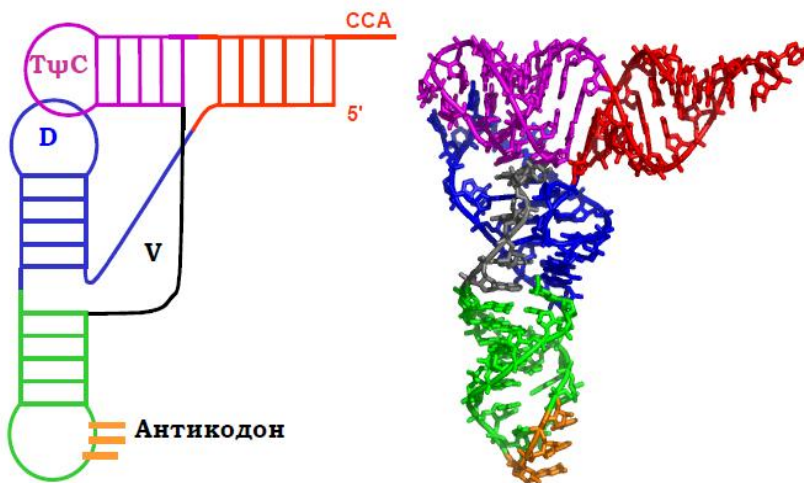
Рисунок 1.17 – Вторинна структура тРНК [8]

У молекулі тРНК виділяють 4 петлі:

- дигідроуридинову петлю (D arm) – ділянку зв’язування з ферментом аміноацил-тРНК-синтетазою;
- антикодонову петлю, що містить **антикодон** – триплет нуклеотидів, за допомогою якого тРНК зв’язується з комплементарним кодоном мРНК;
- варіабельну або додаткову петлю;
- псевдоуридинову петлю (ТΨС arm) – ділянку зв’язування з рибосомою;

На 3'-кінці полінуклеотидного ланцюга тРНК розміщена специфічна послідовність АЦЦ – **акцепторна ділянка**, до якої приєднується амінокислота.

**Третинна структура тРНК** має L-подібну форму, вона утворюється за рахунок закручування петель вторинної структури (рис. 1.18). У стабілізації третинної структури РНК беруть участь  $Mg^{2+}$ .



*Рисунок 1.18 – Третинна структура тРНК [3]*

тРНК не зв'язана з клітинними структурами і перебуває в клітинах у вільному стані.

У клітинах еукаріотів існує більше ніж 60 різних видів тРНК. Як відомо, до складу білків входить 20 основних амінокислот. Таким чином, одна амінокислота транспортується декількома тРНК.

тРНК, що транспортують однакову амінокислоту, називаються **ізоакцепторними**.

## 1.4. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот

До основних фізико-хімічних властивостей нуклеїнових кислот належать: кислотно-основні властивості, в'язкість та оптична активність розчинів, денатурація.

ДНК і РНК мають **кислотні властивості**, що обумовлено наявністю в їх складі залишків фосфатної кислоти.

Нуклеїнові кислоти є поліаніонами, тому вони здатні утворювати комплекси з катіонами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  та основними білками (гістони, протаміни).

Водні розчини нуклеїнових кислот мають високу в'язкість.

**Денатурація нуклеїнових кислот** – це процес руйнування просторової структури нуклеїнових кислот за рахунок розриву водневих зв'язків між комплементарними парами азотистих основ.

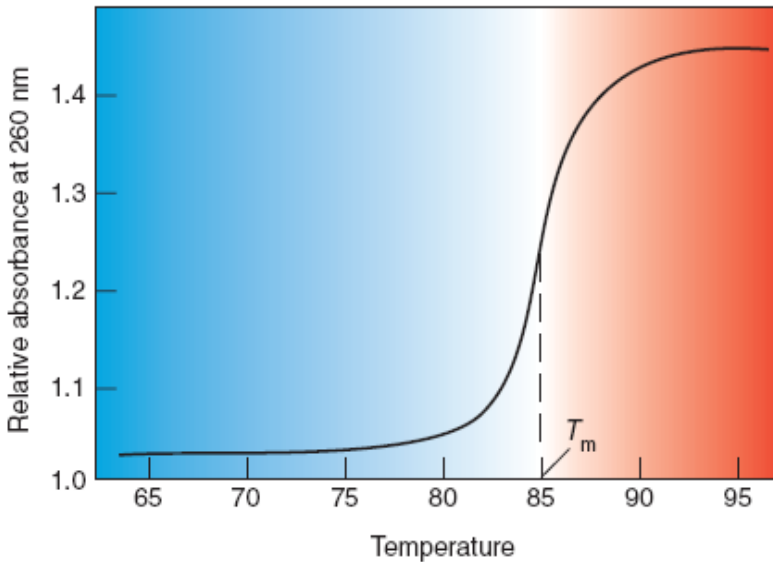
У результаті денатурації ДНК подвійна спіраль розпадається на одинарні полінуклеотидні ланцюги. Первинна структура нуклеїнових кислот при денатурації зберігається.

Процес термічної денатурації ДНК називають **плавленням**.

Плавлення ДНК є одним з етапів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що використовують для копіювання фрагментів ДНК *in vitro* [6].

Температура, за якої половина молекули ДНК є денатурованою, називається **точкою плавлення** (melting point) і позначається  $T_m$  (рис. 1.19).

Точка плавлення ДНК залежить від співвідношення пар А-Т і Г-Ц у складі молекули. Як відомо, пара А-Т утворює 2 водневі зв'язки, а Г-Ц – 3. Тому чим більша кількість у складі ДНК пар Г-Ц, тим вища її точка плавлення.



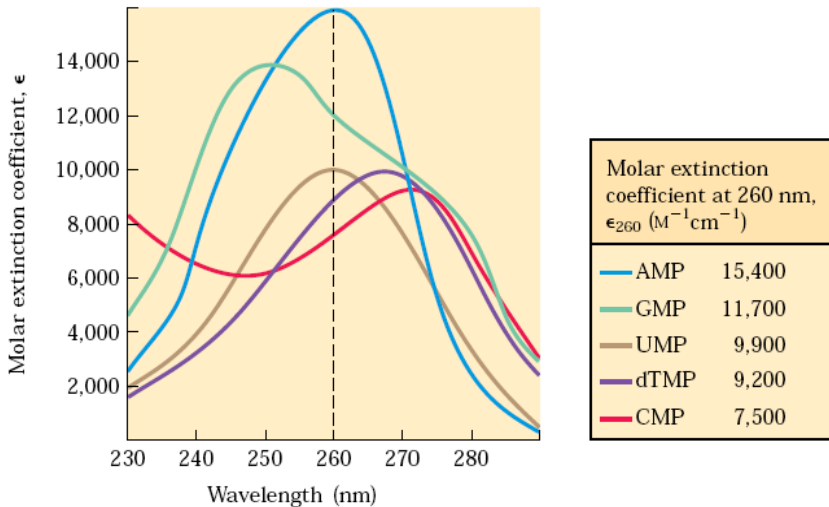
*Рисунок 1.19 – Крива плавлення ДНК з бактерії роду Streptococcus ( $t = 0$  °C, відносне оптичне поглинання за 260 нм) [2]*

До складу нуклеїнових кислот входять пуринові і піримідинові азотисті основи – гетероциклічні сполуки, що мають специфічні спектри поглинання з довжиною хвиль 200–300 нм і з максимумом при 260–280 нм (рис. 1.20). Завдяки цьому нуклеїнові кислоти інтенсивно поглинають світло в УФ-області спектра за довжини хвилі 260–280 нм. Для РНК максимум поглинання становить 260 нм.

Явище збільшення оптичного поглинання ДНК за умови нагрівання або дії іншого денатуруючого чинника називається **гіперхромним ефектом**.

У молекулі ДНК азотисті основи розміщені всередині подвійної спіралі і тому стерично екрануються, що призводить до зменшення поглинання ними світла.





*Рисунок 1.20 – Спектр поглинання та коефіцієнти молярної екстинції нуклеотидів [2]*

Унаслідок денатурації відбувається розділення двох ланцюгів, оптичне поглинання зростає на 30–40 %, що може бути використане як індикатор ступеня інтактності ДНК під час плавлення. Доведено, що одноланцюговий полінуклеотид поглинає більше оптичної енергії, ніж дволанцюговий. Таким чином, ступінь денатурації ДНК можна визначити за зміною інтенсивності поглинання її розчину світла з довжиною хвилі 260 нм.

Крім високої температури, факторами денатурації нуклеїнових кислот є опромінення, дія хімічних сполук (кислот, органічних розчинників, сечовини та ін.).

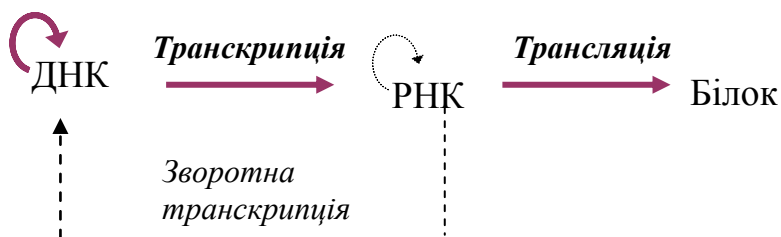
Процес відновлення пошкодженої просторової структури нуклеїнових кислот називається **ренатурацією**.

## Розділ 2

### Синтез нуклеїнових кислот та білків

**Експресія генів** – це реалізація інформації, закодованої в послідовності нуклеотидів.

Реалізація генетичної інформації в живих організмах здійснюється за такою схемою:



Процес подвоєння ДНК називають **реплікацією (ДНК → 2 ДНК)**. Реплікація відбувається перед поділом клітини і забезпечує рівномірний розподіл генетичного матеріалу між дочірніми клітинами.

Процес синтезу РНК на матриці ДНК називають **транскрипцією (ДНК → РНК)**.

Процес синтезу білка на матриці мРНК називають **трансляцією (мРНК → Білок)**. Послідовність нуклеотидів у складі мРНК визначає амінокислотну послідовність синтезованого білка.

Для ретровірусів характерний процес **зворотної транскрипції** – синтезу вірусної ДНК на матриці РНК (**РНК → ДНК**).

Для деяких вірусів характерний процес реплікації РНК – подвоєння вірусної РНК (**РНК → 2 РНК**).

## 2.1. Реплікація

ДНК здатна до самовідтворення. Унаслідок реплікації з однієї молекули ДНК утворюються дві ідентичні дочірні молекули.

Процес реплікації відбувається в S-фазі (synthesis phase) клітинного циклу (рис. 2.1). Повне подвоєння генетичного матеріалу клітин вищих організмів здійснюється за 9 годин [1].

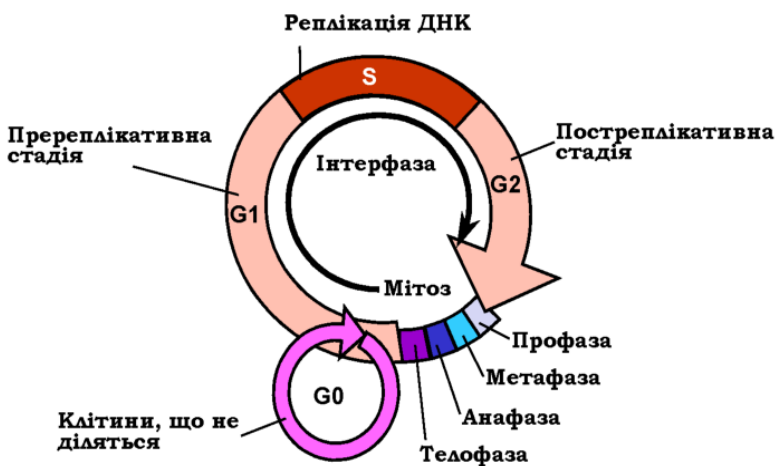


Рисунок 2.1 – Схема клітинного циклу [3]

У 1957 р. М. Мезельсон та Ф. Сталь експериментально довели напівконсервативний механізм реплікації ДНК (рис. 2.2). Напівконсервативність означає, що в складі молекули дочірньої ДНК один із ланцюгів є материнським.

Суть експерименту М. Мезельсона і Ф. Сталю: культуру клітин *E.coli* вирощували на середовищі з ізотопом  $N^{15}$ , відповідно молекули ДНК містили  $N^{15}$ . При

перенесенні культури *E.coli* на середовище з  $N^{14}$  було встановлено, що в першому поколінні клітин у молекулах ДНК один із ланцюгів містить  $N^{15}$ , а інший –  $N^{14}$ . Таким чином, дочірні молекули ДНК містили один ланцюг материнський, а інший – новий синтезований. Учені зробили висновок, що від одного покоління до іншого передається один із ланцюгів материнської молекули ДНК.

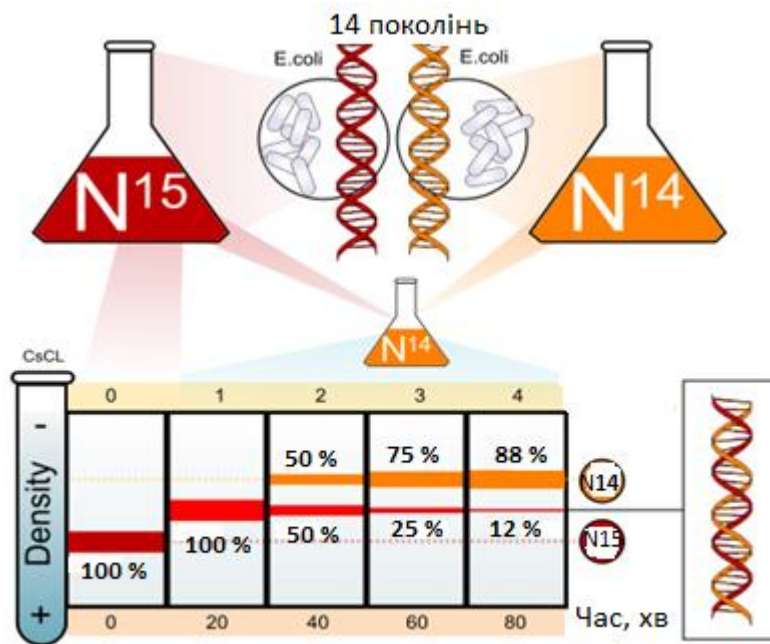


Рисунок 2.2 – Схеми експерименту М. Мезельсона та Ф. Сталя [13]

У 1956 р. А. Корнберг уперше синтезував ДНК *in vitro*, використовуючи як матрицю одинарний ланцюг ДНК. А. Корнберг виділив із клітин *E.coli* фермент, що каталізував процес полімеризації ДНК з нуклеотидів. Цей фермент одержав назву ДНК-полімерази.

У 1959 р. С. Очоа та А. Корнберг отримали Нобелівську премію за відкриття механізмів біосинтезу ДНК і РНК [1].

Реплікація здійснюється трьома етапами:

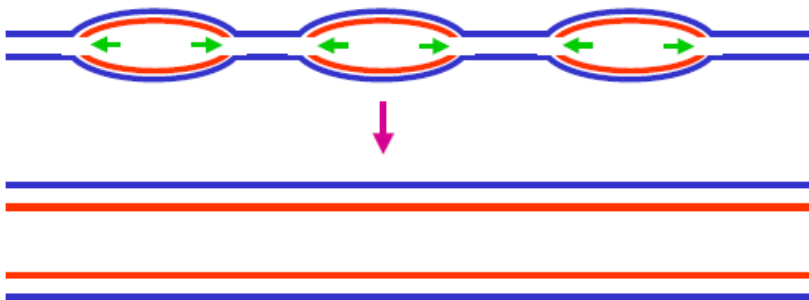
- ініціація – утворення реплікативної вилки;
- елонгація – синтез дочірніх ланцюгів ДНК;
- термінація – завершення синтезу.

Реплікативна вилка утворюється в ділянці ДНК, що містить специфічні послідовності – **точки початку реплікації** – **Ori (origin of replication)**. Довжина Ori становить приблизно 300 нуклеотидів. Особливістю нуклеотидних послідовностей Ori є високий вміст пар А-Т, що полегшує розкручування ланцюгів ДНК. Як відомо, між А-Т утворюються 2 водневі зв'язки, а між Г-Ц – 3. Тому на розрив зв'язків між А-Т витрачається менше енергії.

Ділянка ДНК, реплікація якої здійснюється під контролем однієї точки початку реплікації, називається **репліконом**.

У прокаріотів молекула ДНК має кільцеву форму і містить одну точку початку реплікації. Таким чином, молекула ДНК прокаріотів являє собою один реплікон.

В еукаріотів молекула ДНК є лінійною і містить багато точок початку реплікації (рис. 2.3).



*Рисунок 2.3 – Реплікація еукаріотичної хромосоми [8]*

Швидкість реплікації в прокариотів становить 750 нуклеотидів/с, в еукаріотів – 60–90 нуклеотидів/с.

Для здійснення реплікації ДНК необхідні такі компоненти: ДНК-матриця, SSB-білки, ферменти (топоізомераза, хеліказа, праймаза, ДНК-полімерази різних типів, ДНК-лігаза), йони  $Mg^{2+}$  і  $Zn^{2+}$ .

Ферменти топоізомераза і хеліказа (DnaB), а також SSB-білки забезпечують формування реплікативної вилки (рис. 2.4).

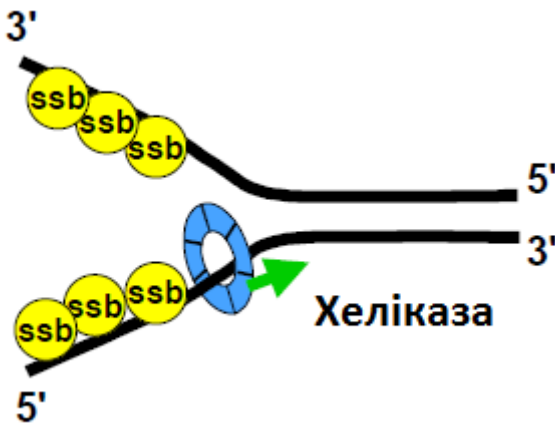


Рисунок 2.4 – Формування реплікативної вилки [8]

**Топоізомераза** розкручує спіраль ДНК і ліквідує супервитки. Механізм дії топоізомерази полягає в розриві одного або двох полінуклеотидних ланцюгів ДНК, зміні їх конформації та подальшому з'єднанні. Топоізомераза I здійснює одноланцюговий розрив ДНК, топоізомераза II (гіраза) – дволанцюговий. Відомо 11 різних топоізомераз.

**Хеліказа** руйнує водневі зв'язки між комплементарними парами азотистих основ, розкручує подвійну спіраль ДНК на одинарні ланцюги. Хеліказа переміщується вздовж ДНК за рахунок енергії гідролізу АТФ [1].

**SSB-білки** (single-stranded DNA binding protein) стабілізують одинарні ланцюги ДНК, запобігають їх з'єднанню. Коли ланцюги ДНК використовуються як матриці для синтезу нової ДНК, SSB-білки видаляються.

У реплікативній вилці синтезуються 2 дочірні ланцюги ДНК: лідируючий та ланцюг, що запізнюється (рис. 2.5). Синтез ланцюгів ДНК здійснюється в напрямку  $5' \rightarrow 3'$ .

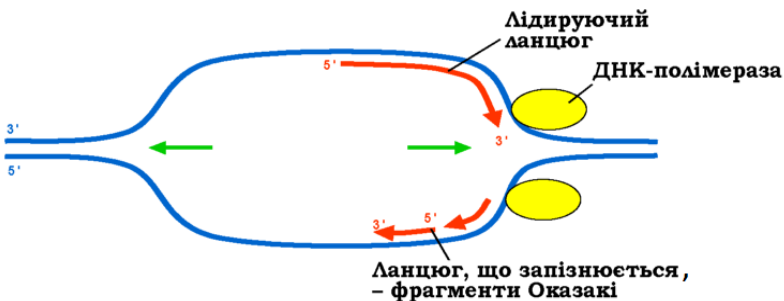


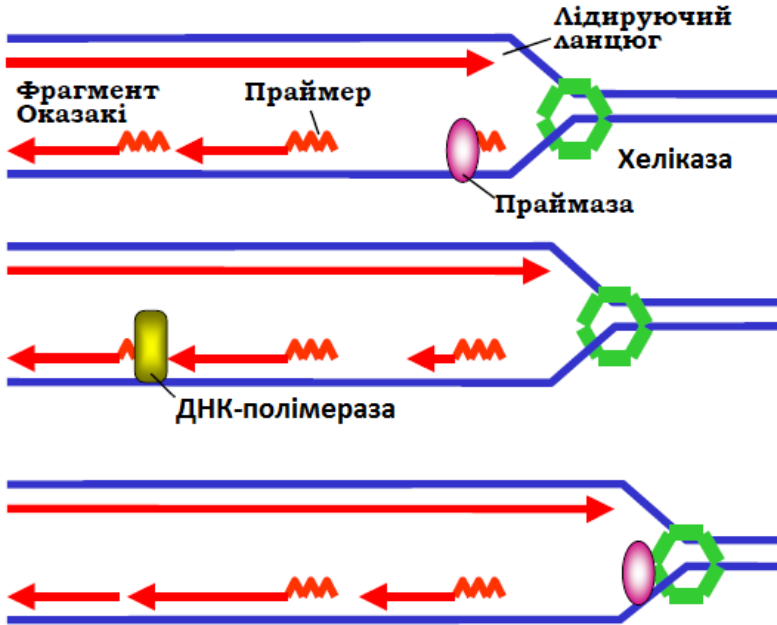
Рисунок 2.5 – Напрямок синтезу дочірніх ланцюгів ДНК [3]

Лідируючий ланцюг синтезується безперервно, а ланцюг, що запізнюється, – у вигляді фрагментів Оказакі. Довжина фрагментів Оказакі в бактерій становить 1–2 тис. нуклеотидів.

Синтез полінуклеотидних ланцюгів ДНК каталізує **ДНК-полімераза**. Субстратами ДНК-полімерази є dATФ, dГТФ, dЦТФ, dТТФ.

ДНК-полімераза не ініціює утворення нового ланцюга, оскільки не може з'єднати 2 вільних нуклеотиди. ДНК-полімераза добудовує нуклеотиди до вже існуючого олігонуклеотиду – праймера. Праймер являє собою короткий фрагмент РНК. Праймер складається з 2–10 нуклеотидів, він комплементарний ДНК-матриці.

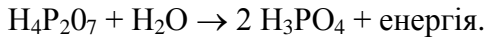
Синтез праймера каталізує **праймаза** (рис. 2.6).



*Рисунок 2.6 – Робота праймази та ДНК-полімерази під час руху реплікативної вилки [8]*

ДНК-полімераза приєднує нуклеотиди до 3'-ОН-групи пентози (рис. 2.7).

Унаслідок приєднання нуклеотиду відщеплюється пірофосфат, енергія гідролізу якого використовується для здійснення полімеразної реакції:





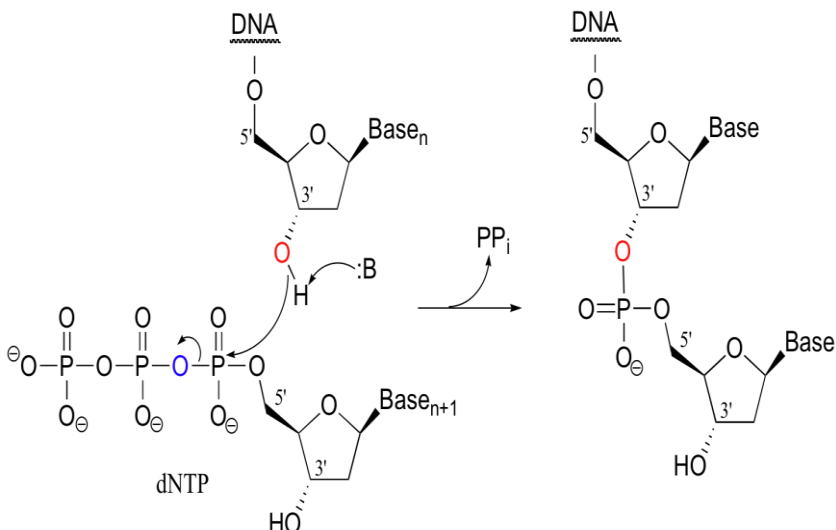


Рисунок 2.7 – Схема ДНК-полімеразної реакції

У *E. coli* розрізняють **3 типи ДНК-полімераз:**

– **ДНК-полімераза I**, видаляє праймери і добудовує замість них послідовності ДНК, бере участь у процесах **репарації** – виправлення помилок реплікації та пошкоджень ДНК.

Фермент є унікальним, оскільки має 3 види каталітичної активності: полімеразну (синтез ДНК), 5'→3'-екзонуклеазну (видалення праймерів), 3'→5'-екзонуклеазну (репарація) активності;

– **ДНК-полімераза II**, забезпечує репарацію ДНК. Фермент має полімеразну та 3'→5'-екзонуклеазну активності;

– **ДНК-полімераза III**, каталізує синтез дочірніх ланцюгів ДНК у реплікативній вилці, є основним ферментом реплікації. Фермент має полімеразну та 3'→5'-екзонуклеазну активність.

Кожен із дочірніх ланцюгів ДНК синтезує окрема молекула ДНК-полімерази, таким чином, у реплікативній

вилці *E. coli* міститься дві молекули ДНК-полімерази III (рис. 2. 8).

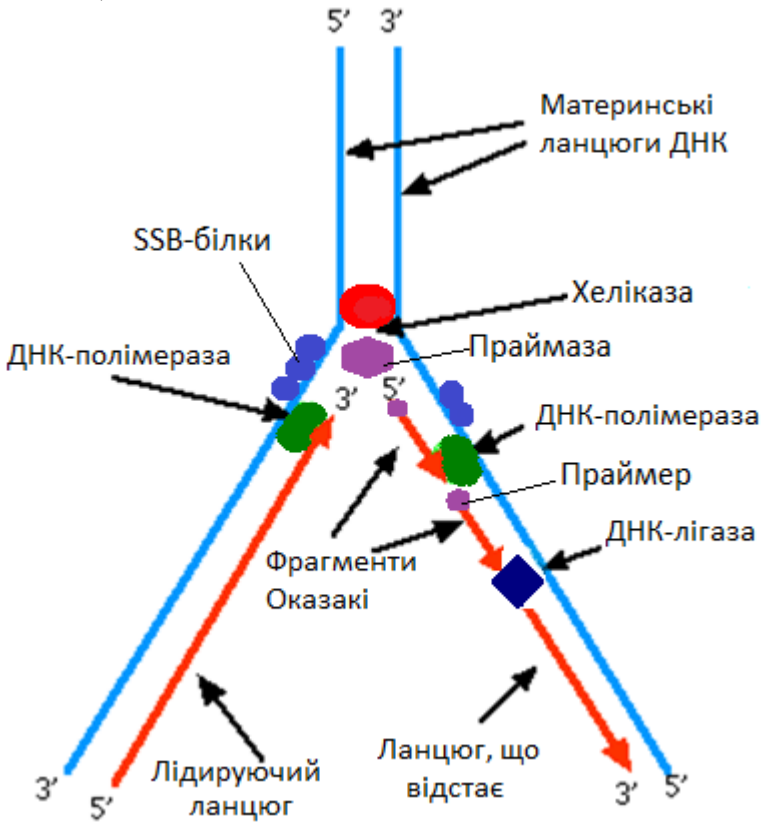


Рисунок 2.8 – Структура реплікативної вилки *E.coli*

Під час синтезу ланцюга, що відстає, ДНК-полімераза I видаляє праймери з фрагментів Оказакі та добуває утворені проміжки дезоксирибонуклеотидами.

ДНК-лігаза каталізує з'єднання фрагментів ДНК за рахунок утворення 3', 5'-фосфодіефірних зв'язків (рис. 2.9). Більшість ДНК-лігаз прокариотів та еукаріотів використовують АТФ, а ДНК-лігаза *E.coli* – НАД<sup>+</sup> [1].

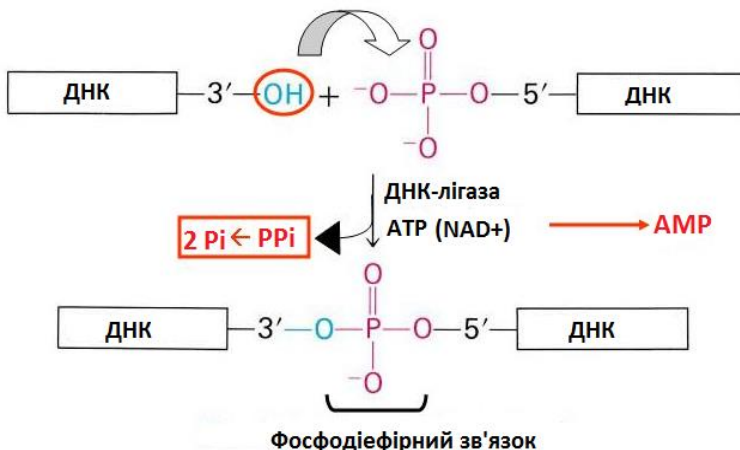


Рисунок 2.9 – Схема реакції за участі ДНК-лігази

Після завершення синтезу дочірніх ланцюгів ДНК відбувається їх метилювання. Ферменти метилази приєднують метильну групу до аденінів у послідовностях ГАТЦ [15].

### **Корекція неправильного спарювання азотистих основ за участі ДНК-полімерази III.**

У процесі реплікації ДНК трапляються помилки – приєднання некомплементарного нуклеотида.

В *E.coli* частота помилок під час реплікації ДНК становить 1 на  $10^{10}$  основ. У процесі реплікації ДНК ссавців довжиною 3 млрд п. н., виникає не більше ніж 3 помилки. Висока точність реплікації забезпечується наявністю спеціальних механізмів, що здійснюють корекцію неправильного з'єднання азотистих основ, тобто виправлення помилок реплікації.

Суть механізму корекції помилок полягає в тому, що ДНК-полімераза III двічі перевіряє комплементарність кожного нуклеотиду матриці ДНК: спочатку перед включенням його в дочірній ланцюг, а потім перед приєднанням наступного нуклеотиду. Фосфодієфірний зв'язок утворюється лише в тому разі, якщо останній

вбудований нуклеотид дочірнього ланцюга ДНК комплементарний нуклеотиду материнського ланцюга ДНК. У випадку помилки ДНК-полімераза III вирізає неправильний нуклеотид і замінює його на правильний.

Механізм, за допомогою якого ДНК-полімераза III обирає правильний нуклеотид, базується на моделі Уотсона – Кріка: пари комплементарних азотистих основ мають певну просторову конфігурацію, що розпізнається ферментом (рис. 2.10). Наявність некомплементарного нуклеотиду спричиняє деформацію подвійної спіралі ДНК.

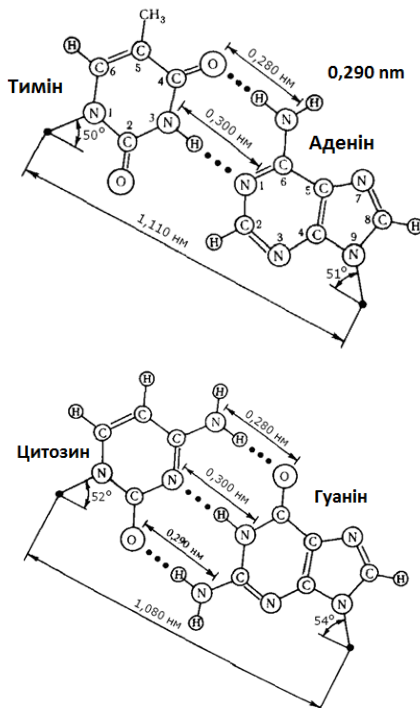


Рисунок 2.10 – Геометричні характеристики пари азотистих основ Уотсона – Кріка [1]

### Особливості реплікації в еукаріотів

ДНК еукаріотів містить велику кількість точок початку реплікації, тобто є полірепліконною. Одночасна реплікація багатьох репліконів дозволяє копіювати всю генетичну інформацію еукаріотів за 9 годин.

Еукаріоти мають **5 типів ДНК-полімераз**:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -полімерази. ДНК-полімерази  $\alpha$  і  $\delta$  каталізують реплікацію ядерної ДНК. ДНК-полімераза  $\gamma$  здійснює реплікацію мітохондріальної ДНК. ДНК-полімерази  $\beta$  і  $\epsilon$  виконують функцію репарації.

Хромосоми еукаріотів лінійні. При кожній реплікації відбувається вкорочення хромосом (рис. 2.11).

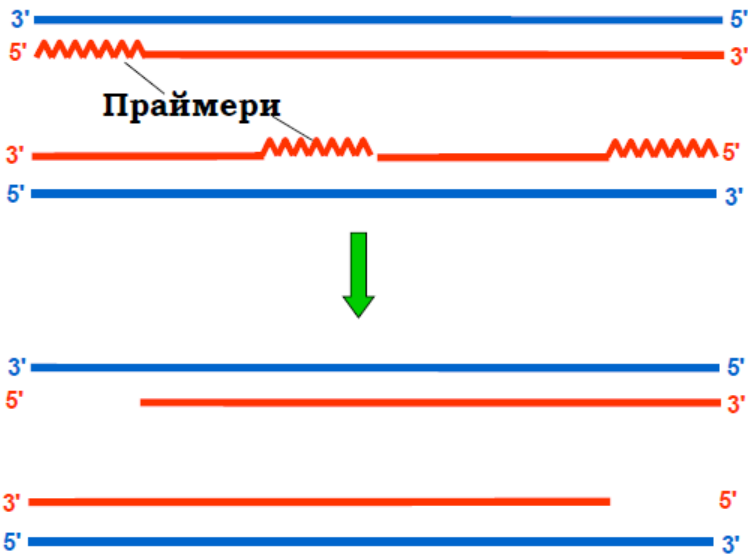


Рисунок 2.11 – Дві дочірні лінійні молекули ДНК після реплікації [8]

Для запобігання вкороченню генів на кінцях хромосом еукаріотів знаходяться спеціальні повторювані послідовності нуклеотидів – **теломерні ДНК**.

Кінці хромосом, що містять теломерну ДНК, називаються теломерами.

Теломерна ДНК не містить генів. Теломерні послідовності ДНК у різних організмів дуже подібні: в найпростіших теломерні повтори ТТГГГГ, у рослин, тварин, риб, птахів і людини – ТТАГГГ.

Фермент **теломераза** добудовує послідовності теломерної ДНК і таким чином подовжує її (рис. 2.12).

Висока теломеразна активність характерна для статевих клітин, їх теломери містять найбільшу кількість ДНК-повторів. У нервових та м'язових клітинах найменша довжина теломер. Довжина теломерної ДНК людини становить від 2 до 20 тис. п. н.

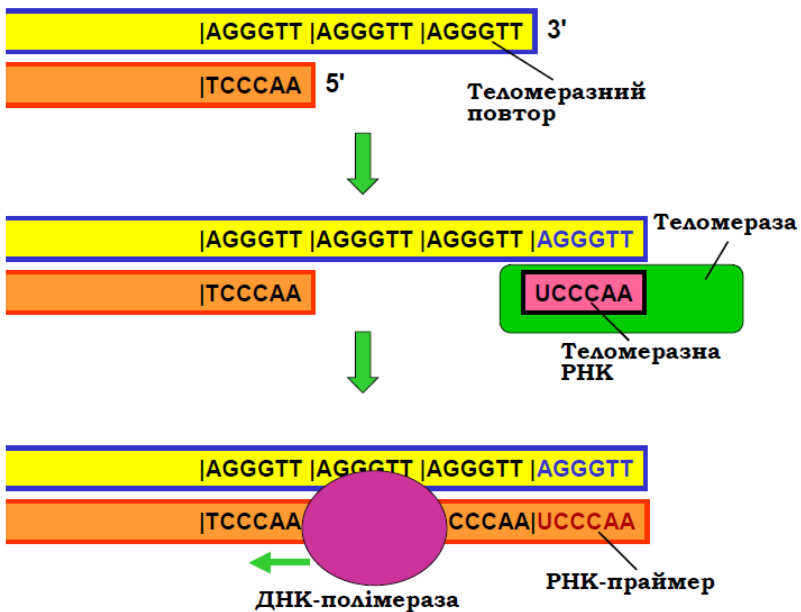


Рисунок 2.12 – Подовження теломерної ДНК [8]

Теломери в більшості клітин укорочуються з віком, це може бути важливим фактором, що визначає тривалість

життя. У 60-х рр. XX ст. Леонард Хейфлік установив, що клітини пухлин в оптимальних умовах можуть ділитися безмежну кількість разів, а соматичні клітини людини – обмежену кількість разів. Так, соматичні клітини новонароджених ділилися в культурі 80–90 разів, а клітини людей віком 70 років – 20–30 разів [14]. Кількість можливих поділів клітин у культурі назвали **лімітом Хейфліка**. Для більшості клітин людини ліміт Хейфліка становить 52 поділи. Хейфлік установив, що при старінні в клітинах порушується процес реплікації, наслідком цього є загибель клітин.

У 1998 р. Джеррі Шей, Вудринг Райт активували в соматичних клітинах людини фермент теломеразу, що дозволило клітинам подолати ліміт Хейфліка майже вдвічі. Оновлення теломер запобігало старінню клітин.

## 2.2. Транскрипція

**Транскрипція** – це процес синтезу РНК на матриці ДНК.

Ген – ділянка ДНК, що функціонує як матриця для синтезу РНК.

Існують гени, що кодують мРНК, тРНК, рРНК.

Кожний ген має 3 структурні ділянки: промотор, кодуючу ділянку, ділянку термінації (рис. 2.13).

**Промотор** – ділянка ДНК, з якої починається транскрипція.

Кодуюча ділянка містить послідовність нуклеотидів, на основі якої синтезується РНК.

У ділянці термінації транскрипція завершується.

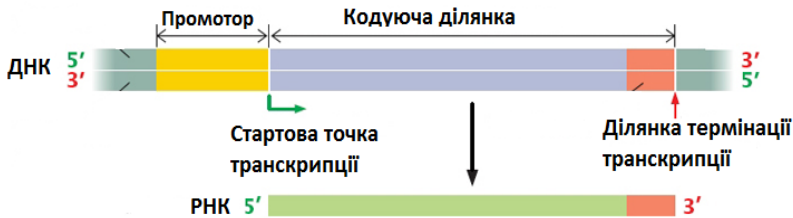


Рисунок 2.13 – Схематична структура гена

**Транскриптон** – ділянка між промотором і термінатором.

**Транскрипт** – синтезована молекула РНК.

Для здійснення транскрипції необхідні такі компоненти: ДНК-матриця, РНК-полімераза, рибонуклеозидтрифосфати (УТФ, ЦТФ, ГТФ, АТФ), білкові фактори транскрипції, йони  $Mg^{2+}$  та  $Zn^{2+}$ .

Розрізняють **3 етапи транскрипції**:

- ініціацію – приєднання РНК-полімерази до промотору;
- елонгацію – синтез полінуклеотидного ланцюга РНК;
- термінацію – завершення транскрипції; відокремлення транскрипта РНК від матриці ДНК (рис. 2.14).

**Ініціація транскрипції** починається з приєднання РНК-полімерази до промотору. Довжина промотору становить приблизно 40 нуклеотидів.

Промотор містить специфічні послідовності – **сигнали початку транскрипції**. Ці послідовності називають консенсусними, бо вони часто спостерігаються в різних генах і майже не змінюються.



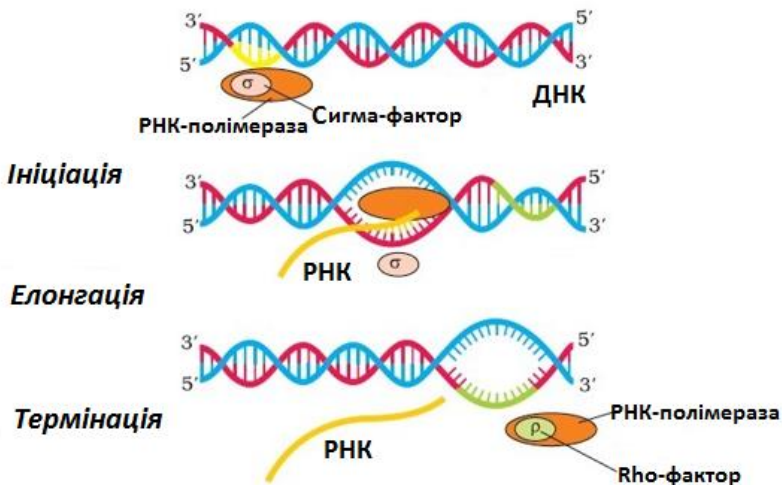


Рисунок 2.14 – Етапи транскрипції

У промоторі *E.coli* існують дві консенсусні послідовності: **бокс Прибнова** або **ТАТА-бокс** (розміщений на відстані  $-10$  пар основ щодо стартової точки транскрипції) і  **$-35$ -бокс** (рис. 2.15).

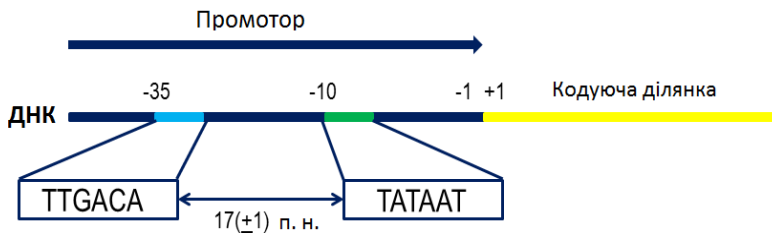


Рисунок 2.15 – Консенсусні послідовності елементів промотору *E.coli*

До консенсусних послідовностей промотору приєднуються білкові фактори транскрипції та

РНК-полімераза. У прокаріотів РНК-полімераза складається з декількох субодиниць: 2  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  (рис. 2.16).

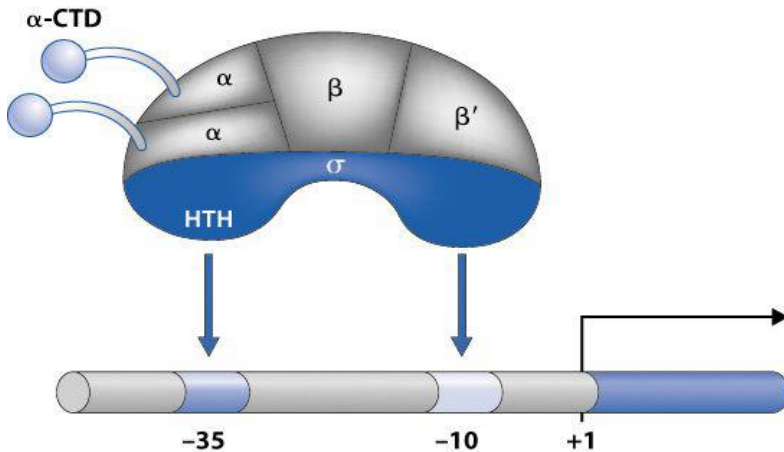


Рисунок 2.16 – Схема організації субодиниць прокаріотичної РНК-полімерази [13]

РНК-полімераза не може «самостійно» розпізнавати сайт ініціації транскрипції, оскільки має спорідненість до будь-якої ділянки ДНК. При з'єднанні з цитоплазматичним білком – **сигма-фактором** ( $\sigma$ ) – РНК-полімераза втрачає спорідненість до випадкових ділянок ДНК, але міцно зв'язується з боксом  $-35$  та боксом Прибнова.

РНК-полімераза розділяє ланцюги ДНК та ініціює синтез РНК. Сигма-білок відокремлюється, РНК-полімераза рухається вздовж гена, синтезуючи РНК зі швидкістю 40 нуклеотидів за 1 с. Синтез РНК здійснюється в напрямку  $5' \rightarrow 3'$ .

РНК-полімераза здатна ініціювати синтез нового ланцюга, їй не потрібен праймер. Фермент розміщує перший нуклеотид комплементарно до матриці ДНК, а потім послідовно приєднує нуклеотиди до вільної

3'-ОН групи рибози. Унаслідок приєднання нуклеотиду відщеплюється пірофосфат (рис. 2.17).

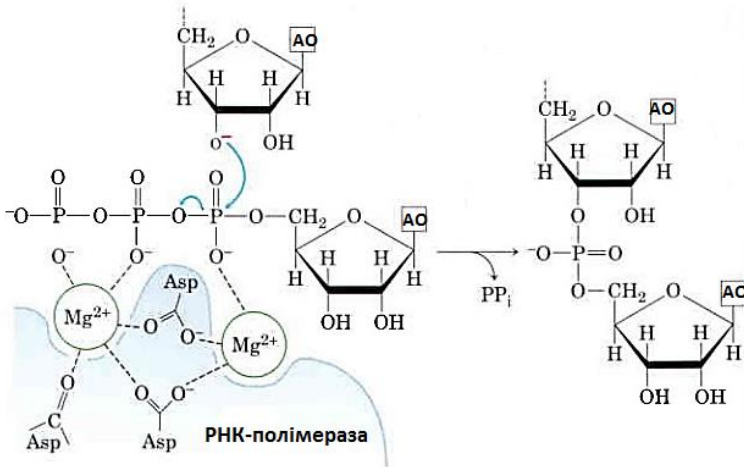


Рисунок 2.17 – Механізм РНК-полімеразної реакції

Енергія гідролізу пірофосфату використовується для здійснення РНК-полімеразної реакції.

**Елонгація транскрипції** – синтез полінуклеотидного ланцюга РНК.

На ділянці синтезу РНК подвійна спіраль ДНК розкручується, ланцюги відокремлюються один від одного, а після проходження РНК-полімерази з'єднуються знову. РНК-полімераза розкручує ділянку ДНК довжиною приблизно 17 пар основ, синтезований ланцюг РНК утворює з матричним ланцюгом ДНК подвійну спіраль РНК-ДНК довжиною 12 пар основ (рис. 2.18).

РНК-полімераза переміщується вздовж ДНК у напрямку 5' → 3'. Процес переміщення РНК-полімерази вздовж ланцюга ДНК називається **транслокацією**.

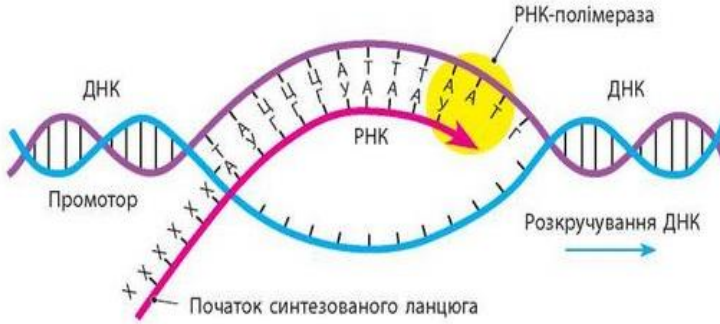


Рисунок 2.18 – Загальна схема механізму транскрипції [2]

Якщо РНК-полімераза досягає ділянки термінації транскрипції на 3'-кінці гена, синтез РНК завершується.

**Термінація транскрипції** в прокаріотів здійснюється за такими механізмами:

- за рахунок утворення «шпильки» (рис. 2.19);
- за участі Rho-білка (рис. 2.20).

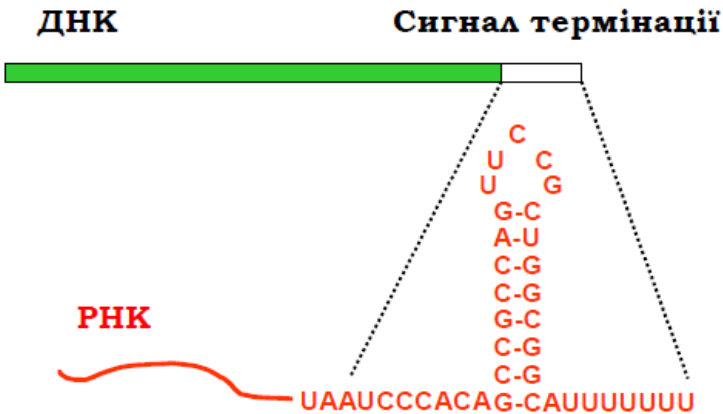
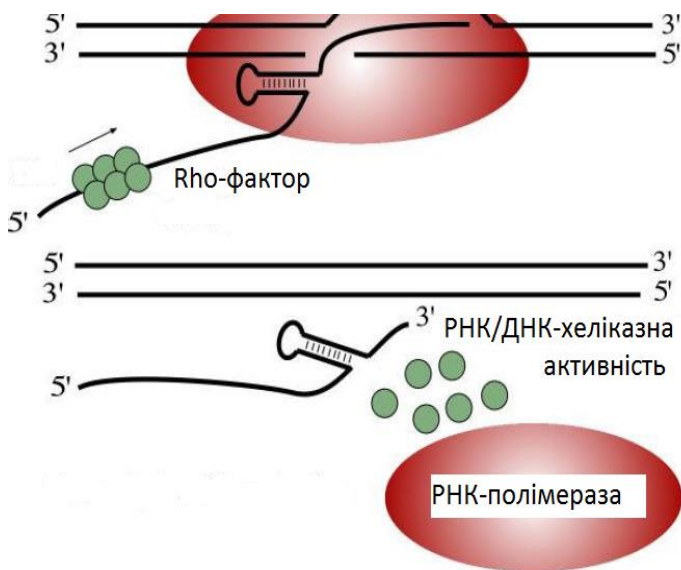


Рисунок 2.19 – Формування структури «шпильки» у транскрипті РНК [8]

На 3'-кінці деяких генів прокаріотів розміщуються специфічні послідовності, що забезпечують формування структури «шпильки» в синтезованій РНК. Ця структура утворюється за рахунок з'єднання комплементарних азотистих основ водневими хімічними зв'язками. Структура «шпильки» полегшує відокремлення транскрипта РНК від матриці ДНК, тобто забезпечує термінацію транскрипції.

Термінація транскрипції також може відбуватися за участі спеціальних білків.

**Rho-білок ( $\rho$ )** має хеліказну активність: роз'єднує димер – транскрипт РНК-матрицю ДНК – за рахунок руйнування водневих хімічних зв'язків.



*Рисунок 2.20 – Термінація транскрипції за участі Rho-фактора*

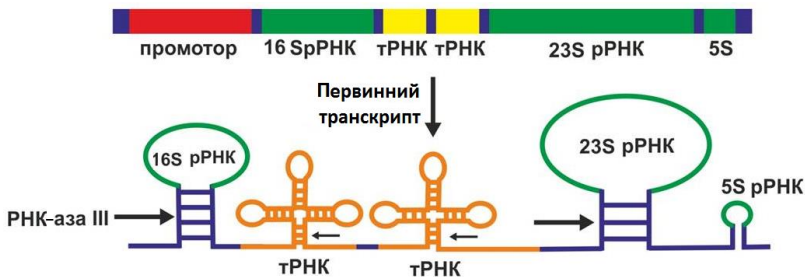
Rho-білок приєднується до транскрибованої мРНК і рухається вздовж неї позаду РНК-полімерази. На ділянці

термінації РНК-полімераза припиняється, Rho-фактор відокремлює РНК-транскрипт від ДНК, завершуючи транскрипцію.

У прокаріотів синтезована молекула РНК містить декілька генів, тобто є **поліцистронною**.

**Цистрон** – ген, що контролює одну функцію.

У бактерій різні типи рРНК і тРНК утворюються з одного первинного транскрипта (рис. 2.21).



*Рисунок 2.21 – Синтез рРНК і тРНК у прокаріотів*

### Особливості транскрипції генів у еукаріотів

В еукаріотів синтезована мРНК містить один ген, тобто є **моноцистронною**.

Транскрипцію здійснюють 3 типи ДНК-залежної РНК-полімерази:

- РНК-полімераза I, каталізує синтез 18, 28, 5,8 S рРНК;
- РНК-полімераза II, каталізує синтез мРНК;
- РНК-полімераза III, каталізує синтез тРНК і 5S рРНК.

Оскільки синтез мРНК каталізує РНК-полімераза II, гени еукаріотів називають **генами II типу**.

ДНК еукаріотів знаходиться у суперспіралізованому стані. У складі хроматину ДНК з'єднана з білками. Перед початком транскрипції здійснюється розпаковування ДНК, тобто відокремлення її від білків (рис. 2.22).

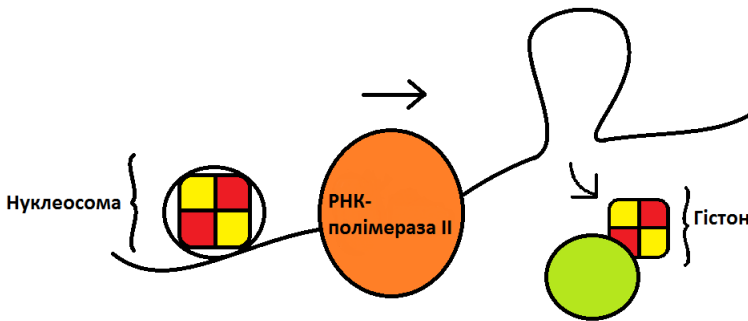
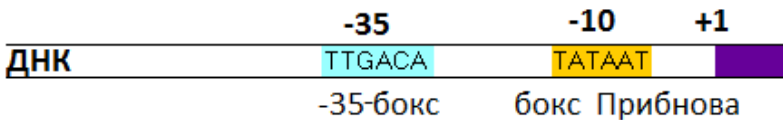


Рисунок 2.22 – Розпаковування ДНК еукаріотів на ділянках транскрипції

У промоторах 80 % генів еукаріотів міститься ТАТА-бокс із центром у положенні  $-25$ , подібний до боксу Прибнова у промоторі прокариотів (рис. 2.23).

На відміну від прокариотів гени еукаріотів є перервними, тобто містять екзони та інтрони (рис. 2.24) Екзони – нуклеотидні послідовності, що кодують структуру поліпептиду або РНК. Інтрони не містять генів і, очевидно, відіграють регуляторну роль.

### Промотор прокариотів



### Промотор еукаріотів

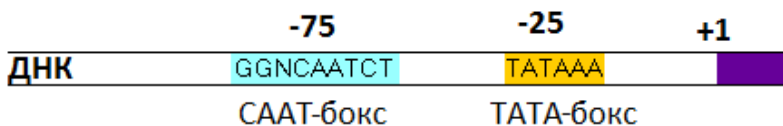


Рисунок 2.23 – Консенсусні послідовності в промоторах прокариотів та еукаріотів

У ДНК ссавців лише 2% нуклеотидних послідовностей є екзонами, а 98% – інтронами. У гені людини може бути від 2 до 50 інтронів, довжина яких становить 50–20 000 пар основ. Довжина екзонів не перевищує 1 000 пар основ.

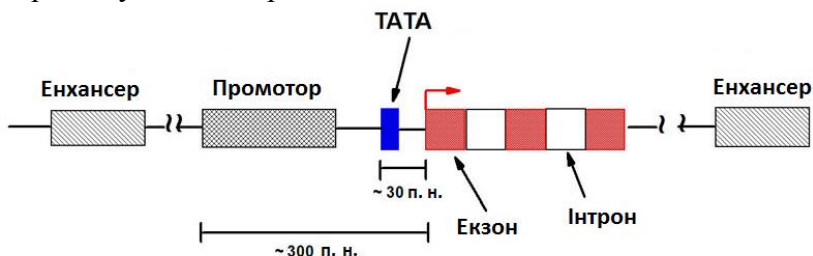


Рисунок 2.24 – Особливості структури генів еукаріотів

На відстані декількох тисяч пар основ від промотору розміщені регуляторні послідовності: енхансери та сайленсери. Зв'язування фактора транскрипції з енхансером активує ініціацію транскрипції. При з'єднанні регуляторного білка із сайленсером ініціація транскрипції пригнічується.

В ініціації транскрипції генів еукаріотів беруть участь численні білкові фактори транскрипції (TF), головним з яких є ТВР – TATA binding protein (рис. 2.25). Після приєднання факторів транскрипції з промотором зв'язується РНК-полімераза.

Після завершення процесу транскрипції молекула мРНК підлягає процесингу, тобто зазнає певних модифікацій.

**Процесинг** – посттранскрипційна модифікація або «дозрівання» пре-мРНК (пре-мРНК → мРНК).

Процесинг передбачає три процеси:

- сплайсинг;
- приєднання кепа до 5'-кінця мРНК;
- поліаденілування 3'-кінця мРНК.



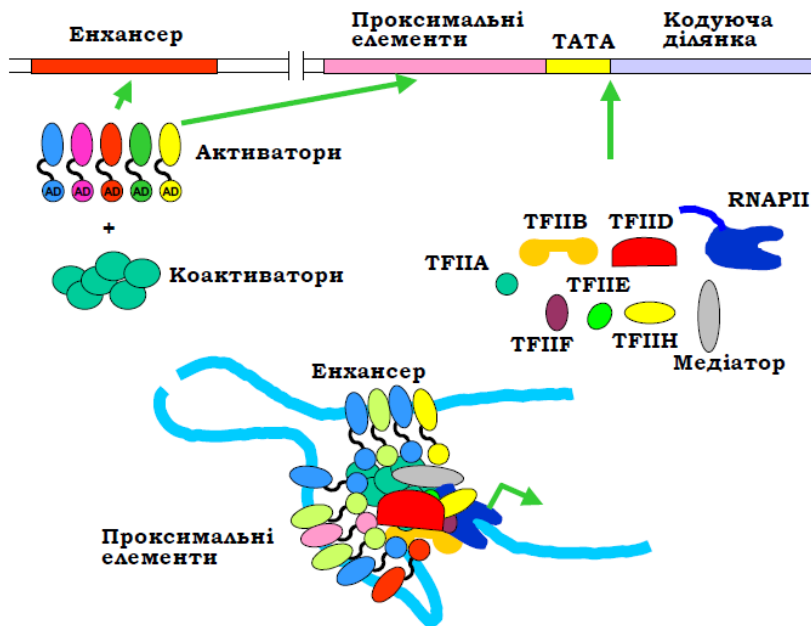


Рисунок 2.25 – Схема збирання комплексу активації транскрипції РНК-полімерази II [3]

Процес видалення інтронів із первинного транскрипта та об'єднання екзонів з утворенням зрілої молекули мРНК називають **сплайсингом**.

Процес сплайсингу каталізують рибонуклеопротейнові частинки – **сплайсосоми**.

Молекули РНК цих частинок позначають **мяРНК** – **мала ядерна РНК**.

На прикладі мяРНК була доведена каталітична роль РНК. Без участі ферментів мяРНК каталізує реакції сплайсингу. Під час сплайсингу мяРНК розпізнає специфічні послідовності на початку і в кінці інтрона. Кожен інтрон починається з GU, а закінчується – AG (рис. 2.26).

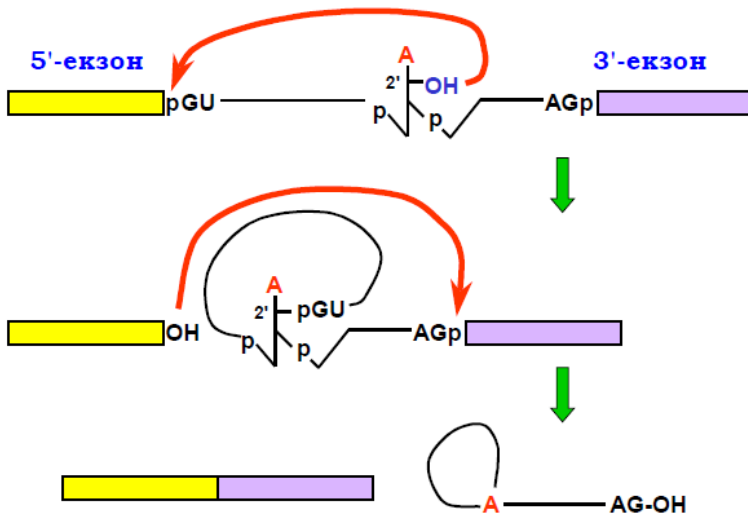


Рисунок 2.26 – Сплайсинг мРНК [8]

Відомі спадкові захворювання, спричинені мутаціями в інтронах і, як наслідок, порушенням сплайсингу. При генетичному захворюванні β-таласемії порушується синтез β-ланцюга гемоглобіну, оскільки з 5'-кінця інтрона Г замінюється на А, тому первинний транскрипт не перетворюється на зрілу мРНК належним чином.

Зміна характеру сплайсингу екзонів у різних тканинах одного й того ж самого РНК-попередника приводить до утворення різних РНК. У результаті РНК, що транскрибується з одного гена, забезпечує синтез білків із різними властивостями. Це явище одержало назву **альтернативного сплайсингу** (рис. 2.27).

Механізм альтернативного сплайсингу може використовуватися в різних тканинах або в одній тканині, але в різний час. Явище альтернативного сплайсингу має місце у м'язовій тканині, де утворюються подібні за структурою, але відмінні за функціями білки. У нервовій

тканині альтернативний сплайсинг використовується для синтезу різноманітних білків оболонки нервових волокон.

Вибір варіанта сплайсингу пре-РНК є способом регуляції активності генів у різних клітинах організму.

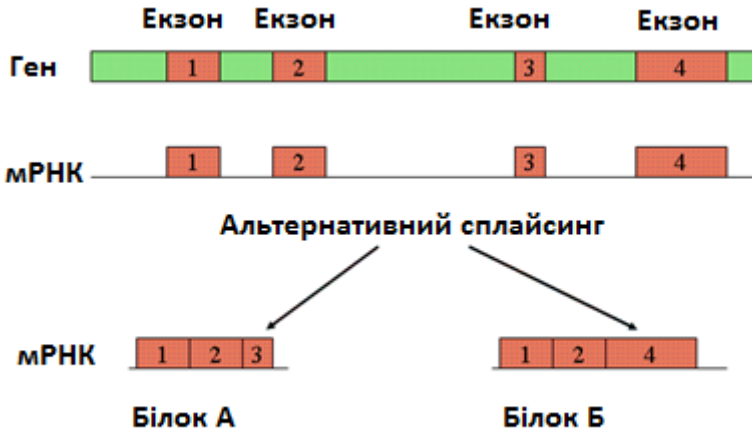


Рисунок 2.27 – Схема альтернативного сплайсингу [2]

Після завершення сплайсингу кінці мРНК еукаріотів зазнають хімічних модифікацій: до 5'-кінця мРНК приєднується кеп (метилгуанінова група), до 3'-кінця – полі-А-«хвіст» (200 аденілових нуклеотидів).

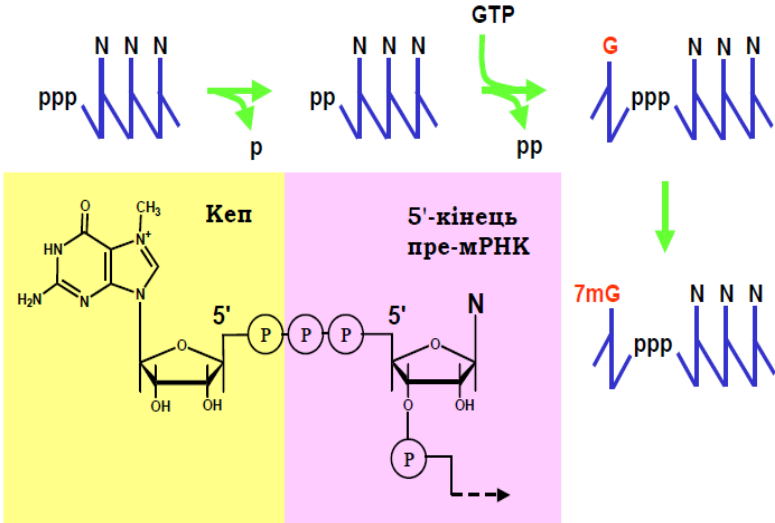
Схематична структура зрілої мРНК еукаріотів, що може бути матрицею в процесі біосинтезу білка, зображена на рисунку 2.28.

У процесі кепування використовується ГТФ (рис. 2.29), у процесі поліаденілування – АТФ.

Кепування та поліаденілування забезпечують стабільність мРНК, оскільки захищають кінці молекули від руйнівної дії екзонуклеаз.

**Кеп****Кодуюча ділянка***Рисунок 2.28 – Схема будови мРНК еукаріотів[3]*

Кеп забезпечує транспорт мРНК у цитоплазму. Крім того, кеп відіграє важливу роль в ініціації трансляції. Кеп є первинною точкою збирання рибосоми та інших елементів ініціації білкового синтезу.

*Рисунок 2.29 – Стадії утворення та хімічна структура кеп [8]*

## Зворотна транскрипція у ретровірусів

Ретровіруси, зокрема ВІЛ, містять фермент – зворотну транскриптазу, що каталізує процес зворотної транскрипції – синтезу вірусної ДНК на матриці вірусної РНК (рис. 2.30).

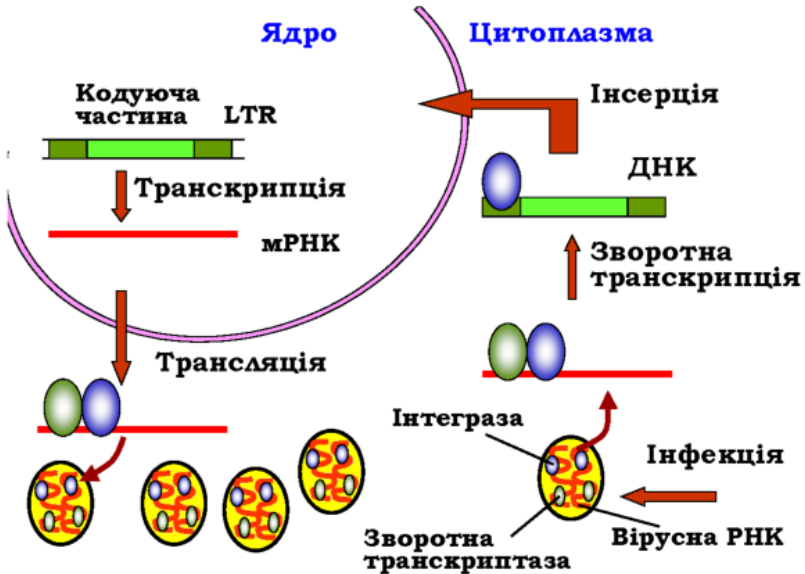


Рисунок 2.30 – Життєвий цикл ретровірусу [3]

Синтезована вірусна ДНК вбудовується в геном клітини-хазяїна і забезпечує синтез вірусних білків.

## Реплікація РНК у вірусів

Життєвий цикл деяких вірусів включає процес реплікації РНК – самоподвоєння вірусної РНК (рис. 2.31).

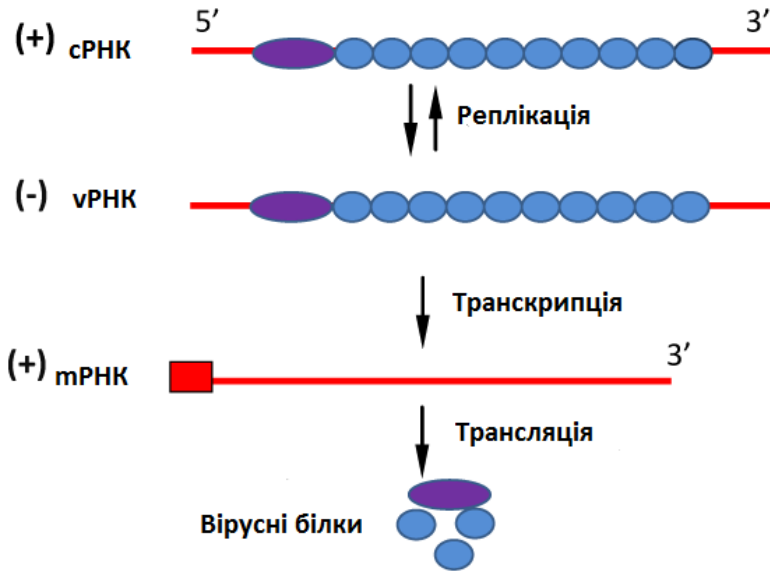


Рисунок 2.31 – Реплікація вірусної РНК

Реплікацію вірусних РНК каталізують ферменти РНК-реплікази або РНК-залежні РНК-полімерази.

## 2.3. Трансляція

**Трансляція** – біосинтез білка на рибосомах.

В організмі людини налічуються десятки тисяч різних білків. Первинна структура кожного білка визначається послідовністю нуклеотидів у гені, що його кодує. Одним із найбільш визначних наукових відкриттів ХХ ст. є розшифрування генетичного коду.

У 1954 р. Г. А. Гамов уперше сформулював уявлення про генетичний код як відповідність двох текстів, записаних за допомогою двох різних алфавітів (нуклеотидного та амінокислотного). З арифметичних міркувань Г. А. Гамов дійшов висновку, що одну амінокислоту кодують 3 нуклеотиди:  $4^3 = 64$  (4 – кількість різновидів нуклеотидів).

У 1965 р. Х. Г. Корана, Р. У. Холлі, М. У. Ніренберг розшифрували генетичний код. Це відкриття було удостоєне Нобелівської премії (1968 р.).

**Генетичний код** – це система запису інформації про первинну структуру поліпептидів за допомогою послідовності нуклеотидів у нуклеїнових кислотах.

**Властивості генетичного коду:**

– **універсальність** – генетичний код однаковий в усіх живих організмів;

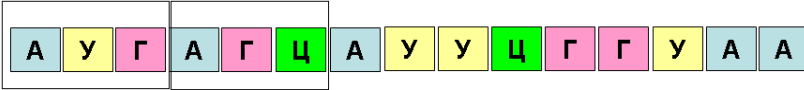
– **триплетність** – три нуклеотиди кодують амінокислоту;

– **виродженість** – одна й та сама амінокислота кодується декількома кодонами;

– **код не перекривається** – нуклеотиди одного триплету не входять до складу іншого;

– **односпрямованість** – кодони транлюються в напрямку 3' → 5';

– **безперервність** – кодони не розділяються між собою, тобто інформація зчитується безперервно.



5' → 3'

Із 64 кодонів генетичного коду 61 кодують амінокислоти, а 3 кодони **УАА, УАГ, УГА** є **стоп-кодонами**, що сигналізують про термінацію трансляції (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Таблиця генетичного коду [8]

		2-й нуклеотид			
		У	С	А	Г
1-й нуклеотид	У	UUU } UUC } <b>Phe</b>	UCU } UCC } <b>Ser</b>	UAU } UAC } <b>Tyr</b>	UGU } UGC } <b>Cys</b>
	С	UUA } UUG } <b>Leu</b>	UCA } UCG } <b>Ser</b>	UAA } UAG } <b>Stop</b>	UGA } <b>Stop</b> UGG } <b>Trp</b>
	А	CUU } CUC } <b>Leu</b>	CCU } CCC } <b>Pro</b>	CAU } CAC } <b>His</b>	CGU } CGC } <b>Arg</b>
	Г	CUA } CUG } <b>Leu</b>	CCA } CCG } <b>Pro</b>	CAA } CAG } <b>Gln</b>	CGA } CGG } <b>Arg</b>
2-й нуклеотид	У	AUU } AUC } <b>Ile</b>	ACU } ACC } <b>Thr</b>	AAU } AAC } <b>Asn</b>	AGU } AGC } <b>Ser</b>
	С	AUA } AUG } <b>Met</b>	ACA } ACG } <b>Thr</b>	AAA } AAG } <b>Lys</b>	AGA } AGG } <b>Arg</b>
	А	GUU } GUC } <b>Val</b>	GCU } GCC } <b>Ala</b>	GAU } GAC } <b>Asp</b>	GGU } GGC } <b>Gly</b>
	Г	GUA } GUG } <b>Val</b>	GCA } GCG } <b>Ala</b>	GAA } GAG } <b>Glu</b>	GGA } GGG } <b>Gly</b>

Триплети, що кодують однакову амінокислоту, подібні між собою. Наприклад, ізолейцин кодують AUU, AUC, AUA, що відрізняються лише за 3-ю основою. Завдяки цьому мутації, що спричиняють заміну азотистої



основи, не впливають на структуру синтезованого білка (AUU → AUC → ізолейцин).

**Компоненти системи трансляції:**

- рибосоми;
- 20 амінокислот;
- тРНК;
- мРНК;
- ферменти (аміноацил-тРНК-синтетаза, пептидил-трансфераза, транслоказа);
- білкові фактори ініціації, елонгації, термінації;
- АТФ, ГТФ;
- $Mg^{2+}$ .

**Загальний принцип синтезу білка:** рибосома приєднується до 5'-кінця мРНК і рухається в напрямку до 3'-кінця, з'єднуючи аміноацильні групи. У кінці молекули мРНК рибосома натрапляє на стоп-кодон, синтезований білок вивільняється, рибосома відокремлюється і дисоціює на субодиниці (рис. 2.32).

**Трансляція здійснюється трьома етапами:**

- ініціація;
- елонгація;
- термінація.

На етапі ініціації формується **ініціаторний комплекс**, до складу якого входять мРНК, мала субодиниця рибосоми, ініціаторна аміноацил-тРНК (тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>), білкові фактори ініціації. Приєднання великої субодиниці рибосоми завершує етап ініціації трансляції.

Першою амінокислотою, що бере участь у синтезі білка, є форміл-метіонін (f-Met) у прокаріотів або метіонін – в еукаріотів (рис. 2.33). В *E.coli* фермент трансформілаза добудовує формільну групу до метіоніну. Донором формільної групи є  $N^{10}$ -формілтетрагідрофолат. До завершення синтезу білка формільна група видаляється. тРНК, що приєднує f-Met, називають **ініціаторною**.

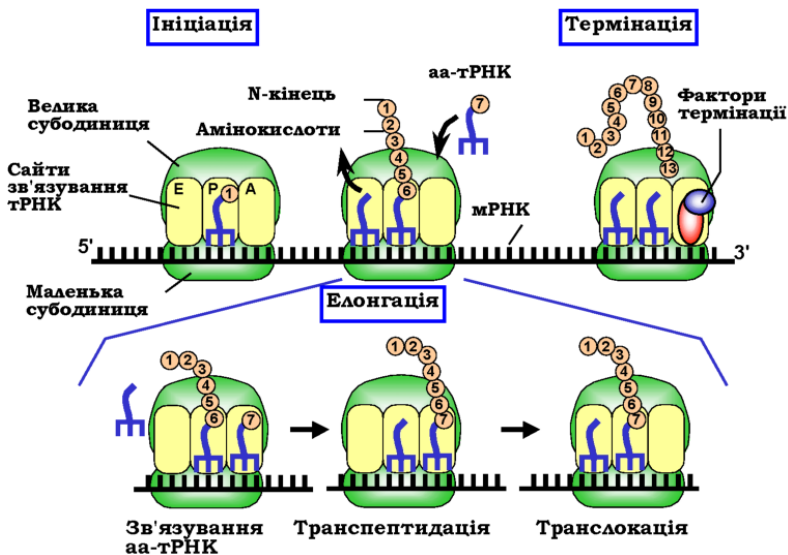


Рисунок 2.32 – Схема трансляції [3]

На 3'-кінці всіх тРНК розміщується послідовність ЦЦА, що відіграє роль акцепторної ділянки. До акцепторної ділянки тРНК приєднується амінокислота.

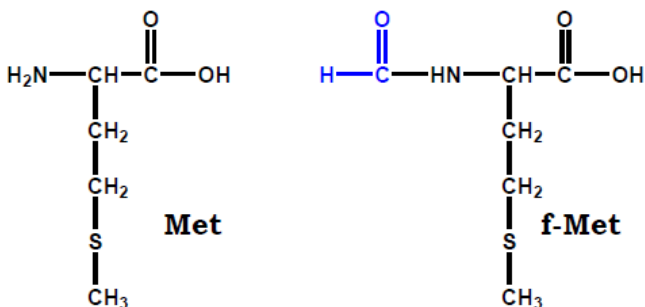


Рисунок 2.33 – Метіонін та N-формілметіонін [8]

**Реакції аміноацилювання** (приєднання амінокислоти до тРНК) каталізують **аміноацил-т-РНК-синтетази** (рис. 2.34).

Аміноацил-тРНК-синтетази розпізнають три субстрати: амінокислоту, тРНК і АТФ. В активному центрі ферменту відбуваються активація амінокислоти та приєднання її до рибози в складі молекули тРНК.

Реакції аміноацилювання здійснюються двома етапами:

- 1) амінокислота + АТФ → аміноацил-АМФ + ФФН;
- 2) аміноацил-АМФ + тРНК → аміноацил-тРНК + АМФ.

*Сумарне рівняння реакції аміноацилювання:*

Амінокислота + тРНК + АТФ → аміноацил-тРНК + АМФ + ФФН.

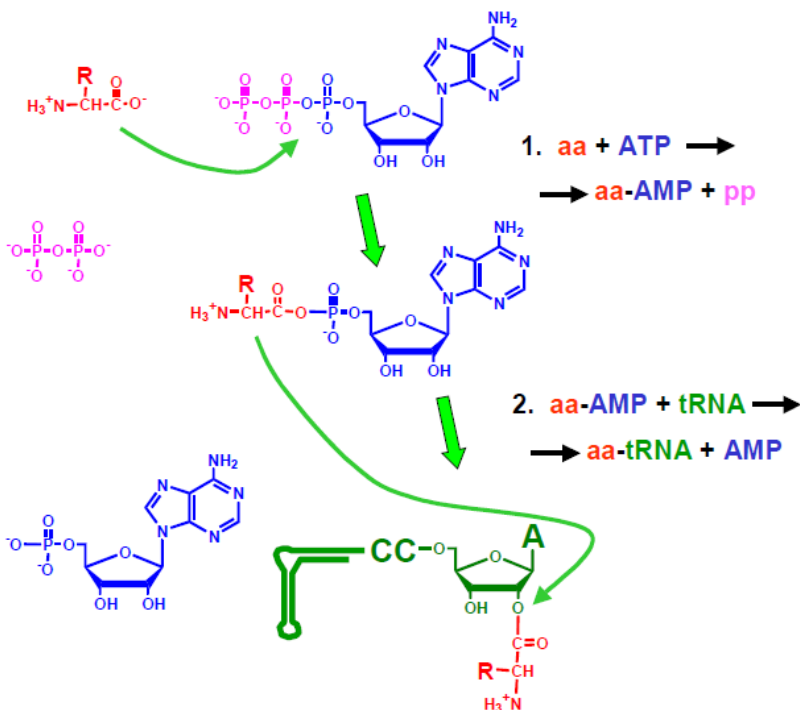


Рисунок 2.34 – Схема реакції аміноацилювання [8]

Кожна амінокислота має власну аміноацил-тРНК-синтетазу. Незважаючи на те, що аміноацил-тРНК-синтетази каталізують однакову реакцію, вони відрізняються за розмірами, структурою, кількістю субодиниць у складі молекул.

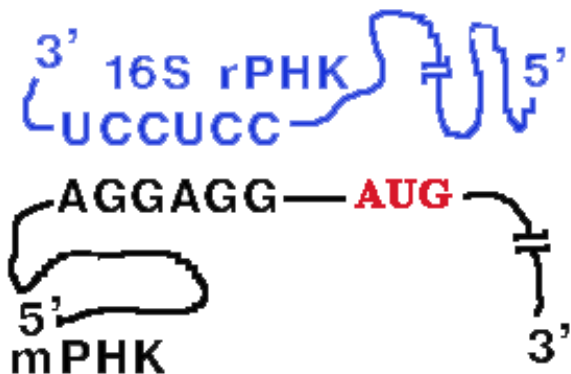
У 1989 р. за допомогою методу рентгеноструктурного аналізу було досліджено структуру комплексу глутамінової тРНК і глутамініл-тРНК-синтетази *E.coli*.

Молекула тРНК розпізнає правильне місце приєднання до мРНК за рахунок антикодону – триплету, комплементарного кодону мРНК. Деякі тРНК розпізнають декілька кодонів, що відповідають за одну й ту саму амінокислоту. Це досягається за рахунок механізму неоднозначної відповідності або «качання». Наприклад, кодон ГЦЦ може приєднуватися до антикодону ЦГУ. Механізм «качання» допускає неправильне спарювання антикодону, що не змінює амінокислотної послідовності синтезованого білка.

Таким чином, молекули тРНК виконують 2 функції: акцепторну – зв'язують амінокислоту, та адапторну – розпізнають кодони мРНК.

**Стартовим кодоном** трансляції є АУГ, що кодує метіонін. Існують дві різні тРНК, специфічні для метіоніну: одна використовується на етапі ініціації (тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>), інша – на етапі елонгації трансляції.

Мала субодиниця рибосоми розпізнає ділянку мРНК, що містить стартовий кодон. У прокариотів мРНК містить **послідовність Шайна – Дальгарно**, що є комплементарною ділянці 16 S рРНК у складі малої субодиниці рибосоми (рис. 2.35). Зв'язування 16S рРНК з послідовністю Шайна – Дальгарно визначає сайт ініціації трансляції.

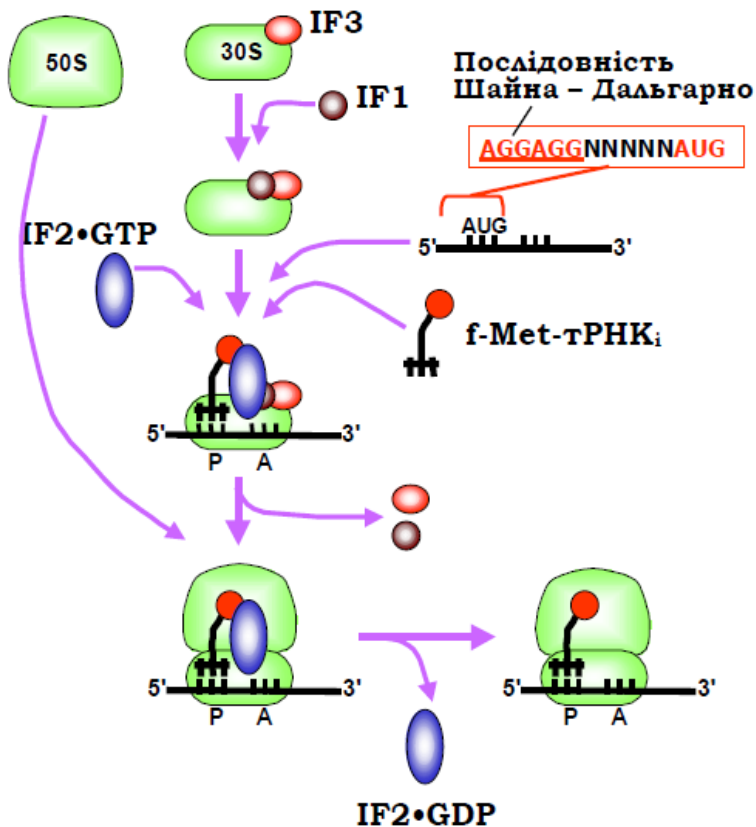


*Рисунок 2.35 – Взаємодія комплементарних послідовностей Шайна –Дальгарно мРНК і 16S рРНК*

Мала субодиниця рибосоми споріднена з білковими **факторами ініціації IF-1, IF-2, IF-3** (IF – initiation factors) (рис. 2.36). IF-1 та IF-2 забезпечують формування ініціаторного комплексу. Білок IF-2 необхідний для зв'язування формілметіоніну з ініціаторною тРНК (fMet + + тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>).

IF-3 зв'язується з 30S-субодиницею рибосоми і попереджує її реасоціацію з 50S-субодиницею. Цей білок називається фактором дисоціації. Після приєднання великої субодиниці до мРНК ініціація трансляції завершується, білкові фактори ініціації вивільнюються.

**Елонгація трансляції** здійснюється за участі специфічних білкових **факторів елонгації** (EF – elongation factors). У прокаріотів розрізняють EF-Tu, EF-Ts, EF-G. Фактори елонгації в комплексі з ГТФ приєднуються до рибосоми. EF-Tu і EF-Ts забезпечують гідроліз ГТФ та вивільнення енергії, використуваної для біосинтезу білка. EF-G сприяє транслокації – переміщенню рибосоми вздовж молекули мРНК.



I

*Рисунок 2.36 – Послідовність основних подій при ініціації трансляції в прокаріотів [8]*

У рибосомі розрізняють дві тРНК-зв'язувальні ділянки: аміноацил-тРНК-зв'язувальну (А-сайт) та пептидил-тРНК-зв'язувальну (Р-сайт). На початку елонгації Р-сайт містить ініціаторну метіоніл-тРНК, А-сайт – аміноацил-тРНК. У великій субодиниці рибосоми розміщений активний центр **пептидилтрансферази** – ферменту, що каталізує утворення пептидного зв'язку між амінокислотними залишками (рис. 2.37).

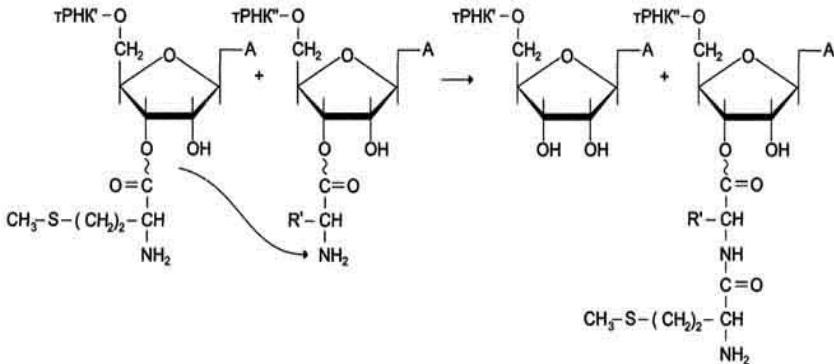


Рисунок 2.37 – Пептидилтрансферазна реакція

Перенесення амінокислотного залишку здійснюється з Р-сайта на А-сайт. Після утворення першого пептидного зв'язку А-сайт містить пептидил-тРНК, а Р-сайт – тРНК без амінокислоти, яка згодом вивільняється (рис. 2.38). Після утворення пептидного зв'язку відбувається транслокація – переміщення рибосоми вдовж молекули мРНК у напрямку 5' → 3' до наступного кодону. Пептидилтрансферазна реакція і транслокація повторюються багато разів, поки рибосома не натрапить на стоп-кодон на 5'-кінці молекули мРНК.

На приєднання одного амінокислотного залишку до поліпептидного ланцюга витрачаються 1 молекула АТФ (на етапі ініціації) і 2 молекули ГТФ (на етапі елонгації). Таким чином, біосинтез білка потребує великих витрат енергії.

**Термінація трансляції** здійснюється за участі білкових факторів термінації RF (RF – release factors). У прокариотів розрізняють RF-1, RF-2, RF-3. Фактори термінації зв'язуються зі стоп-кодоном в А-сайті рибосоми: RF-1 розпізнає UAA- та UAG-кодони, RF-2 – UAA- і UGA-кодони. RF-3 забезпечує відокремлення синтезованого поліпептиду від тРНК з використанням енергії гідролізу ГТФ.

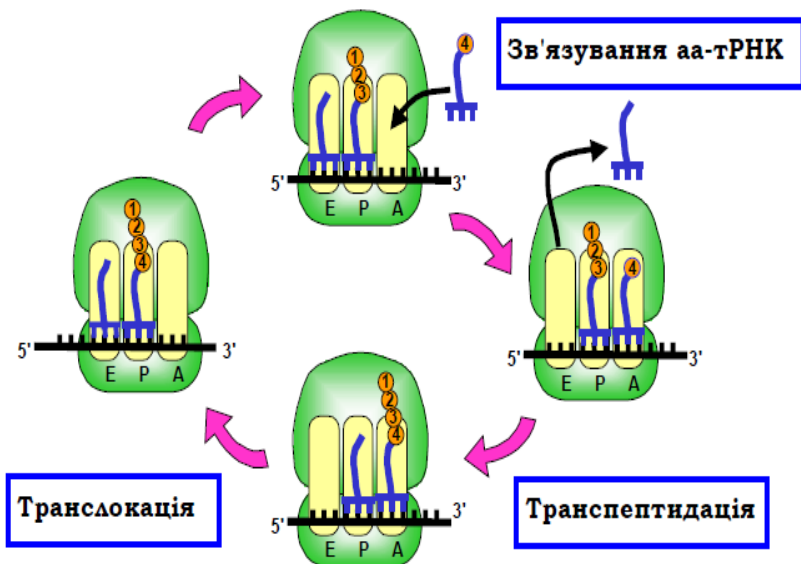


Рисунок 2.38 – Схема елонгаційного циклу [8]

Після завершення синтезу білка рибосома дисоціює на малу та велику субодиниці (рис. 2.39). У процесі трансляції мала субодиниця рибосом виконує генетичні функції (мРНК розпізнає стартовий кодон, зчитує генетичну інформацію), а велика – біохімічні (каталізує утворення пептидного зв'язку між амінокислотними залишками).

Одночасно на одній молекулі мРНК можуть розміщуватися декілька рибосом. У середньому одна молекула мРНК розміщує 5 рибосом, відстань між якими становить не менше ніж 30 кодонів.

Структура, в якій одна мРНК асоційована з декількома рибосомами, називається полірибосомою, або **полісомою** (рис. 2.40).



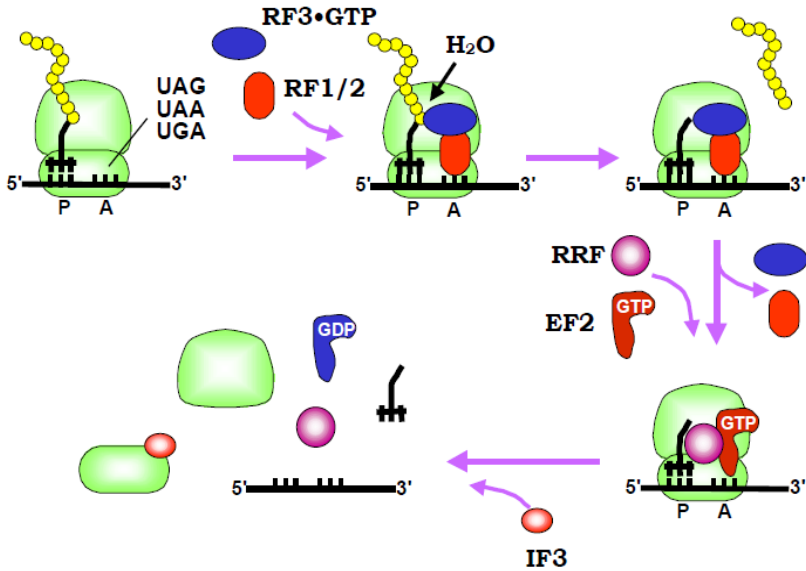


Рисунок 2.39 – Термінація трансляції [8]

Завдяки полісомам забезпечується висока швидкість трансляції. Наприклад, в *E.coli* синтез одного білка відбувається приблизно за 20 с. Швидкість трансляції в прокаріотів становить 10–15 амінокислот/с, в еукаріотів – 1–10 амінокислот/с.

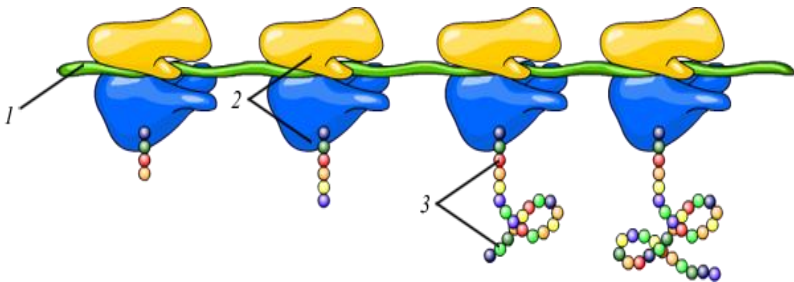


Рисунок 2.40 – Полісома (1 – мРНК, 2 – субодиниці рибосоми, 3 – поліпептид, що синтезується)

## Особливості трансляції в еукаріотів

У процесі трансляції в еукаріотів беруть участь численні білкові фактори:

- фактори ініціації eIF (до 10 різних типів);
- фактори елонгації eEF1 $\alpha$ , eEF1 $\beta$  та eEF-2;
- фактори термінації eRF.

Рибосоми еукаріотів 80 S складаються з малої 40S та великої 60S субодиниць.

На кінцях молекули мРНК еукаріотів розміщені специфічні послідовності, що беруть участь у трансляції (рис. 2.41).

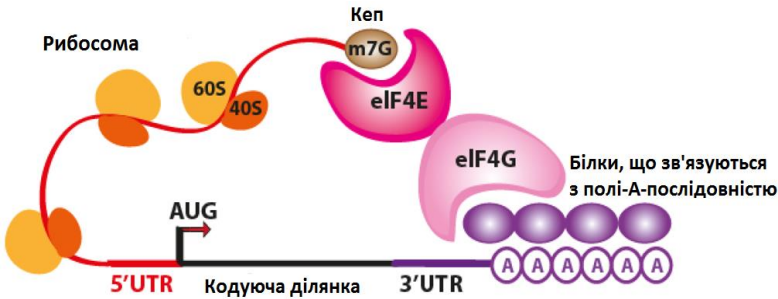
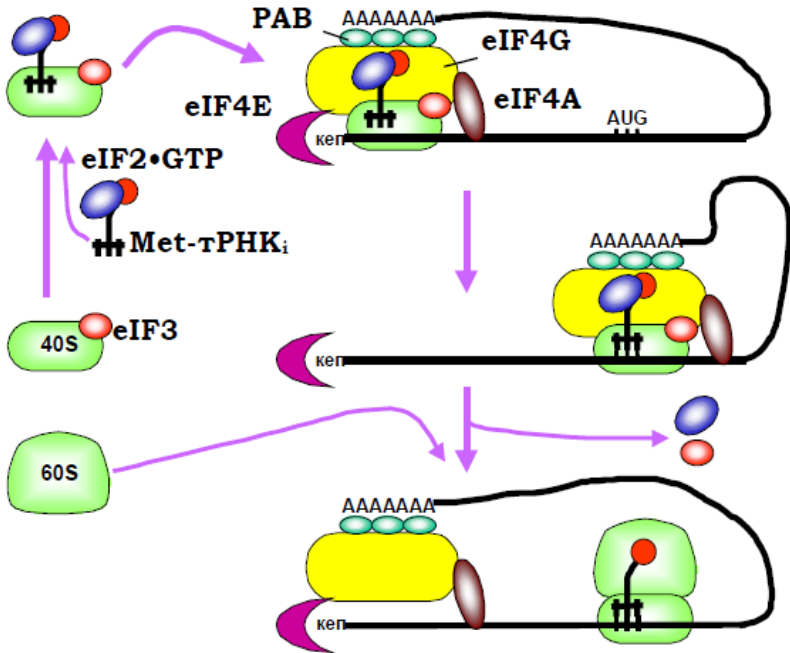


Рисунок 2.41 – Зв'язування eIF4E з кепом та eIF4G з полі-А-хвостом мРНК еукаріотів

На 5'-кінці мРНК еукаріотів розміщений кеп, необхідний для ініціації трансляції, на 3'-кінці – поліА-хвіст. До кепу приєднуються фактори ініціації і 40S-субодиниця рибосоми, формуючи ініціаторний комплекс. Першою амінокислотою в складі синтезованого білка є метіонін, що кодується триплетом AUG.

В еукаріотів розпізнавання стартового кодону AUG на мРНК здійснюється шляхом **термінальної (сканувальної) ініціації**: фактори ініціації і 40S-субодиниця рибосоми переміщуються вдовж ланцюга

мРНК, скануючи його, поки не досягнуть стартового кодону АУГ (рис. 2.43). Рух ініціаторного комплексу вздовж мРНК здійснюється за рахунок енергії гідролізу АТФ. Ініціація трансляції завершується приєднанням 60S-субодиниці рибосоми і вивільненням факторів ініціації (рис. 2.42).



*Рисунок 2.42 – Послідовність основних подій під час ініціації трансляції в еукаріотів [8]*

На відміну від прокаріотів еукаріоти мають моноцистронну мРНК, що містить лише одну ініціаторну ділянку на 1 молекулу. Тобто на основі молекули мРНК синтезуються поліпептидні ланцюги одного білка. В прокаріотів одна молекула мРНК може бути матрицею для синтезу різних білків.

## 2.4. Посттрансляційна модифікація білків

Після завершення синтезу поліпептидних ланцюгів відбувається їх посттрансляційна модифікація, що полягає в хімічній видозміні або частковому протеолізі.

### Типи хімічних модифікацій білка:

- гідроксилування – приєднання ОН-групи;
- карбоксилування – приєднання СОО-групи;
- метилування – приєднання СН<sub>3</sub>-групи;
- ацетилювання – приєднання СН<sub>3</sub>-СО-групи;
- фосфорилування – приєднання фосфатного залишку;
- дефосфорилування – відщеплення фосфатного залишку;
- глікозилювання – приєднання вуглеводів;
- АДФ-рибозилування – приєднання АДФ-рибози;
- приєднання небілкових лігандів (металів, кофакторів та ін.).

У процесі посттрансляційної модифікації відбувається видалення ініціуювальної амінокислоти формілметіоніну (в прокаріотів) або метіоніну (в еукаріотів).

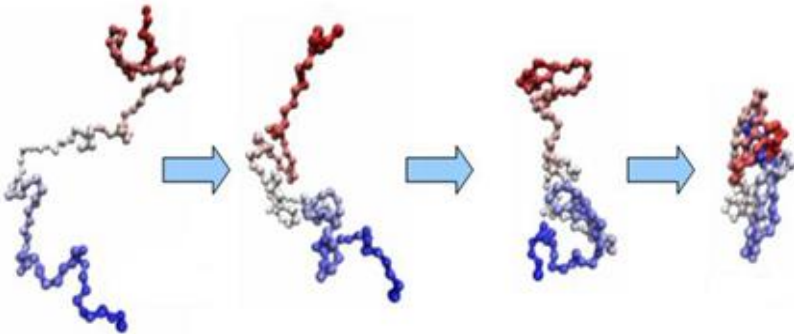
Білки, що синтезуються у вигляді неактивних попередників, активуються шляхом часткового протеолізу. Такий механізм активації властивий для протеолітичних ферментів ШКТ. **Частковий протеоліз** полягає у відщепленні пептиду з N- або С-кінця молекули білка.

Наприклад, неактивний пепсиноген перетворюється на активний пепсин шляхом відщеплення N-кінцевого пептиду.

Гормон підшлункової залози інсулін також синтезується у вигляді неактивного попередника – проінсуліну. Перетворення проінсуліну на інсулін відбувається шляхом відщеплення пептиду з С-кінця молекули білка.

Після завершення трансляції поліпептидні ланцюги підлягають фолдингу.

**Фолдинг білків** – це процес формування просторової структури білків (рис. 2.43).



*Рисунок 2.43 – Фолдинг білків [13]*

Первинна структура білка визначає його просторову конфігурацію. У поліпептидному ланцюгу є безліч можливих варіантів асоціації залишків амінокислот.

Учені встановили, що для неупорядкованого фолдингу необхідно декілька мільйонів років, тоді як у клітині фолдинг здійснюється за декілька секунд. Згідно з концепцією модульного фолдингу деякі фрагменти поліпептиду швидко формують вторинну структуру, що полегшує правильний фолдинг усєї молекули.

Існують 2 класи білків, що беруть участь у фолдингу:

1) **фолдази** – ферменти, що каталізують утворення -S-S-зв'язків та цис-, трансізомерію пептидних зв'язків проліну;

2) **шаперони** (hsp) – спеціалізовані білки, що стабілізують нестійку форму інших білків і забезпечують формування їх правильної просторової структури

(рис. 2.44). Крім фолдингу білків, шаперони забезпечують їх транспорт через мембрани.

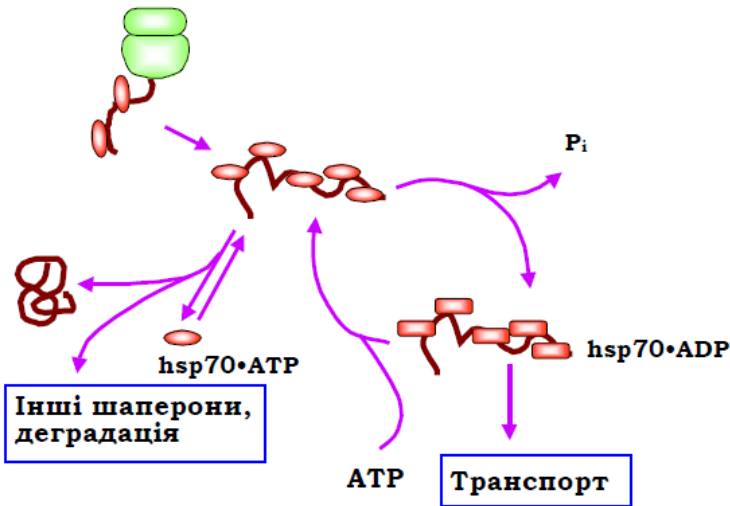


Рисунок 2.44 – ATP-залежний робочий цикл hsp70 [8]

Порушення процесів фолдингу є механізмом розвитку хвороби Альцгеймера. У мозку хворих накопичується  $\beta$ -амілоїд, що порушує функціонування нервових клітин і спричиняє їх загибель;  $\beta$ -амілоїд – агрегати білків, що втратили  $\alpha$ -спіралізацію і набули  $\beta$ -складчастої структури. Такі білки погано розчиняються у воді і майже не підлягають протеолізу.

Подібні властивості мають **пріони** – інфекційні агенти білкової природи (PRP – proteinaceous infectious particles).

Уперше термін «пріон» застосував американський лікар Стенлі Прузінер. Учений отримав Нобелівську премію з фізіології і медицини у 1997 р. за відкриття пріонів та розроблення пріонової теорії розвитку губчастої енцефалопатії.

Пріони – це білки з аномальною просторовою структурою. Вони є збудниками захворювань нервової системи людини: куру, хвороби Кройцфельда – Якоба, синдрому Герстмана – Штраусслера – Шейнкера та ін. [16].

У 60-х рр. ХХ ст. була відкрита хвороба куру – «смерть, що сміється». Назва захворювання пов'язана з появою гримас на обличчі хворих. Ця хвороба була виявлена в племені Форє в Новій Гвінеї. У племені збереглася традиція ритуального канібалізму. Інфікування відбувалося при вживанні тканин, що містять пріони.

За відкриття механізмів поширення інфекційних захворювань за участі пріонів Даніель Карлтон Гайдюзек отримав Нобелівську премію з фізіології та медицини у 1976 р.

Відомі пріонові хвороби тварин: коров'ячий сказ, почесуха, або скрепі овець. Людина може інфікуватися пріонами, вживаючи м'ясо хворих тварин. Пріони стійкі до дії високих температур і протеолітичних ферментів.

У мозку людини і тварин виявлені білки-попередники пріонів, що мають аналогічну первинну структуру.

На рисунку 2.45 зображена просторова структура пріона PrP<sup>sc</sup> і його попередника – білка PrP<sup>c</sup>.

PrP<sup>sc</sup> має змінену просторову структуру, що характеризується меншою кількістю  $\alpha$ -спіральных доменів у молекулі. При потраплянні до організму PrP<sup>sc</sup> каталізує перехід PrP<sup>c</sup> у пріонну конформацію. За відсутності інфекції перетворення PrP<sup>c</sup> на PrP<sup>sc</sup> відбувається дуже рідко.

Виявлені випадки спадкової схильності до пріонових захворювань. Установлено, що причиною появи пріонів є мутації в ядерному гені PrP.

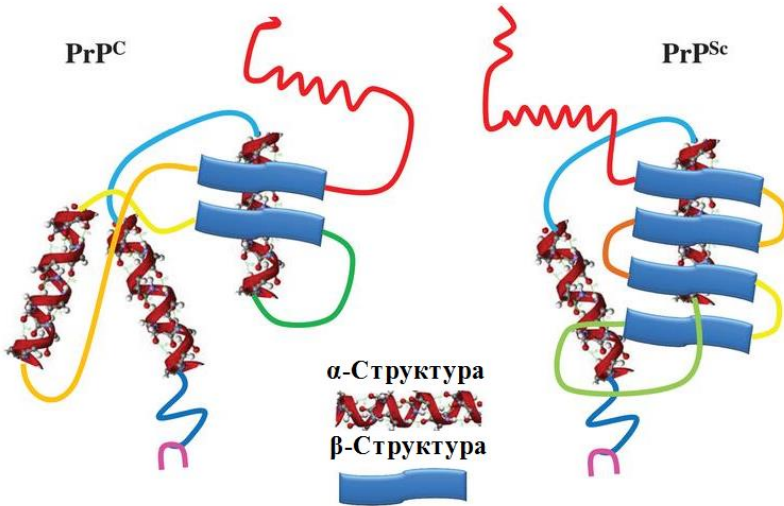


Рисунок 2.45 – Просторова структура пріона  $PrP^{Sc}$  і білка  $PrP^c$

У 1994 р. Д. Уестауей установив, що посилена експресія гена PrP у мишей призводить до появи пріонного захворювання. Нокаут гена PrP у мишей забезпечує стійкість до пріонових захворювань. Таким чином, причинами пріонової хвороби є не лише інфекція, а й посилення експресії нормального гена в клітині.



### Розділ 3

## Регуляція експресії генів. Репарація ДНК

**Експресія генів** – це реалізація генетичної інформації, тобто процеси транскрипції і трансляції.

Регуляція експресії генів здійснюється на декількох рівнях: транскрипції, процесингу мРНК, трансляції (рис. 3.1).

Регуляція експресії генів забезпечує адаптацію організму до змінюваних умов зовнішнього середовища.

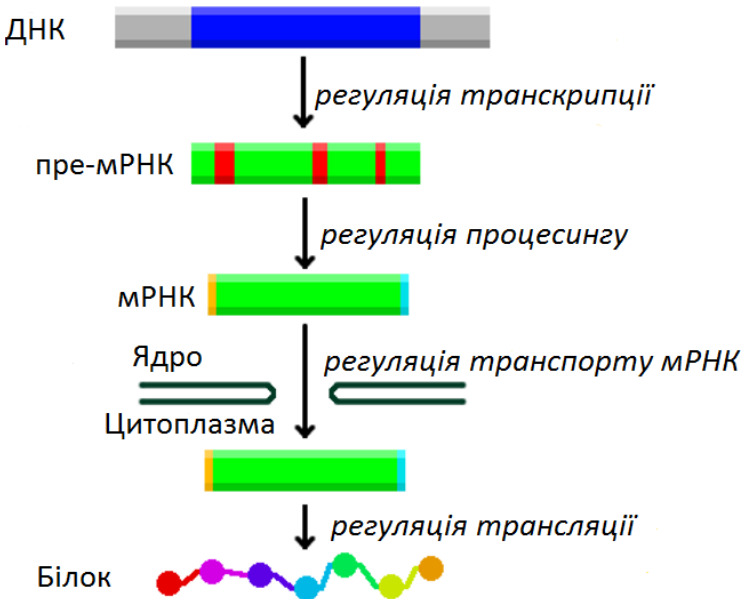


Рисунок 3.1 – Рівні регуляції експресії генів

За типом експресії розрізняють конститутивні та індукцйбельні гени. Експресія **конститутивних генів** здійснюється постійно. Швидкість експресії

конститутивних генів не змінюється. Продукти експресії цих генів (РНК або білки) потрібні клітинам завжди. Прикладами конститутивних генів є гени ферментів метаболізму глюкози. Як відомо, глюкоза є основним джерелом енергії для клітин.

**Індуцибельні гени** активні не завжди, а лише за певних умов. Експресія індукцибельних генів регулюється. Наприклад, індукцибельними є гени білків теплового шоку, експресія яких здійснюється лише за дії високих температур на клітини.

Посилення експресії генів називають **індукцією**.

Речовини, що посилюють експресію генів, одержали назву **індукторів**.

Пригнічення експресії генів називають **репресією**.

Речовини, що пригнічують експресію генів, називаються **репресорами**.

### 3.1. Регуляція транскрипції в прокариотів

У 1965 р. Франсуа Жакоб, Мішель Львов та Жак Люсьєн Моно отримали Нобелівську премію за дослідження механізмів регуляції транскрипції в бактерій. Вчені пояснили регуляцію експресії **Лас-оперону E.coli**.

Оперон є одиницею транскрипції в прокариотів.

**Оперон** – група генів, контрольована одним промотором.

Лас-оперон E.coli містить гени ферментів катаболізму лактози. Індукція Лас-оперону здійснюється за наявності лактози в середовищі існування E.coli.

**Структура Лас-оперону:**

– **оператор** – ділянка, до якої приєднується репресор;

– **САР-сайт** – ділянка, до якої приєднується білок-активатор катаболізму (САР – catabolism activated protein);

– **промотор** – ділянка, до якої приєднується РНК-полімераза;

– **регуляторний ген (I-ген)** – ген, що кодує білок-репресор;

– **структурні гени** – гени, що кодують ферменти катаболізму лактози:  $\beta$ -галактозидазу або лактазу,  $\beta$ -галактозидпермеазу,  $\beta$ -галактозидтранс ацетилазу.

За наявності глюкози транскрипції Лас-оперону не відбувається. Лас-промотор є слабким промотором. РНК-полімераза може зв'язуватися з Лас-промотором лише після приєднання до CAP-сайту білка-активатора катаболізму в комплексі з цАМФ. За умов високої концентрації глюкози вміст цАМФ у клітині мінімальний. Білок-репресор приєднується до оператора і блокує транскрипцію структурних генів Лас-оперону. Таким чином, здійснюється **репресія Лас-оперону** (рис. 3.2).

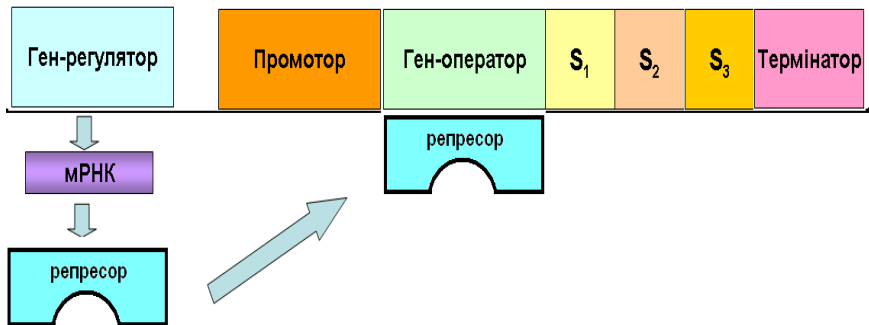


Рисунок 3.2 – Репресія Лас-оперону [12]

За наявності лактози і відсутності глюкози відбувається **індукція Лас-оперону**. За низької концентрації глюкози в клітині зростає вміст цАМФ. Білок-активатор катаболізму в комплексі з цАМФ приєднується до CAP-сайту, що посилює властивості промотору.

Індуктором Lас-оперону є ізомер лактози – алолактоза. У складі лактози моносахариди з'єднані між собою 1,4-глікозидним зв'язком, у складі алолактози – 1,6-глікозидним зв'язком.

Алолактоза утворюється в достатній для індукції кількості лише за високої концентрації лактози. Це запобігає індукції оперону за низької концентрації лактози.

Алолактоза приєднується до білка-репресора, внаслідок цього він втрачає спорідненість до оператора. Комплекс білок-репресор-алолактоза відокремлюється від оператора, здійснюється транскрипція оперону (рис. 3.3).

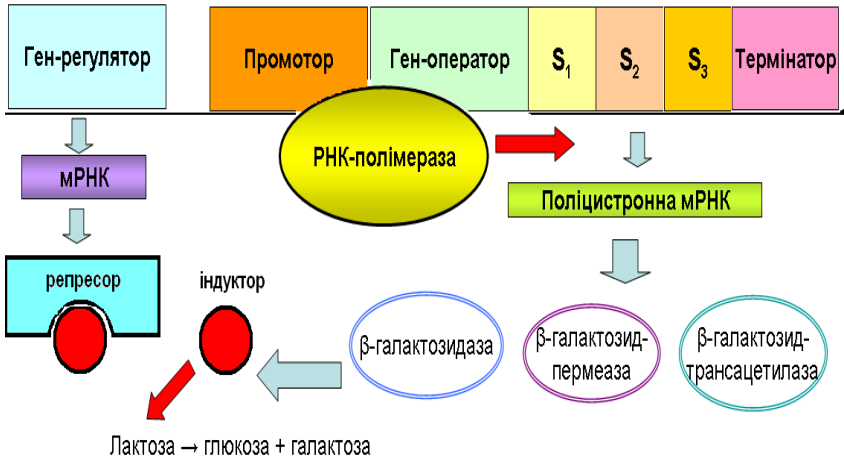


Рисунок 3.3 – Індукція Lас-оперону [12]

Регуляція експресії генів Lас-оперону забезпечує адаптацію E.coli до середовища існування з високим умістом лактози. На прикладі лактозного оперону E.coli вперше був розшифрований механізм регуляції експресії генів прокаріотів.

## Триптофановий оперон

Триптофановий оперон наявний у багатьох бактерій. Уперше триптофановий оперон був описаний в *E.coli*. Триптофановий оперон *E.coli* містить 5 структурних генів, необхідних для утворення ферментів, що каталізують синтез триптофану. За високої концентрації триптофану в клітині відбувається репресія *trp*-оперону, за низької – індукція. Регуляція експресії *trp*-оперону здійснюється за допомогою білка-репресора, що активується при зв'язуванні з триптофаном. Триптофан відіграє роль корепресора. Комплекс триптофан – білок-репресор приєднується до оператора і блокує транскрипцію структурних генів (рис. 3.4).

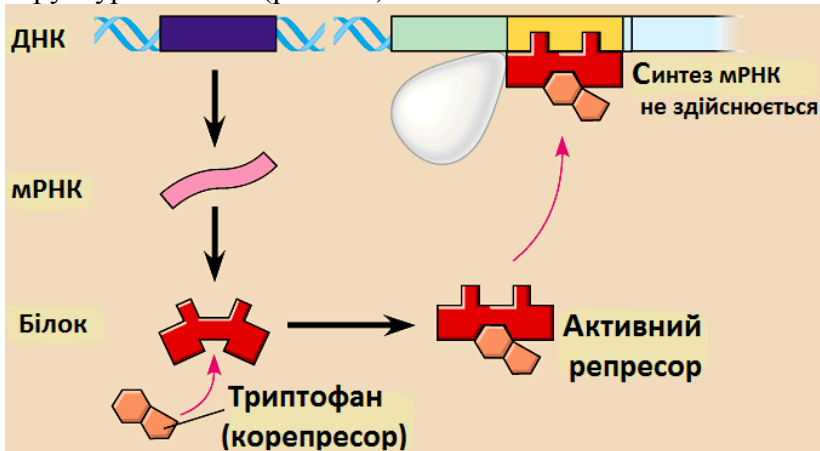
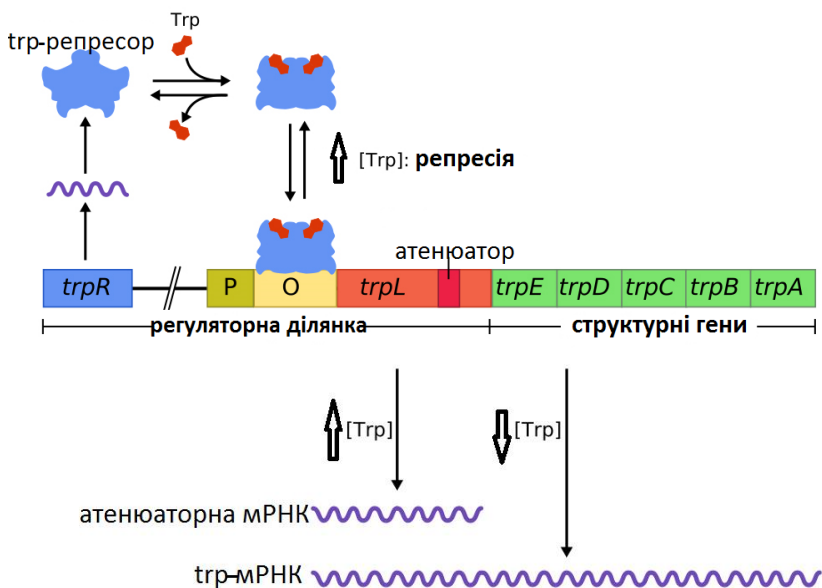


Рисунок 3.4 – Репресія триптофанового оперону

Існує альтернативний механізм регуляції *trp*-оперону – **атенюація** (attenuation – послаблення). Між оператором і структурними генами *trp*-оперону розміщена специфічна ділянка – атенуатор (рис. 3.5).

Атенуатор містить сигнал про закінчення транскрипції. За високої концентрації триптофану в клітині деякі молекули РНК-полімерази можуть подолати білок-

репресор. За цих умов транскрипція завершується на атенюаторній ділянці.



*Рисунок 3.5 – Механізм регуляції trp-оперону за участі атенюатора*

Таким чином, транскрипція генів ферментів, що забезпечують синтез триптофану, є неможливою за умов високої концентрації даної амінокислоти в клітинах *E.coli*.

### 3.2. Особливості регуляції експресії генів в еукаріотів

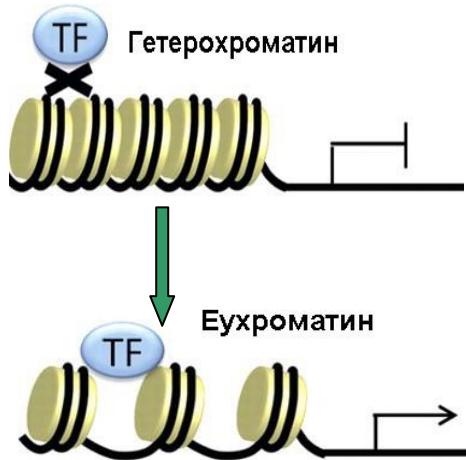
Механізми регуляції експресії генів еукаріотів є більш складними, ніж прокаріотів. Як відомо, лише 1,5 % ДНК людини містить структурні гени (рис. 3.6). На сьогодні тривають дослідження щодо з'ясування функцій усіх елементів геному. За результатами міжнародного проекту Енциклопедія елементів ДНК ENCODE було виявлено 4 млн сайтів – регуляторів генної активності.



Рисунок 3.6 – Приблизний відносний вміст послідовностей різних типів в еукаріотичному геномі [3]

Молекула ДНК еукаріотів перебуває в суперспіралізованому стані в складі хроматину.

**Ремоделювання хроматину** є одним із механізмів регуляції експресії генів еукаріотів. У хроматині існує значна гетерогенність за ступенем конденсації. Розрізняють транскрипційно інертний **гетерохроматин** і транскрипційно активний **еухроматин**. Останній є менш конденсованим, що дозволяє факторам транскрипції зв'язуватися з ДНК (рис. 3.7).



*Рисунок 3.7 – Гетерохроматин та еухроматин*

Ремодельовання хроматину здійснюється за рахунок хімічної модифікації гістонів: ацетилювання, метилювання, фосфорилування (рис. 3.8).

Внаслідок ацетилювання гістонів ступінь конденсації гетерохроматину зменшується, транскрипційна активність зростає. Гіперацетилювані гістони наявні в активних ділянках хроматину, в репресованих підтримується деацетилюваний статус.

Інші модифікації впливають на функціональний стан хроматину складніше: метилювання або фосфорилування одного залишку може викликати репресію транскрипції, іншого – супроводжувати активацію.

**В регуляції транскрипції еукаріотів** беруть участь численні білкові фактори.

У ДНК еукаріотів містяться специфічні сайти для зв'язування регуляторних білків: енхансери, сайленсери, інсулятори (рис. 3.9).



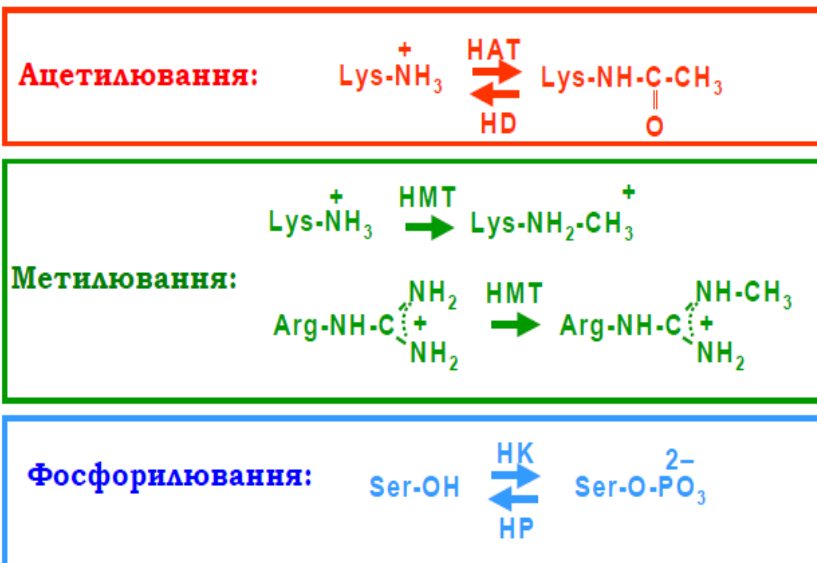


Рисунок 3.8 – Посттрансляційні модифікації амінокислотних залишків у гістонах [8]

**Енхансери** – регуляторні ділянки ДНК, при з'єднанні з якими білкові фактори активують транскрипцію.

**Сайленсери** – регуляторні ділянки ДНК, при з'єднанні з якими білкові фактори пригнічують транскрипцію.

**Інсулятори** – це ділянки ДНК, що блокують випадкові взаємодії промотору з енхансерами або сайленсерами. Інсулятори запобігають некоректним взаємодіям між сусідніми доменами хроматину (блокують взаємодії промоторів з одного домену з енхансером з іншого).

Інсулятори розміщені між промотором та енхансером або між промотором і сайленсером.



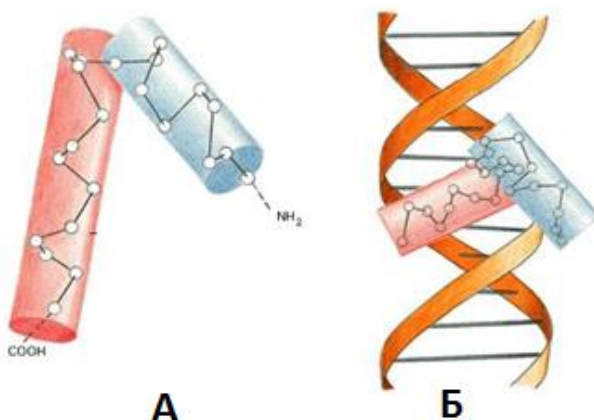
*Рисунок 3.9 – Множинний контроль транскрипції гена еукаріотів [13]*

Залежно від структури молекули розрізняють декілька типів регуляторних білків, що зв'язуються з ДНК:

- білки зі структурами НТН (Helix-Turn-Helix) – «спіраль-поворот-спіраль» (рис. 3.10);
- білки зі структурами «лейциновий зіпер» (рис. 3.11);
- білки зі структурами «цинкові пальці» (рис. 3.11).

Структура НТН є найбільш поширеною в складі ДНК-зв'язувальних білків. Більшість білків-репресорів мають структурний домен НТН.

Структура «лейциновий зіпер» формується завдяки гідрофобним взаємодіям між амінокислотними залишками лейцину.



*Рисунок 3.10 – Схема структури домену НТН (А) та його взаємодія з ДНК (Б) [2]*

Структура «цинкові пальці» характерна для внутрішньоклітинних рецепторів стероїдних гормонів. У ДНК-зв'язувальному мотиві атом Zn з'єднаний із 2 залишками гістидину і 2 залишками цистеїну. Чотири такі зв'язки створюють жорсткий каркас, який утримує білкову поверхню, що повинна взаємодіяти з ДНК. Фактори транскрипції можуть містити декілька «цинкових пальців», що зумовлюють множинні контакти з ДНК.

Розглянуті різні структурні мотиви білків забезпечують їх специфічну взаємодію з ДНК. Головним механізмом упізнання послідовності ДНК білком є структурно-динамічна комплементарність двох молекул.

**Регуляція розпаду мРНК** є одним із механізмів контролю експресії гена. Деградація мРНК є «вимикачем» синтезу білка. мРНК регуляторних білків зазвичай має короткий час існування в клітині. Наприклад, період напіврозпаду мРНК білкових факторів транскрипції становить менше ніж 30 хв, мРНК структурних білків існує довгий час у клітині. Так, період напіврозпаду мРНК глобіну становить 10 годин.

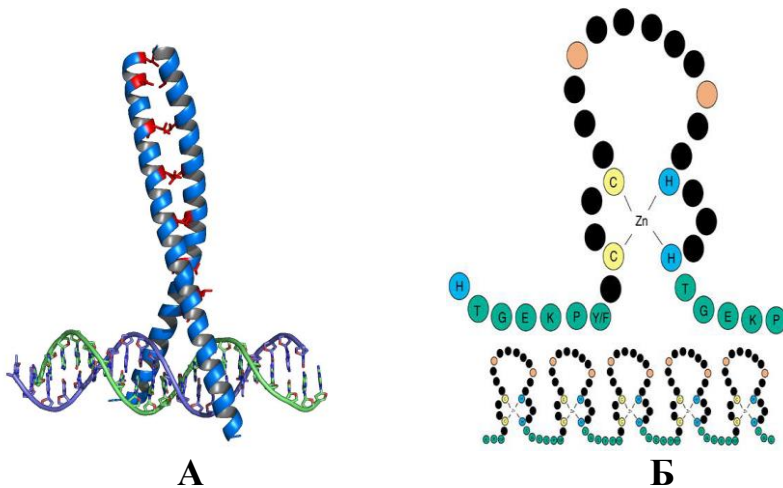


Рисунок 3.11 – Схема структури доменів лейцинового «зіпера» (А) і «цинкових пальців» (Б) [2]

Короткоіснуючі мРНК містять послідовності нестабільності AURE (adenine/uracil-rich elements), що є сигналом для їх швидкої деградації. AURE розміщені на 3'-кінці молекули мРНК. Очевидно, AURE викликають дестабілізацію мРНК за допомогою AURE-зв'язувальних білків.

**Регуляція трансляції в еукаріотів** здійснюється за допомогою фосфорилування/дефосфорилування фактора ініціації eIF-2. У фосфорильованому стані eIF-2 неактивний, у дефосфорильованому – активний. Фосфорилування eIF-2 під дією специфічної фосфокінази призводить до пригнічення ініціації трансляції всіх мРНК клітини.

Сигналами для активації фосфокінази є дефіцит амінокислот, гему, недостатність ростових факторів, стрес, вірусні інфекції.

Як відомо, білки крові інтерферони здійснюють противірусну дію. Механізм їх дії полягає в активації протеїнкінази, що каталізує фосфорилування eIF-2.

Перехід eIF-2 з активного до неактивного стану спричиняє інгібування трансляції мРНК і руйнування клітин, що унеможливорює розмноження вірусів (рис. 3.12).

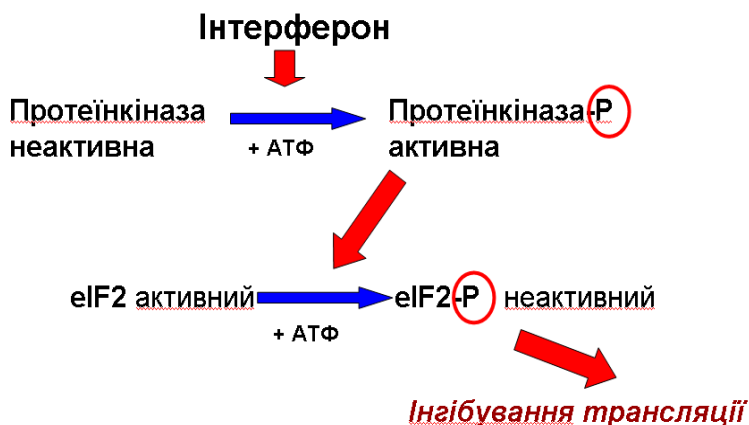


Рисунок 3.12 – Механізм дії інтерферонів [12]

Прикладом активації трансляції еукаріотичних генів є індукція синтезу глобіну при зростанні концентрації гему в клітині. Гем інгібує цАМФ-протеїнкіназу, необхідну для активації протеїнкінази eIF-2 (рис. 3.13).

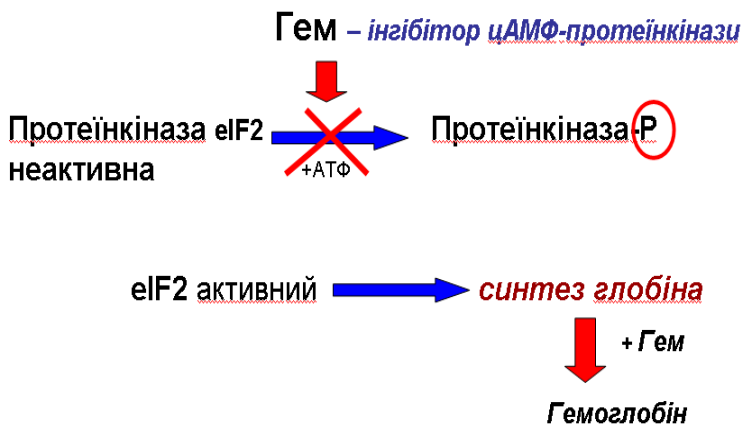


Рисунок 3.13 – Регуляція синтезу глобіну [12]

Інгібування цАМФ-протеїнкінази призводить до накопичення в клітині дефосфорильованого (активного) eIF-2, унаслідок цього активується процес трансляції. Таким чином, гем є активатором синтезу глобіну.

### **Антибіотики і токсини – інгібітори біосинтезу білків**

Антибіотики і токсини пригнічують біосинтез білка, інгібуючи процеси транскрипції або трансляції.

#### **Інгібітори транскрипції:**

– *α-аманітин* (токсин блідої поганки) – інгібітор РНК-полімерази II;

– *антибіотики рифампіцин, рифаміцин, актиноміцин Д* вбудовуються в подвійну спіраль ДНК і блокують процеси реплікації і транскрипції;

– *протипухлинні алкалоїди вінкристин, вінбластин* – інгібують процесинг пре-РНК.

#### **Антибіотики – інгібітори трансляції в прокариотів:**

– *стрептоміцин, тетрациклін* – інгібітори ініціації (зв'язування аміноацил-тРНК з 30S-субодиницею рибосоמוю);

– *хлорамфенікол* – інгібітор елонгації (інгібує пептидил-трансферазу);

– *еритроміцин* – інгібітор транслокації рибосом.

**Пуроміцин – антибіотик, що інгібує трансляцію в прокариотів та еукариотів.** Пуроміцин спричиняє передчасну термінацію трансляції, конкурує з аміноацил-тРНК за А-сайт рибосоми.

#### **Інгібітори трансляції в еукариотів:**

– *антибіотики циклогексимід, анізоміцин* – інгібітори елонгації (інгібують пептидилтрансферазу);

– *дифтерійний токсин* – інгібітор транслокації рибосом. Дифтерійний токсин інгібує eEF-2 транслоказу еукариотів шляхом АДФ-рибозилування:

$\text{НАД}^+ + \text{eEF-2} \rightarrow \text{eEF-2-АДФ-рибоза} + \text{нікотинамід};$

– *рицин* (токсин *рицини звичайної*) – N-глікозидаза, що видаляє аденінову основу в одній із рРНК еукаріот та інактивує велику субодиницю рибосом. Одна молекула рицину може зруйнувати клітину, що містить десятки тисяч рибосом.

### 3.3. Репарація ДНК

**Репарація ДНК** – процес виправлення помилок при реплікації або відновлення структури ДНК у разі пошкоджень.

Зміни структури ДНК є наслідком спонтанних або індукованих мутацій.

Розрізняють такі **типи мутацій**:

– **геномні** – зміна кількості хромосом у геномі;

– **хромосомні аберації**:

транспозиція – перенесення генів у межах однієї хромосоми;

транслокація – перенесення гена в іншу хромосому;

делеція – втрата ділянки хромосоми;

дуплікація – подвоєння ділянки хромосоми;

інверсія – поворот ділянки хромосоми на  $180^\circ$ ;

– **генні (точкові) мутації**:

транзиція – заміна комплементарних нуклеотидів  
Т ↔ Ц або А ↔ Г;

трансверсія – заміна некомплеметарних нуклеотидів Т(Ц) ↔ А (Г);

вставка – додавання нуклеотидів;

делеція – вирізання нуклеотидів.

Мутації виникають під впливом фізичних факторів (УФ-випромінювання, радіація) або хімічних мутагенів (5-фторурацил, 2-амінопурин, нітрозаміни та ін.)

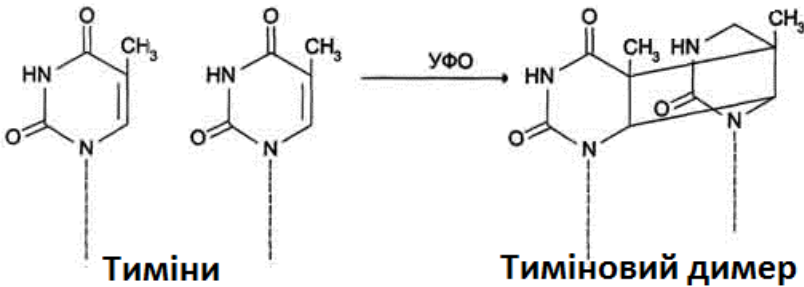
У 2015 р. Нобелівська премія з хімії була присуджена за дослідження механізмів репарації ДНК. Її

лауреатами стали Томас Ліндаль, Пол Модрич та Азіз Санджар.

На сьогодні відомо декілька **типів репарації ДНК**: пряма репарація, ексцизійна репарація з видаленням основ або нуклеотидів, місметч-репарація та ін.

**Пряма репарація ДНК** полягає у видаленні пошкодження за безпосередньої дії ферменту. Прикладами прямої репарації є ліквідування одноланцюгових розривів ДНК за допомогою лігази, фотореактивація в бактерій, репарація метильованих основ за участі метилтрансфераз.

У 1960 р. Р. Бьюкерс і У. Берендс дослідили хімію процесу пошкодження нуклеїнових кислот за дії УФ-світла. Було встановлено, що за дії ультрафіолету подвійний зв'язок між  $C_5$  і  $C_6$  у молекулах піримідинових азотистих основ може руйнуватися, вільні валентності використовуються для утворення димерів піримідинів: димери тиміну (рис. 3.14), димер-цитозиніві димери.



*Рисунок 3.14 – Тиміновий димер*

Видалення Т-димерів у бактерій здійснюється шляхом **фотореактивації**.

У 1949 р. німецький генетик Альберт Кельнер виявив, що в бактерій, яких залишали на світлі після дії ультрафіолетового випромінювання, частота мутацій знижувалася порівняно з бактеріями, які перебували в темряві. Учений відкрив явище фотореактивації –



відновлення пошкоджень ДНК за участі світла. У 1958 р. був виділений фермент, що здійснює фотореактивацію, – фотоліаза. Фотореактивація полягає в тому, що фермент фотоліаза руйнує зв'язки між утвореними піримідиновими димерами і відновлює нативну структуру ДНК. У 1963 р. фотоліаза була виділена та очищена. Встановлено, що фермент містить світлочутливий центр, який адсорбує фотони. Таким чином, активація фотоліази здійснюється під дією світла.

У 1944–1948 рр. радянський учений І. А. Рапопорт відкрив новий клас хімічних мутагенів – алкілувальні агенти. Ці сполуки здатні вбудовувати алкільні групи ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$  та ін.) в молекули пуринових та піримідинових азотистих основ ДНК. Один із найбільш потужних алкілувальних мутагенів – метилнітронітрозогуанідин – здійснює метилування гуаніну. Утворений продукт одержав назву  $\text{O}^6$ -метилгуанін ( $\text{O}^6$ -метГ). Ферменти репарації **метилтрансферази** відщеплюють метильну групу від модифікованого гуаніну і відновлюють структуру ДНК. Підраховано, що за 1 хвилину в клітині *E.coli* синтезується 100 молекул метилтрансфераз. Клітини накопичують декілька тисяч молекул метилтрансфераз: для виправлення кожного пошкодження ДНК використовується одна молекула білка. Якщо процес виникнення нових пошкоджень у ДНК здійснюється повільніше, ніж синтез метилтрансфераз, мутації не утворюються.

**Ексцизійна репарація** (excision – вирізання) полягає в тому, що пошкоджені ділянки ДНК вирізаються і замінюються відповідними послідовностями нуклеотидів.

**Ексцизійна репарація азотистих основ (Base Excision Repair)** забезпечує відновлення структури ДНК при дезамінуванні цитозину (рис. 3.15). Внаслідок дезамінування цитозину утворюється урацил.

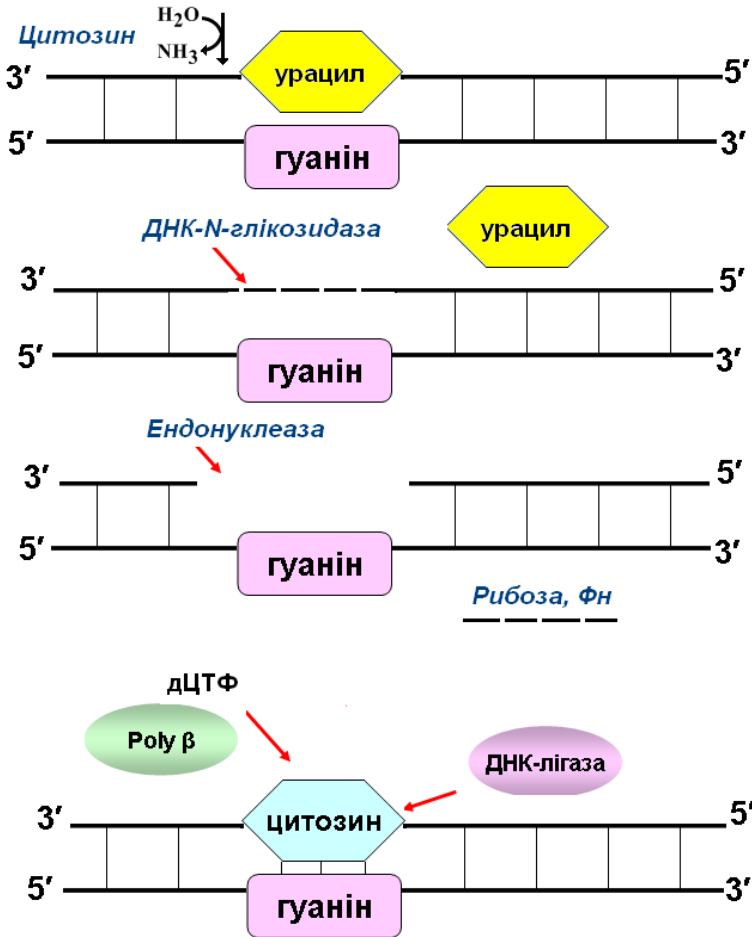


Рисунок 3.15 – Репарація дезамінування цитозину [12]

Репарація дезамінованого цитозину в еукаріотів здійснюється за допомогою таких ферментів:

1) урацил-ДНК-глікозидази – руйнує глікозидний зв'язок між урацилом та дезоксирибозою;

2) ендонуклеази – розщеплює ланцюг ДНК зліва від апіримідинового сайту;

3) ДНК-полімерази  $\beta$  – вбудовує правильний нуклеотид;

4) ДНК-лігази – зшиває розрив у ланцюзі ДНК.

**Ексцизійна репарація нуклеотидів** забезпечує відновлення структури ДНК при утворенні Т-димерів (рис. 3.16).

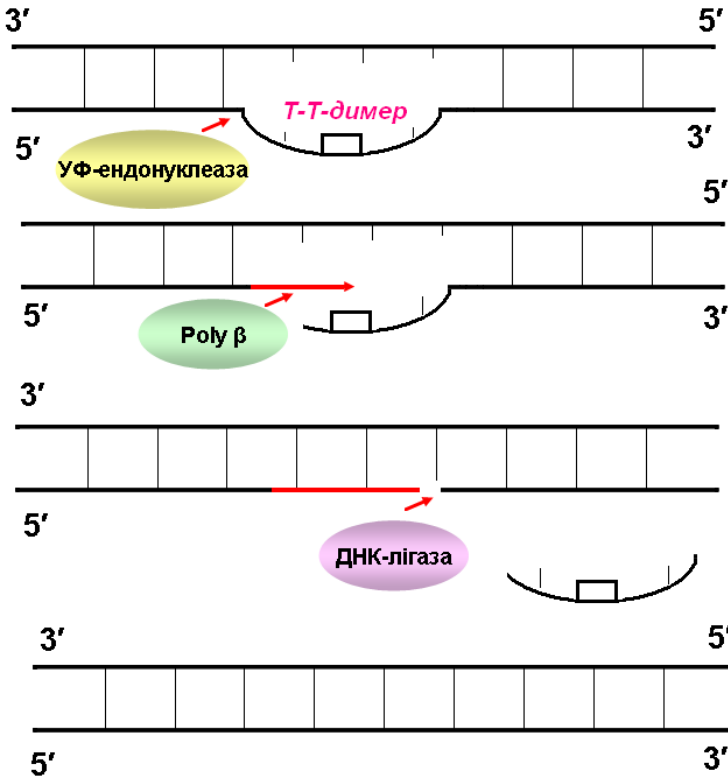


Рисунок 3.16 – Ексцизійна репарація тимінового димеру в еукаріотів [12]

У процесі видалення Т-димерів в еукаріотів беруть участь такі ферменти:

– УФ-специфічна ендонуклеаза (розрізає ланцюг ДНК, видаляє пошкоджену ділянку);

– ДНК-полімераза (добудовує правильну послідовність нуклеотидів);

– ДНК-лігаза (з'єднує фрагменти ДНК між собою).

У бактерій ексцизійну репарацію Т-димерів здійснює **комплекс білків uvrABCD** (uvr – ultraviolet repair). Дві молекули білка uvrA в комплексі з білком uvrB розпізнають місце пошкодження ДНК. Білки uvrC та uvrD видаляють пошкоджену ділянку. ДНК-полімераза I добудовує правильну послідовність нуклеотидів, а лігаза з'єднує фрагменти ДНК (рис. 3.17).

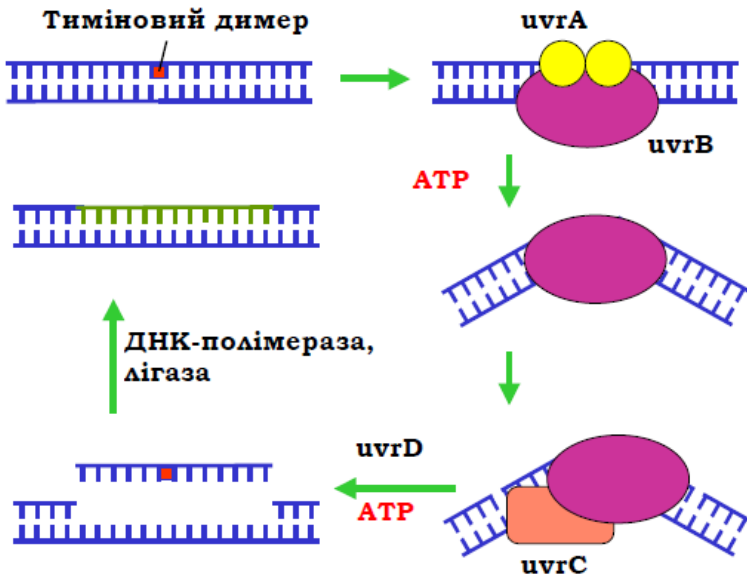


Рисунок 3.17 – Система *uvrABCD* ексцизійної репарації нуклеотидів в *E.coli* [8]

Порушення процесів репарації в організмі людини спричиняє ряд захворювань: пігментну ксеродерму,

трихотіодистрофію, синдром Кокайна, анемію Фанконі та ін. [2].

Молекулярною причиною **пигментної ксеродерми** є спадковий дефіцит **УФ-специфічної ендонуклеази**. Хворі на пигментну ксеродерму не можуть перебувати на сонці, оскільки УФ-промені спричиняють серйозні пошкодження шкіри, зокрема рак шкіри (рис. 3.18). Крім того, симптомами пигментної ксеродерми є неврологічні порушення.

Частота цього захворювання становить 1: 250 000 в Європі та США, 1:40 000 – в Японії.



*Рисунок 3.18 – Пигментна ксеродерма*

**Місметч-репарація** полягає в корекції неправильного спарювання основ під час реплікації.

Помилки реплікації, в результаті яких вбудовується неправильний нуклеотид, називають **місметчами** (mismatch – неузгодженість).

Установлено, що в клітинах *E.coli* частота помилок під час реплікації становить 1 на 10 000 пар нуклеотидів, в еукаріотів помилки виникають частіше. ДНК-полімерази здійснюють корекцію некомплементарних нуклеотидів, проте деякі помилки реплікації залишаються не виправленими.

У клітинах *E.coli* репарація місметчів здійснюється за участі чотирьох білків: MutH, MutL, MutS, MutU (рис. 3.19).

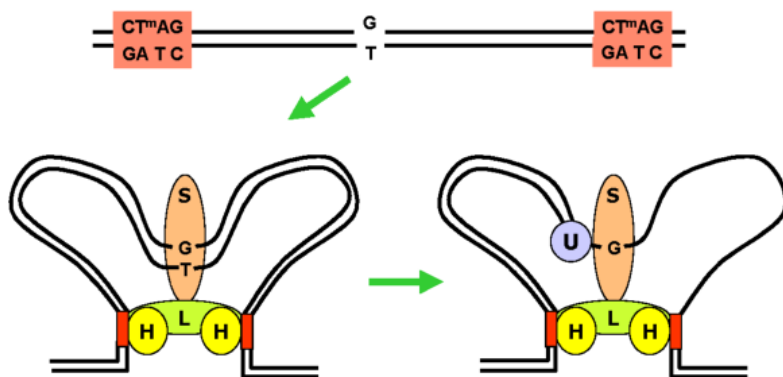


Рисунок 3.19 – Система репарації місметчів MutHLSU [3]

Першим до некомплементарної азотистої основи приєднується MutS, а потім зв'язуються MutL і дві молекули MutH. MutS виявляє помилку. MutH має ендонуклеазну активність: розрізає полінуклеотидний ланцюг ДНК та видаляє послідовність, що містить помилку. ДНК-полімераза добудовує правильну послідовність, ДНК-лігаза з'єднує фрагменти ДНК.

Система MutHLSU є консервативною, гомологічні білки наявні також і в еукаріотів (рис. 3.20). Доведено, що за участі подібних білків відбувається репарація ДНК в клітинах людини. Еукаріотичні гомологи бактеріальних білків MutL називають MLH (MutL homolog), а гомологи

MutS – MSH (MutS homolog). У людини виявлені 11 MLH та 4 MSH.

У процесі репарації ферменти розпізнають дочірній і материнський ланцюги ДНК за наявності метильної групи в послідовності GATC. Материнський ланцюг ДНК завжди метильований.

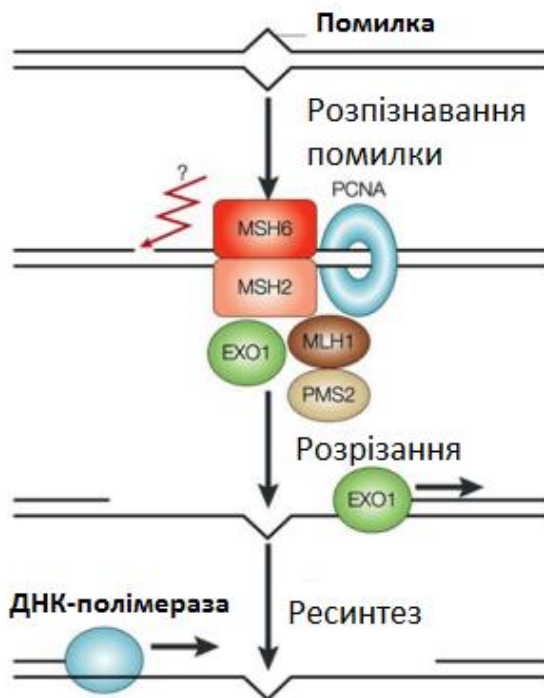


Рисунок 3.20 – Функціонування системи репарації місметчів в еукаріотів [2]

У 1994 р. було доведено, що підвищення частоти захворювань на рак є наслідком пригнічення місметч-репарації ДНК. Таким чином, від того, наскільки клітини спроможні справлятися з пошкодженнями ДНК, залежать не лише поява мутацій, а й виникнення спадкових захворювань, ракових пухлин, прискорення старіння.

## Розділ 4

### Генна інженерія

**Генна інженерія** – сукупність прийомів, методів і технологій отримання рекомбінантних ДНК, виділення генів із клітин, здійснення маніпуляцій із генами і введення їх в інші організми.

Особливістю генної інженерії є здатність створювати структури ДНК, яких ніколи не було в живій природі. Одним із важливих напрямів генної інженерії є створення ліків нового покоління, що являють собою біологічно активні білки людини.

Датою появи генної інженерії вважають 1973 р., коли Г. Бойер і С. Коен створили першу рекомбінантну ДНК, що містить фрагменти ДНК фага  $\lambda$  E.coli і вірусу SV40 мавпи.

Методи генної інженерії:

- виділення нуклеїнових кислот;
- виділення генів;
- хімічний синтез генів;
- створення векторів для перенесення генів;
- конструювання рекомбінантної ДНК;
- трансформація – введення рекомбінантної ДНК в клітини;
- ідентифікація клітин, що мають рекомбінантну ДНК;
- клонування ДНК;
- ампліфікація ДНК;
- секвенування ДНК.



## 4.1. Технологія рекомбінантної ДНК

**Рекомбінантна ДНК** – молекула ДНК, утворена при сполученні генів у новій комбінації.

Рекомбінантна ДНК створюється *in vitro* шляхом об'єднання фрагментів ДНК різних організмів.

У 1978 р. В. Арбер, Д. Натанс, Х. О. Сміт отримали Нобелівську премію за відкриття **рестриктаз** – ферментів, що розрізають ДНК на фрагменти (рис. 4.1). Ідентифіковано більше ніж 200 унікальних послідовностей ДНК, що розпізнаються специфічними рестриктазами.

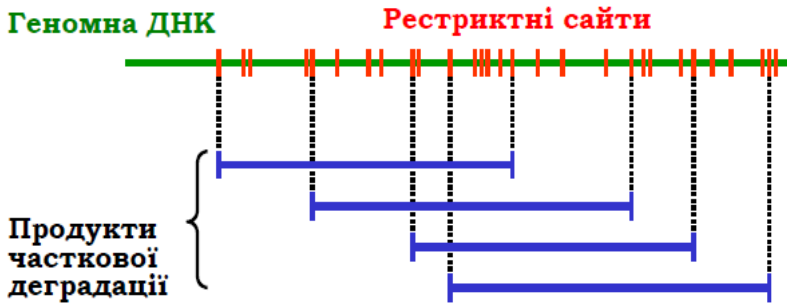


Рисунок 4.1 – Розщеплення ДНК рестриктазами [8]

Рестриктази розщеплюють полінуклеотидний ланцюг у специфічних ділянках – сайтах рестрикції. Зазвичай сайти рестрикції являють собою паліндромні послідовності, в яких спостерігається подвійна симетрія (у напрямку 5'→3' послідовності нуклеотидів ідентичні).

Рестриктази здійснюють не прямий розріз через обидва ланцюги ДНК, а ступінчастий, у результаті якого утворюються «липкі» кінці, що можуть легко з'єднатися один з одним. Якщо змішати два фрагменти ДНК з ідентичними «липкими» кінцями, вони з'єднаються. Для ковалентного з'єднання розривів використовують фермент ДНК-лігазу бактеріофага Т<sub>4</sub> (рис. 4.2).

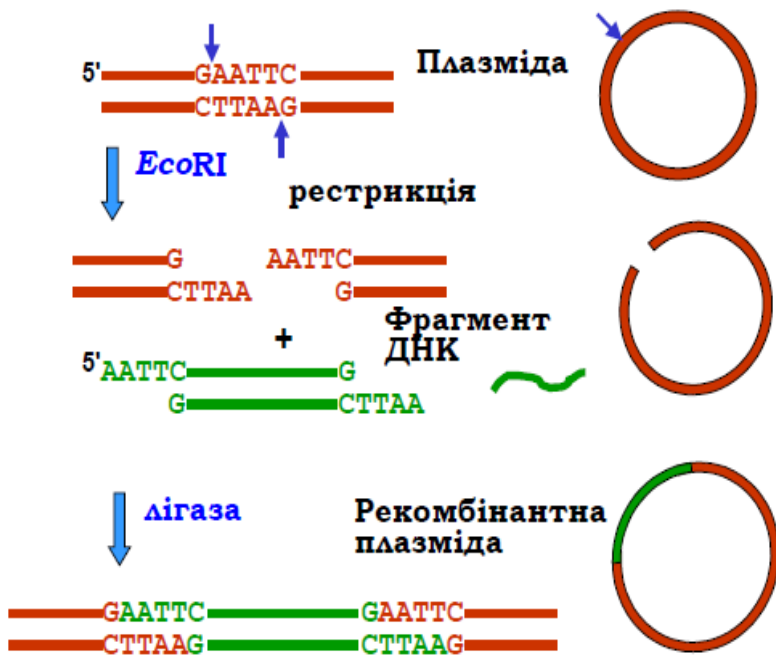


Рисунок 4.2 – Одержання рекомбінантної ДНК на основі плазмідного вектора [8]

Продуктами експресії генів рекомбінантної ДНК є рекомбінантні білки. За допомогою технології рекомбінантної ДНК одержують білки і пептиди людини: інсулін, інсуліноподібні фактори росту, інтерферони, інтерлейкіни, ендорфіни, хоріонічний гонадотропін, тиреотропний гормон, кальцитонін, соматоліберин, соматомедин та ін.

## 4.2. Клонування генів. Клонотеки генів

**Клоном** називають сукупність ідентичних копій, утворених з одного попередника. Клони генів використовують для вивчення їх структури.

Суть клонування полягає у введенні ділянки ДНК в бактеріальну клітину, де вона буде реплікуватися. Одна клітина забезпечує утворення колонії, що містить велику кількість ідентичних клітин: наприклад, при вирощуванні на агарі за одну ніч клітина *E.coli* утворює  $10^7$  клітин в одній колонії. Таким чином, за допомогою бактеріальних клітин забезпечується синтез значної кількості копій необхідних генів.

### Етапи клонування генів:

- розщеплення ДНК рестриктазами;
- оброблення рестриктазами вектора для клонування;
- з'єднання двох фрагментів ДНК за допомогою ДНК-лігази фага  $T_4$ ;
- трансформація клітин-реципієнтів;
- ампліфікація ДНК в трансформованих клітинах.

Перенесення генів від організму-донора до організму-реципієнта здійснюють за допомогою векторів. Як вектори використовують плазміди (рис. 4.3), віруси, фрагменти хромосом еукаріотичних клітин.

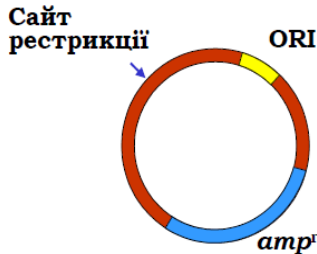
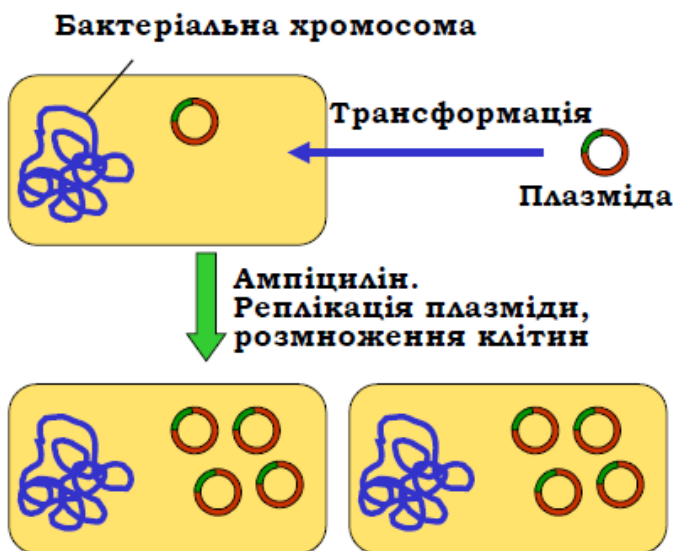


Рисунок 4.3 – Схема організації плазмідного вектора (ORI – ориджин реплікації, amp<sup>r</sup> – ген стійкості до ампіциліну [3])

Існують 4 групи методів введення рекомбінантної ДНК в клітини:

- хімічні (використання ліпосом, іонів металів);
- фізичні (електропорація, лазерне опромінення);
- механічні (мікроін'єкція, бомбардування клітин мікрочастинками, на яких сорбована рекомбінантна ДНК);
- біологічні (перенесення генів у процесі вірусної інфекції – трансфекція).

Процес поглинання клітинами екзогенної ДНК називається **трансформацією** (рис. 4.4).



*Рисунок 4.4 – Розмноження рекомбінантної плазміді в бактеріальних клітинах [3]*

Ефективність трансформації визначають як кількість трансформантів на 1 мкг уведеної ДНК. Сучасні методи трансформації бактеріальних клітин дозволяють одержати до  $10^7$ – $10^8$  трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК [14].

**Клонотека генів** являє собою набір різних послідовностей нуклеотидів ДНК, клонованих у складі векторних молекул, які в сумі складають весь геном організму.

Для створення клонотеки генів рекомбінантну ДНК упаковують у фаги та інфікують ними бактерії. Чим коротші фрагменти ДНК для клонотек генів і чим складніший досліджуваний геном, тим більшу кількість клонів необхідно одержати, щоб клонотека була повною. Наприклад, щоб створити геномну клонотеку з фрагментів ДНК довжиною 20 тис. п. н. (будь-яка послідовність представлена з імовірністю 99 %), для бактерій необхідно мати 460 клонів, для ссавців – 600 тис., для покритонасінних рослин – у 10 разів більше.

Клонотеки, одержані з використанням бактеріальних клітин, зберігають за температури  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  у вигляді суспензії в 30 % розчині гліцеролу, а суспензії фагових частинок – у диметилсульфоксиді. Це запобігає руйнуванню клітин бактерій і фагів при заморожуванні та відтаванні.

### **4.3. Полімеразна ланцюгова реакція**

Процес утворення додаткових копій нуклеотидних послідовностей ДНК називають **ампліфікацією**.

Ампліфікацію ДНК здійснюють шляхом клонування або за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР є ефективним методом одержання *in vitro* великої кількості копій специфічних нуклеотидних послідовностей. За розроблення методу ПЛР К. Б. Мюлліс отримав Нобелівську премію з хімії у 1993 році.

Схема процесу ПЛР зображена на рисунку 4.5.

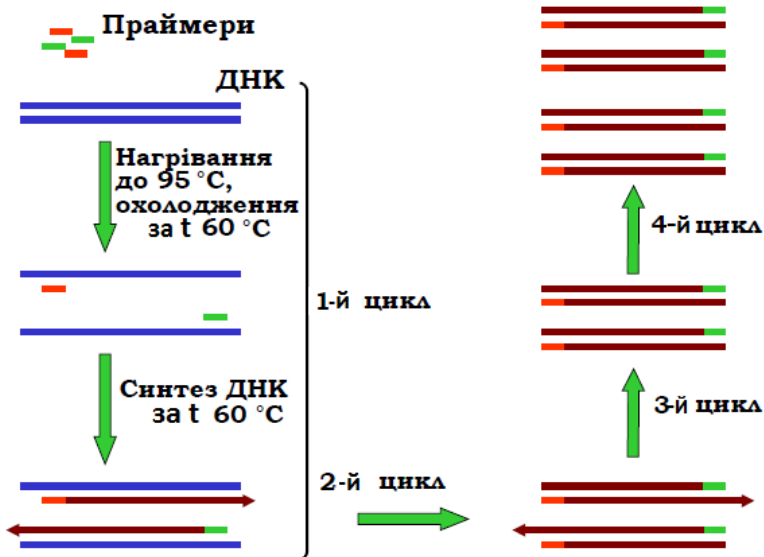


Рисунок 4.5 – Схема ПЛР [8]

ПЛР – циклічний процес, кожен цикл має такі етапи:

- 1) денатурацію ДНК ( $t\ 95\ ^\circ\text{C}$ );
- 2) ренатурацію – приєднання праймерів до ДНК-матриці ( $t\ 55\text{--}60\ ^\circ\text{C}$ );
- 3) синтез ДНК – Таq-полімераза добудовує комплементарні ланцюги ДНК ( $t\ 72\text{--}75\ ^\circ\text{C}$ ).

Першому циклу ПЛР передують інкубація суміші за  $t\ 92\text{--}96\ ^\circ\text{C}$  впродовж 0,5–10 хв, що супроводжується інактивацією домішок білків. Під час короткочасного нагрівання (впродовж 1–2 хв) відбувається плавлення ДНК. При охолодженні до температури  $60\ ^\circ\text{C}$  праймери з'єднуються з комплементарними ділянками ДНК, Таq-полімераза синтезує нові ланцюги ДНК. Після завершення стадії синтезу ДНК цикл ПЛР повторюють в автоматичному режимі. Кожний цикл ПЛР триває 3–5 хвилин.

У ПЛР використовують Таq-полімераза, що стійка до дії високих температур. Цей фермент був виділений із термофільних бактерій *Thermus aquaticus*, які мешкають у гарячих джерелах. Термостабільна Таq-полімераза проявляє активність за температури 95 °С і вище.

Метод ПЛР дозволяє збільшувати кількість фрагментів ДНК в мільйон разів. Із геномної ДНК 1–2 соматичних клітин можна отримати  $10^2$ – $10^5$  копій ДНК.

Сфери застосування ПЛР:

- отримання великої кількості специфічних фрагментів ДНК (ампліфікація);
- синтез генів;
- секвенування ДНК;
- виявлення в генах спонтанних мутацій, що призводять до спадкових захворювань;
- діагностика інфекційних захворювань (виявлення патогенних мікроорганізмів у біологічному матеріалі).

У 1992 р. Т. Сано вперше розробив **метод імуноПЛР** – найбільш чутливий метод виявлення білків та інших антигенів. Чутливість цього методу в 1 000 разів перевищує чутливість імуноферментного аналізу. Як зонди для виявлення антигенів використовують кон'югати фрагментів ДНК з антитілами. Якщо в біологічному зразку наявний антиген, він з'єднується з антитілом, сигнал передається до ДНК і здійснюється ПЛР. Таким чином, синтез ДНК свідчить про наявність антигенів.

#### 4.4. Генна діагностика

Відомо, що геном людини містить 3,5 млрд нуклеотидів і більше ніж 30 тис. генів. У геномі людини нуклеотидні послідовності, що кодують білки, становлять лише 1,1–1,4 % від загальної довжини ДНК. Мутації в структурних генах призводять до серйозних порушень на

рівні клітин, тканин або органів. Найчастіше в результаті мутацій змінюється активність певного ферменту, що спричиняє накопичення токсичного субстрату або дефіцит сполуки, необхідної для нормального функціонування клітини.

На сьогодні відомо близько 5 000 спадкових порушень обміну речовин і лише для 500 із них виявлені молекулярні причини. Розроблені тести, що визначають генетичну схильність до спадкових захворювань, а також методи їх молекулярної діагностики.

Основою молекулярної діагностики спадкових захворювань є імунологічні підходи або методи виявлення специфічної послідовності ДНК.

Для виявлення мутацій у генах застосовують гібридизацію нуклеїнових кислот, тобто сполучення двох комплементарних фрагментів різних молекул ДНК. Для ідентифікації специфічної послідовності ДНК використовують зонди. Зонди можуть бути:

- молекулами ДНК або РНК;
- довгими (більше ніж 100 нуклеотидів) і короткими (менше ніж 50 нуклеотидів);
- продуктами хімічного синтезу або клонованими генами.

Одержані й охарактеризовані більше ніж 100 різних ДНК-зондів, що дозволяють виявити патогенні штами різних бактерій, вірусів і найпростіших. Розроблені зонди для діагностики бактеріальних інфекцій людини, спричинених *Legionella pneumophila* (респіраторні захворювання), *Salmonella typhi* (харчові отруєння), *Camphylobacter hyointestinalis* (гастрити).

Використання методів молекулярної діагностики дозволяє виявити мінімальні концентрації ДНК патогенних мікроорганізмів у крові хворих. Так, наприклад, застосування ДНК-зонда дозволяє виявити в крові хворого 1 нг ДНК збудника малярії *Plasmodium falciparum*.



Таким чином, за допомогою ДНК-зондів можна виявити будь-які патогенні мікроорганізми.

Крім зондів і ДНК-мішені, важливим компонентом системи ДНК-діагностики є метод детекції гібридних молекул. У 1983 р. Коннер розробив метод діагностики серпоподібноклітинної анемії, що ґрунтується на використанні гібридизації нуклеїнових кислот. Молекулярною причиною серпоподібноклітинної анемії є заміна валіну на глутамінову кислоту в 6-му положенні  $\beta$ -ланцюга глобіну. Для діагностики захворювання використовують 2 олігонуклеотиди довжиною 19 п. н.: перший комплементарний нормальному алелю  $\beta$ -глобінового гена ( $\beta^A$ ), а другий – мутантному ( $\beta^S$ ). ДНК здорової людини ( $\beta^A\beta^A$ ) гібридизується лише з  $\beta^A$ -зондом, ДНК хворої на серпоподібноклітинну анемію ( $\beta^S\beta^S$ ) – лише з  $\beta^S$ -зондом, а ДНК людини, гетерозиготної за даним геном ( $\beta^A\beta^S$ ), – з обома зондами. Ця модельна система вперше продемонструвала можливість визначення генотипів за допомогою гібридизації ДНК.

У судовій медицині для ідентифікації біологічних зразків застосовують метод геномної дактилоскопії. Як зонди використовують мінісателітні ДНК людини, які не кодують білків і характеризуються великою варіабельністю. ДНК-відбиток кожної людини індивідуальний, він являє собою набір різних за довжиною фрагментів, що відповідають мінісателітним послідовностям геному.

Застосування методів ДНК-діагностики дозволяє виявити спадкові захворювання на стадії ембріона.

У майбутньому генна діагностика дозволить визначити весь спектр генів схильності до захворювань у кожної людини, створити «генетичний паспорт» людини.

## 4.5. Генна терапія

Із загальної кількості відомих захворювань людини 40 % становлять генетичні хвороби. Деякі спадкові захворювання обумовлені мутаціями в одному гені. Для лікування моногенних захворювань застосовують **генну терапію** – введення нормальних генів пацієнтам для корекції дефектних генів. Усі дослідження з генної терапії спрямовані на корекцію генетичних дефектів соматичних, а не статевих клітин. Експерименти у сфері генної терапії клітин зародкової лінії людини заборонені.

Для лікування спадкових захворювань на молекулярному рівні використовують 2 основних підходи: генну терапію *ex vivo* і генну терапію *in vivo*.

**Генна терапія *ex vivo*** базується на трансплантації генетично модифікованих клітин, що продукують терапевтичний білок.

Генна терапія *ex vivo* складається з таких етапів (рис. 4.6):

- 1) одержання клітин хворого;
- 2) корекції генетичного дефекту за допомогою введення потрібного гена в ізольовані клітини;
- 3) відбору і культивування генетично «виправлених» клітин;
- 4) інфузії або трансплантації цих клітин пацієнтові.

Використання власних клітин пацієнта (аутологічних клітин) гарантує, що після інфузії чи трансплантації не буде розвиватися імунна відповідь.

Використання аутологічних клітин попереджує їх відторгнення, але обмежує сферу застосування генної терапії *ex vivo*. Так, кількість клітин тканини-мішені може бути недостатньою для їх виділення і культивування *in vitro*, деякі соматичні клітини неефективно поглинають ДНК, а експресія клонованого гена виявляється

короткочасною. Тому розроблені системи, що захищають неаутологічні клітини від імунної відповіді.

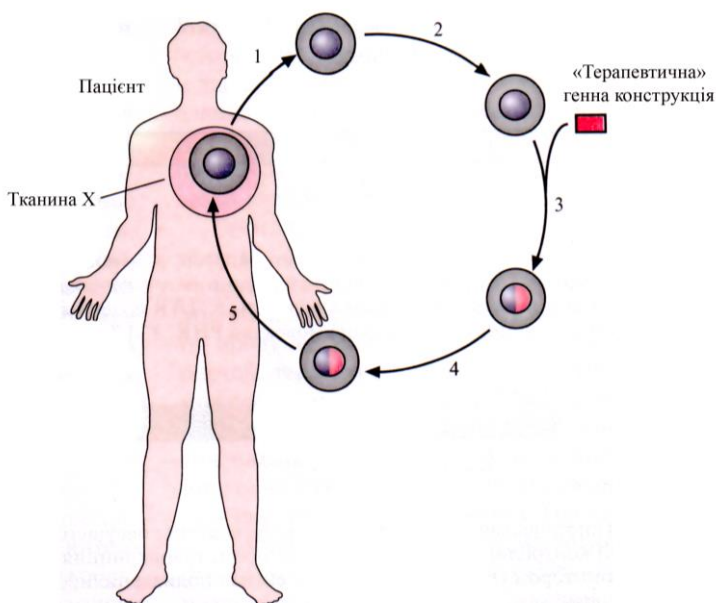


Рисунок 4.6 – Схема генної терапії ex vivo [11]

Альтернативний спосіб генної терапії ex vivo використовує генно-інженерну модифікацію неаутологічних клітин, оточених мембраною, що запобігає реакції відторгнення і не перешкоджає вивільненню «терапевтичного» генного продукту.

При генній терапії in vivo «терапевтичний» ген вводять безпосередньо в клітини тканини-мішені хворого (рис. 4.7). Розроблені різні системи доставлення генів: вірусні (ретровірусні, аденовірусні, вектори на основі вірусу простого герпесу) і невірусні (ін'єкція ДНК, бомбардування тканини-мішені частинками, кон'югованими з ДНК, введення ДНК в складі ліпосом).

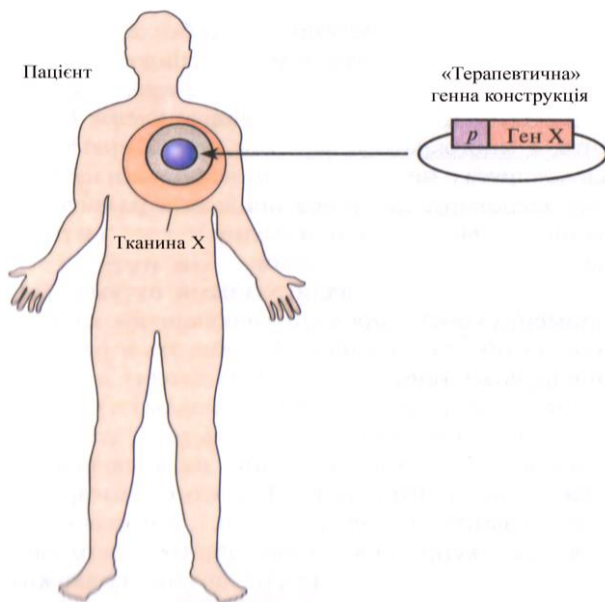


Рисунок 4.7 – Схема генної терапії *in vivo* [11]

Оптимальна векторна система повинна забезпечувати високу ефективність поглинання «терапевтичного» гена клітинами-мішенями, мінімальність його внутрішньоклітинного руйнування під час транспорту в ядро і підтримання достатнього рівня експресії. Вважають, що оптимальним терапевтичним вектором є штучна хромосома людини.

Вивчається терапевтичний ефект різних олігонуклеотидів: модифікованих за допомогою генної інженерії рибозимів, що розщеплюють специфічні мРНК; аптамерів, що зв'язуються зі специфічними білками і блокують їх функції; олігонуклеотидів, за допомогою яких можна здійснювати корекцію заміни однієї нуклеотидної пари і мутації.

Вперше генна терапія була застосована в 1990 р. для лікування спадкового імунодефіциту. Група вчених США під керівництвом В. Андерсона розпочала лікування

4-річної дівчинки Ашанти де Сільви з тяжкою формою імунodefіциту. Молекулярною причиною захворювання є пошкодження гена білка аденозиндезамінази (АДА). За відсутності АДА лейкоцити гинуть, організм стає беззахисним перед вірусами і бактеріями. Для лікування Ашанти застосували генну терапію *ex vivo*: з організму виділили клітини імунної системи, піддали їх генетичній модифікації і ввели дівчинці. Копії нормального гена були введені в клітини крові Ашанти за допомогою вірусного вектора. У клітинах розпочався синтез АДА, через 6 місяців уміст лейкоцитів в організмі дівчинки досягнув нормального рівня [7].

З 90-х рр. ХХ ст. сотні лабораторій світу проводять дослідження з використання генної інженерії для лікування захворювань.

За допомогою генної терапії лікують міодистрофію Дюшена. Молекулярною причиною захворювання є мутація гена дистрофіну, необхідного для скрочення м'язових волокон. Ген дистрофіну локалізований в Х-хромосомі, тому хворіють переважно чоловіки. За відсутності дистрофіну м'язи втрачають здатність до скорочення, настає смерть. Для моделювання захворювання в експериментальних тварин (мишей) видалили ген дистрофіну. При введенні нормального гена експериментальним тваринам спостерігалось відновлення функції м'язових волокон (до 25 %). Установлено, що при генній терапії міодистрофії людини необхідна модифікація більшості (до 50 %) м'язових волокон.

У 2000 р. в США для лікування гемофілії була запропонована процедура введення гена одного з факторів згортання крові. Установлено, що введення цього гена хворим на гемофілію перешкоджає виникненню крововиливів у пацієнтів. Після такого лікування пацієнти з гемофілією більше ніж 1 рік не відчувають необхідності в додаткових ін'єкціях фактора згортання крові.

Серед неспадкових захворювань людини значну увагу вчені приділяють раку. Впроваджується декілька напрямків боротьби з хворобою:

- генетична модифікація клітин імунної системи для посилення їх протипухлинної активності та пригнічення роботи онкогенів;
- підвищення чутливості пухлинних клітин до хіміотерапевтичних препаратів.

Для підвищення чутливості злоякісних клітин до хіміотерапії використовують ген, що кодує фермент тимідинкіназу вірусу простого герпесу. Клітини, в яких синтезується вірусна тимідинкіназа, перетворюють хімічний препарат ганцикловір на токсичний продукт, у результаті цього вони гинуть, ріст пухлини припиняється.

Є певні успіхи генної терапії в боротьбі зі СНІДом. Учені ідентифікували ген CCR5, який забезпечує резистентність до ВІЛ. Ген CCR5 перешкоджає утворенню на поверхні Т-лімфоцитів рецепторів, з якими зв'язується ВІЛ. Також ідентифікований ген Rantes, що визначає, чи стане людина носієм ВІЛ, чи захворіє на СНІД. Незначні відмінності в гені Rantes, який відповідає за формування імунної системи, можуть підвищувати схильність до ВІЛ.

Відомо, що геном ВІЛ містить послідовність TAR, яку розпізнає вірусний регуляторний білок. Лише після взаємодії цього білка з TAR-елементом вірус починає розмножуватися. Щоб зупинити процес розмноження ВІЛ, було запропоновано вводити штучно синтезовану TAR-послідовність в інфіковані клітини. Вбудована в клітини послідовність ДНК відіграє роль пастки: в інфікованій клітині на ній синтезуються РНК, регуляторний білок вірусу зв'язується переважно з ними, а не з РНК вірусу, внаслідок цього вірус припиняє розмножуватися.

Незважаючи на значні досягнення генної терапії в лікуванні багатьох захворювань, вона не набула великого поширення в медичній практиці. Причини цього такі:

- відторгнення чужорідних генів, спричинене імунною реакцією організму;

- перенесені гени існують у клітинах упродовж короткого часу, іноді навіть не встигають напрацювати необхідної кількості лікувального продукту, у зв'язку з цим спостерігається тимчасове виліковування і лише в частини клітин;

- невисока ефективність сучасних методів перенесення генів у клітини хворих;

- вбудовування нового генетичного матеріалу в певні ділянки ДНК людини може спричиняти рак. Відомі випадки, коли пацієнти з імунною недостатністю після застосування генної терапії захворіли на лейкемію.

Корекція генетичних дефектів не призведе до погіршення генофонду людської популяції. За даними популяційної генетики для істотного підвищення частоти шкідливого гена в результаті ефективного лікування необхідні тисячі років. Так, наприклад, якщо генетичне захворювання трапляється в одного із 100 000 новонароджених, то пройдуть 2 000 років після початку застосування ефективної генної терапії, перш ніж частота захворювання подвоїться.

Таким чином, генна терапія людини вважається безпечною медичною процедурою, хоча не зовсім ефективною.

## Словник термінів

**Аденін** – пуринова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот. Аденін комплементарний тиміну та урацилу.

**Алель** – одна з двох альтернативних структурних форм гена.

**Ампліфікація** – утворення додаткових копій нуклеотидних послідовностей ДНК.

**Антибіотики** – специфічні хімічні речовини, що синтезуються мікроорганізмами і здатні в малих кількостях чинити вибірккову токсичну дію на інші мікроорганізми та клітини пухлин.

**Антипаралельна орієнтація** – протилежна спрямованість ( $5' \rightarrow 3'$  і  $3' \rightarrow 5'$ ) полінуклеотидних ланцюгів у дволанцюгових молекулах нуклеїнових кислот.

**Бактеріофаг** – вірус, що інфікує бактерії.

**Бактеріофаг  $\lambda$**  – бактеріофаг *E.coli*, який широко використовується як вектор при клонуванні ДНК.

**Вектор** – молекула ДНК, що використовується для перенесення генів від організму-донора до організму-реципієнта, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

**Ген** – ділянка ДНК, що кодує первинну структуру поліпептиду, молекули транспортної або рибосомної РНК.

**Генетичний код** – це система записування генетичної інформації у вигляді послідовності нуклеотидів, в якій кожні три нуклеотиди (кодон) кодують одну амінокислоту.

**Генна інженерія** – напрям молекулярної біології, пов'язаний зі створенням *in vitro* нових комбінацій генетичного матеріалу, здатного синтезувати продукти обміну.



**Генна терапія ex vivo** – введення гена в ізольовані клітини хворого. Після культивування і трансформації клітини вводять в організм хворого. Ця процедура дозволяє виправляти генетичні дефекти.

**Генна терапія in vivo** – введення гена безпосередньо в тканину або орган хворого з метою корекції генетичних дефектів.

**Геном** – сукупність усієї спадкової генетичної інформації організму.

**Геномна бібліотека, банк генів** – набір клонованих фрагментів ДНК, що в сукупності складають індивідуальний геном.

**Глікозилювання** – ковалентне приєднання вуглеводного залишку до білкової молекули.

**Гуанін** – пуринова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот. Гуанін комплементарний цитозину.

**Дезоксирибоза** – пентоза, що входить до складу ДНК.

**Дезоксирибонуклеїнова кислота, ДНК** – полімер, що складається з дезоксирибонуклеотидів; видоспецифічний носій генетичної інформації.

**Денатурація ДНК** – втрата просторової структури ДНК внаслідок руйнування водневих зв'язків (відокремлення ланцюгів ДНК один від одного).

**ДНК-лігаза** – фермент, що каталізує утворення 3', 5'-фосфодіефірних зв'язків між нуклеотидами в місці розриву ланцюга ДНК.

**ДНК-полімераза** – фермент, що каталізує реплікацію ДНК.

**ДНК-полімераза Taq** – термостабільна ДНК-полімераза бактерії *Thermus aquaticus* (зберігає активність при 95 °С), застосовується в методі ПЛР.

**Екзон** – інформативна ділянка гена еукаріот (містить інформацію про структуру поліпептиду або РНК).

**Екзонуклеаза** – фермент, що каталізує розрив хімічного зв'язку між пентозою та фосфатним залишком у складі нуклеотиду, розміщеного з кінця полінуклеотидного ланцюга.

**Експресія генів** – це реалізація інформації, закодованої в послідовності нуклеотидів.

**Електрофорез** – метод розділення заряджених молекул (ДНК, РНК, білків), що ґрунтується на різній швидкості їх переміщення в електричному полі.

**Ендонуклеаза** – фермент що каталізує розрив хімічного зв'язку між пентозою та фосфатним залишком у складі нуклеотиду, розміщеного всередині полінуклеотидного ланцюга.

**Енхансери** – регуляторні ділянки гена, при з'єднанні з якими білкові фактори активують транскрипції.

**Зворотна транскрипція** – процес синтезу ДНК на основі мРНК, характерний для ретровірусів.

**Зворотна транскриптаза** – РНК-залежна ДНК-полімераза, що використовує молекулу РНК як матрицю для синтезу комплементарного ланцюга ДНК.

**Індукція** – посилення експресії генів.

**Інсулятори** – це ділянки ДНК, що блокують випадкові взаємодії промотору з енхансерами або сайленсерами.

**Інтрон** – неінформативна ділянка гена еукаріот (некодуєча послідовність).

**«Кеп»** – метильований гуанозин на 5'-кінці мРНК еукаріот.

**Клонування генів** – система методів, що використовуються для одержання клонованих ДНК: виділення необхідного гена, включення його в плазмиду (вектор), уведення в клітину організму-хазяїна, багатократна реплікація.

**Кодон** – послідовність із трьох нуклеотидів, що кодує певну амінокислоту.

**Комплементарна ДНК, кДНК** – молекула ДНК, синтезована на основі мРНК за участі РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази).

**«Липкі» кінці** – взаємно комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, утворювані при розриві дволанцюгових ДНК за участі рестриктаз.

**Матрична РНК, мРНК** – молекула РНК, що містить інформацію про амінокислотну послідовність білкової молекули. мРНК є матрицею для синтезу клітинних білків.

**Метилювання** – приєднання до молекули метильної групи.

**Молекулярна біологія** – наука, що вивчає молекулярні основи життєдіяльності клітини, механізми зберігання, передавання та реалізації генетичної інформації.

**Молекулярна діагностика** – виявлення патогенного мікроорганізму, специфічної речовини або зміненої нуклеотидної послідовності за допомогою молекулярно-біологічних методів.

**Мутагени** – фактори, що підвищують частоту виникнення мутацій.

**Мутації** – спонтанні або індуковані зміни структури геному, що успадковуються.

**Нуклеозид** – сполука, що складається з азотистої основи і пентози.

**Нуклеїнові кислоти** – це біополімери, побудовані з мононуклеотидів.

**Нуклеотид** – сполука, що складається з азотистої основи, пентози (рибози або дезоксирибози) та одного чи декількох залишків фосфатної кислоти.

**Оперон** – група генів, що контролюється одним промотором.

**Паліндром** – послідовність нуклеотидів, ідентична в обох ланцюгах ДНК у напрямку 5' → 3'.

**Плавлення ДНК** – термічна денатурація ДНК.

**Плазміда** – позахромосомна дволанцюгова молекула ДНК у кільцевій формі, що автономно реплікується.

**Полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР** – метод ампліфікації специфічного сегмента ДНК. Процес складається з циклічно повторюваних реакцій: денатурації ДНК, приєднання праймерів, синтезу ДНК.

**Посттрансляційна модифікація** – зміна структури білкових молекул після завершення їх синтезу.

**Праймер** – короткий олігорибонуклеотид, з якого починається синтез ДНК.

**Проект «Геном людини»** – міжнародна програма, метою якої є створення генетичних і фізичних карт геному людини і визначення повної нуклеотидної послідовності ДНК.

**Промотор** – ділянка ДНК, з якої починається транскрипція. До промотору приєднується фермент РНК-полімераза.

**Процесинг** – сукупність процесів утворення зрілих молекул РНК у клітині.

**Рекомбінантна ДНК** – молекула ДНК, утворена при сполученні генів у новій комбінації. Створюється *in vitro* шляхом об'єднання фрагментів ДНК різних організмів.

**Рекомбінантний білок** – білок, що є продуктом експресії генів рекомбінантної ДНК.

**Ренатурація ДНК** – процес відновлення нативної структури денатурованої ДНК.

**Репарація** – процес виправлення помилок під час реплікації або відновлення структури ДНК у разі пошкодження.

**Реплікація** – процес самоподвоєння ДНК.

**Репресія** – пригнічення транскрипції або трансляції.

**Рестриктаза (рестрикційна ендонуклеаза)** – бактеріальний фермент, що розщеплює дволанцюгову молекулу ДНК в специфічних сайтах.

**Ретровіруси** – група РНК-вмісних вірусів, що містять зворотну транскриптазу.

**Рибоза** – пентоза, що входить до складу РНК.

**Рибонуклеїнова кислота, РНК** – нуклеїнова кислота, що складається з рибонуклеотидів. Розрізняють типи РНК: мРНК, тРНК, рРНК.

**Рибосомна РНК, рРНК** – РНК, що входить до складу рибосом.

**РНК-полімераза** – фермент, що каталізує синтез РНК із рибонуклеотидтрифосфатів.

**Сайленсери** – регуляторні ділянки ДНК, при з'єднанні з якими білкові фактори пригнічують транскрипцію.

**Секвенування** – визначення нуклеотидної послідовності ДНК і РНК.

**Сплайсинг** – процес видалення інтронів (некодуючих ділянок) та об'єднання екзонів (кодуючих ділянок) мРНК.

**Структурні гени** – ділянки геному, що кодують РНК чи білок.

**Теломераза** – фермент, що каталізує добудовування теломерної ДНК.

**Тимін** – піримідинова азотиста основа, що входить до складу ДНК. Тимін комплементарний аденіну.

**Трансляція** – процес біосинтезу білка на рибосомах.

**Транскрипція** – процес синтезу РНК на матриці ДНК.

**Трансляція** – процес синтезу білків на основі мРНК.

**Транспортна РНК, тРНК** – РНК, що транспортує амінокислоти до рибосом.

**Урацил** – піримідинова азотиста основа, що входить до складу РНК. Урацил комплементарний аденіну.

**Ферменти** – біологічні каталізатори білкової природи.

**Фолдинг** – процес набування білком просторової структури.

**Хромосома** – надмолекулярна структура клітинного ядра, основу якої складає конденсована молекула ДНК; носій генетичної інформації.

**Цистрон** – ген, що контролює одну функцію.

**Цитозин** – піримідинова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот.

## Список використаної літератури

1. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – Москва : МАИК «Наука/Интерпериодика», 2002. – 446 с.
2. Біохімія нуклеїнових кислот : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, Д. М. Гребіник. – Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2013. – 290 с.
3. Генетика : підручник / А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. ; за ред. А. В. Сиволоба. – Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. – 320 с.
4. Гены и геномы : в 2 т. / М. Сингер, П. Берг ; перевод с англ. – Москва : Мир, 2002. – 764 с.
5. Досягнення і проблеми післягеномної ери / Д. С. Вигнан, О. Д. Оліярник // Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького. – 2013. – Т. 15, № 3 (57). – С. 3–9.
6. Искусственные генетические системы. Т. 1. Генная и белковая инженерия / Л. И. Патрушев. – Москва : Наука, 2004. – 526 с.
7. Іншина Н. М. Біотехнологія : навч. посіб. / Н. М. Іншина. – Суми : СумДПУ ім. А. С. Макаренка, 2011. – 172 с.
8. Молекулярна біологія : підручник / А. В. Сиволоб. – Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. – 384 с.
9. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, М. Льюис, Дж. Рефф и др. – Москва ; Ижевск : НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2012. – 2000 с.

10. Молекулярная биология клетки: руководство для врачей / Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. – Москва : Бинном-Пресс, 2003. – 272 с.
11. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва : Мир, 2002 – 589 с.
12. Регуляція експресії генів : презентація лекції для студентів / Н. В. Заїчко. – Вінниця : ВНМУ ім. М. І. Пирогова, 2017. – На правах рукопису (<https://dspace.vnmu.edu.ua/123456789/2214>).
13. Реплікація, транскрипція, трансляція : презентація лекції для студентів / Н. В. Заїчко. – Вінниця : ВНМУ ім. М. І. Пирогова, 2017. – На правах рукопису (<https://dspace.vnmu.edu.ua/123456789/2159>).
14. Уолкер Ш. Биотехнология без тайн / Ш. Уолкер. – Москва : Эксмо, 2008. – 336 с.
15. DNA replication and recombination / B. Alberts // Nature. – 2003. – Vol. 421. – P. 431–435.
16. Prions, prionoids and protein misfolding disorders / C. Scheckel, A. Aguzzi // Nature Reviews Genetics. – 2018. – Vol. 19. – P. 405–418.
17. The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome // Nature. – 2012. – Vol. 489. – P. 57–74.



Навчальне видання

**Іншина Наталія Миколаївна**

# **Основи молекулярної біології**

Навчальний посібник

Художнє оформлення обкладинки С. В. Нікітюка  
Редактор С. М. Симоненко  
Комп'ютерне верстання Н. М. Іншиної

Формат 60×84/16. Ум. друк. арк. 6,98. Обл.-вид. арк. 6,42. Тираж 300 пр. Зам. №

Видавець і виготовлювач  
Сумський державний університет,  
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3062 від 17.12.2017.